

RAFAELA SILVA LAMARCA

**Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em imagens digitais e
imunossensores para aplicação em amostras farmacêuticas e ambientais**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutora em Química.
Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont
Feitosa de Lima Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Nalin

Araraquara

2022

L215d

Lamarca, Rafaela Silva

Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em imagens digitais e imunossensores para aplicação em amostras farmacêuticas e ambientais / Rafaela Silva Lamarca. -- Araraquara, 2022
201 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Coorientador: Marcelo Nalin

1. Águas residuais - Análise. 2. Imagens digitais. 3. Biossensores. 4. Medicamentos. 5. Formaldeído. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

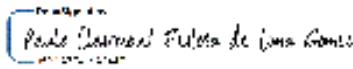
TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em imagens digitais e imunossensores para aplicação em amostras farmacêuticas e ambientais"

AUTORA: RAFAELA SILVA LAMARCA

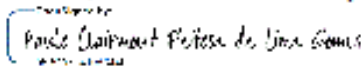
ORIENTADOR: PAULO CLAIMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

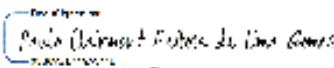
COORIENTADOR: MARCELO NALIN

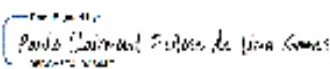
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela
Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CLAIMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual) 
Departamento de Química Analítica Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Participação Virtual) 
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

P/Prof.^a Dra. WANEISSA MELCHERT MATTOS (Participação Virtual) 
Departamento de Ciências Exatas / Universidade de São Paulo - USP - Piracicaba

P/Prof. Dr. CLAUDIMIR LÚCIO DO LAGO (Participação Virtual) 
Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

P/Prof. Dr. SIDNEI GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual) 
Instituto de Química / Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Uberlândia

Araraquara, 18 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafaela Silva Lamarca

Nome em citações bibliográficas: Lamarca, R. S.; Lamarca, Rafaela Silva

Nascimento: 19/06/1985

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Ubá – MG

E-mail: rafalamarca_uba@yahoo.com.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica.

Rua Professor Francisco Degni, 55- Quitandinha-Araraquara / São Paulo, Brasil – CEP 14800-060.

FORMAÇÃO ACADÊMICA / TITULAÇÃO

Doutorado

Doutorado em Química – Área de concentração: Química Analítica, junto ao Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara – SP.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Nalin

Projeto: “Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em imagens digitais e imunossensores para aplicação em amostras farmacêuticas e ambientais”

Período: 2017 – 2022

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Mestrado

Mestrado em Química – Área de concentração: Química Analítica, junto ao Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora – MG.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Projeto: “Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de ácidos fenólicos em amostras de azeite de dendê (*Elaeis guineensis*) por HPLC com detecção simultânea no UV e eletroquímica (homemade)”

Período: 2013 – 2015

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Graduação

Licenciatura em Química junto a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora – MG.

Período: 2008 – 2012.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio de Doutorado no Exterior

Faculté des Sciences et de Génie, Centre d’Optique, Photonique et Laser (COPL), Université Laval, Québec – Canadá.

Supervisor no exterior: Prof. Dr. Younès Messaddeq

Projeto: “Removal of pharmaceutical pollutants from water using novel devices based on functional glass materials”

Período: 2018 – 2019

Bolsa: Canada Excellence Research Chair in Photonic Innovations (CERCPI).

Iniciação Científica

Iniciação Científica junto ao Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora – MG.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Projeto: “Caracterização química de espécies forrageiras tropicais utilizada na alimentação de ruminantes”

Período: 2010 – 2012

Bolsa: Programa de Bolsas de Iniciação Científica (BIC-UFJF).

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Professora da Educação Profissional de Nível Médio, Curso Técnico em Química – Colégio Cecon Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG

Período: 2015 – 2016.

Professora de Química do Curso Oriente, Juiz de Fora – MG

Período: 2015 – 2017.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

MARASCO JÚNIOR, C. A.; DA SILVA, B. F.; **LAMARCA, R. S.**; LIMA GOMES, P. C. F. Automated method to determine pharmaceutical compounds in wastewater using on-line solid-phase extraction coupled to LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, p. 5147 – 5160, 2021.

MARASCO JÚNIOR, C. A.; SARTORE, DOUGLAS M.; **LAMARCA, R. S.**; DA SILVA, B. F.; SANTOS-NETO, A. J.; LIMA GOMES, P. C. F. On-line solid-phase extraction of pharmaceutical compounds from wastewater treatment plant samples using restricted access media in column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1180, artigo n. 122896, 2021.

LAMARCA, R. S.; FRANCO, D. F.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Label-free ultrasensitive and environment-friendly immunosensor

based on a silica optical fiber for the determination of ciprofloxacin in wastewater samples. **Analytical Chemistry**, v. 92, p. 14415 – 14422, 2020.

LAMARCA, R. S.; LIMA GOMES, P. C. F. A low cost method for carbamazepine, ciprofloxacin and norfloxacin determination in pharmaceutical formulations based on spot-test and smartphone images. **Microchemical Journal**, v. 152, artigo n. 104297, 2020.

LAMARCA, R. S.; DE FARIA, R. A. D.; ZANONI, M. V. B.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor. **RSC Advances**, v. 10, p. 1838 – 1847, 2020.

FERNANDES, G. M.; SILVA, W. R.; BARRETO, D. N.; **LAMARCA, R. S.**; LIMA GOMES, P. C. F.; PETRUCI, J. F. S.; BATISTA, A. D. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187 – 203, 2020.

LAMARCA, R. S.; LUCHIARI, N. C.; BONJORNO, A. F.; PASSARETTI FILHO, J.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. F. Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. **Analytical Methods**, v. 11, p. 3697 – 3705, 2019.

LAMARCA, R. S.; MATOS, R. C.; MATOS, M. A. C. Determination of phenolic acids in palm oil samples by HPLC-UV-AD using homemade flow cell. **Analytical Methods**, v. 10, p. 4535 – 4542, 2018.

MARTINS, G. S.; LUCHIARI, N. C.; **LAMARCA, R. S.**; DA SILVA, B. F.; LIMA GOMES, P. C. F. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9(4), p. 253 – 264, 2017.

FRANCO, D. F.; BARUD, H. S.; SANTAGNELI, S.; **LAMARCA, R. S.**; SANTOS, B. F.; SILVA, M. A. P.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; RIBEIRO, S. J. L.; NALIN, M.

Preparation and structural characterization of sodium polyphosphate coacervate as a precursor for optical materials. **Materials Chemistry and Physics**, v. 180, p. 114 – 121, 2016.

Capítulo de Livro Publicado

BARRETO, D. N.; CONRADO, J. A. M.; **LAMARCA, R. S.**; BATISTA, A. D.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. F.; PETRUCI, J. F. S. UV/Vis-based optical sensors for gaseous and volatile analytes. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2021.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Supervisão Científica

Supervisão Científica da aluna Flávia Tamy Okada da Silva, junto ao Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara – SP.

Projeto: “Determinação de carbamazepina em amostras de águas residuárias e medicamentos utilizando imagens digitais”

Período: Janeiro 2018 – Julho de 2018 (Carga horária: 30 horas)

Estágio Docência

Análise Instrumental – Curso Engenharia Química (UNESP / Araraquara)

Supervisor: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Período: Fevereiro 2018 – Junho de 2018 (Carga horária: 60 horas)

Análises Volumétricas – Curso Química (UFJF)

Supervisora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Período: Setembro 2013 – Fevereiro de 2014 (Carga horária: 30 horas)

Estágio Supervisionado em Docência

Química Analítica Quantitativa Prática – Curso Farmácia (UNESP / Araraquara)

Supervisora: Profa. Dra. Edilene Cristina Ferreira

Período: Abril 2021 – Agosto de 2021 (Carga horária: 60 horas)

PARTICIPAÇÃO EM BANCA

Participação em banca do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do aluno Marcus Augusto dos Santos Catai, junto ao Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica da UNESP/Araraquara, com o tema: **“Desenvolvimento de reação e calibração de amostradores passivos e ativos para identificação de H₂S em ar ambiente”**, com apresentação no dia 03/03/2021.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1st North American Summer School on Photonic Materials Held Université Laval, Québec, Canadá, 2019.

25th International Congress on Glass (ICG), Boston – MA, USA, 2019.

37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Natal – RN, Brasil, 2014.

XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG, Brasil, 2014.

XIX Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, Brasil, 2013.

XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Ouro Preto – MG, Brasil, 2012.

XVIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, Brasil, 2012.

16º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), Campos do Jordão – SP, Brasil, 2011.

XVII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, Brasil, 2011.

XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Viçosa – MG, Brasil, 2010.

XXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora – MG, Brasil, 2009.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS

LAMARCA, R. S.; DE FARIA, R. A. D.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Development of an optical fiber-based sensor for determination of emerging contaminants in wastewater. 25th International Congress on Glass (ICG), Boston – MA, USA, 2019.

LAMARCA, R. S.; SILVA, F. T. O.; NALIN, M., LIMA GOMES, P. C. F. A low-cost method for carbamazepine determination in pharmaceuticals formulations using image-based method. 42º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Joinville – SC, Brasil, 2019.

MARTINS, G. S.; MARASCO JÚNIOR, C. A.; LUCHIARI, N. C.; **LAMARCA, R. S.;** FONSÊCA, M. C.; DA SILVA, B. F.; LIMA GOMES, P. C. F. Caffeine transformation products formed during wastewater treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry (LASEAC), Bento Gonçalves – RS, Brasil, 2019.

BONJORNO, A. F.; **LAMARCA, R. S.**; LIMA GOMES, P. C. F. Determinação de formaldeído em cosméticos usando dispositivos microfluídicos de baixo custo. VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara – SP, Brasil, 2018.

LAMARCA, R. S.; CARNEIRO, J. C.; VARANDAS, A. A.; RODRIGUES, J. A. S.; MATOS, R. C.; RAMIRO, T. T.; MATOS, M. A. C. Caracterização química de híbridos de sorgo com capim sudão normal e mutante para o gene BMR por HPLC. 37 ° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Natal – RN, Brasil, 2014.

CARNEIRO, J. C.; MATOS, M. A. C.; **LAMARCA, R. S.**; VARANDAS, A. A.; RODRIGUES, J. A. S.; MACHADO, J. C. Avaliação de características químicas de capim sudão (*Sorghum bicolor* cv. Bicolor com *Sorghum bicolor*, cv. Sudanense) normais e mutantes para o gene BMR. XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Salvador – BA, Brasil, 2014.

LAMARCA, R. S.; MATOS, R. C.; MATOS, M. A. C. Otimização de uma metodologia analítica para análise de ácidos fenólicos em amostras de azeite de dendê (*Elaeis guineensis*) por HPLC com detecção simultânea no UV e eletroquímica homemade. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG, Brasil, 2014.

LAMARCA, R. S.; CARNEIRO, J. C.; MATOS, R. C.; ARAUJO, F. M.; MATOS, M. A. C. Determinação dos ácidos acético, butírico, láctico e propiônico em amostras de silagem de capim elefante com Glycine Wightti Verde por HPLC. XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Ouro Preto – MG, Brasil, 2012.

ARAUJO, F. M.; PEREIRA, A. A.; FREITAS-REIS, I.; **LAMARCA, R. S.** Saberes populares: caso da Escola Estadual Delfim Moreira. XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Ouro Preto – MG, Brasil, 2012.

LAMARCA, R. S.; ARAUJO, F. M.; MATOS, R. C.; CARNEIRO, J. C.; RODRIGUES, J. A. S.; MATOS, M. A. C. Determinação dos ácidos ferúlico e p-cumárico em híbridos de sorgo com capim sudão normal e mutante para o gene BMR por HPLC. Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), Campos do Jordão – SP, Brasil, 2011.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

LAMARCA, R. S.; CARNEIRO, J. C.; MATOS, R. C.; ARAUJO, F. M.; MATOS, M. A. C. Determinação dos ácidos acético, butírico, láctico e propiônico em amostras de silagem de capim elefante com Glycine Wightii Verde por HPLC. XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Ouro Preto – MG, Brasil, 2012.

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Pesquisadores criam biossensor que detecta presença de antibiótico nos rios – Entrevista Concedida ao Vivo ao Jornal do Estado de Sergipe em 19/03/21.

Cientistas da Unesp criam sensor que detecta antibióticos em rios e esgotos – Entrevista Concedida ao Vivo à Rádio CBN Araraquara em 19/03/21.

Unesp desenvolve sensor que identifica presença de resíduo de antibiótico na rede de esgoto – Entrevista Concedida à Rede Nacional de Rádio em 29/03/21.

QuimCast #75 - Biossensor detecta presença de antibiótico em rios e esgotos – Entrevista Concedida ao PodCast do Conselho Federal de Química em 19/05/21.

Unesp cria sensor para detectar antibiótico em rios e esgotos – Reportagem Publicada no site “Iq/Unesp” (<https://www.iq.unesp.br/#!/noticia/737/unesp-cria-sensor-para-detectar-antibiotico-em-rios-e-esgotos>)

Instituto de Química da Unesp de Araraquara cria sensor que detecta antibiótico em esgotos - Reportagem Publicada no site “G1 São Carlos e Araraquara” (<https://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/noticia/2021/03/22/instituto-de-quimica-da-unesp-de-araraquara-cria-sensor-que-detecta-antibiotico-em-esgotos.ghtml>)

Sensor de baixo custo para detectar restos de antibiótico na água - Reportagem Publicada no site do Jornal “Estadão” (<https://sao-paulo.estadao.com.br/blogs/blog-da-garoa/sensor-de-baixo-custo-para-detectar-restos-de-antibiotico-na-agua/>)

Instituto de Química da Unesp de Araraquara/SP cria sensor que detecta antibiótico em esgotos - Solução pode ajudar estações de tratamento a identificarem resíduos de remédios que prejudicam o meio ambiente e fazem mal à saúde humana - Reportagem Publicada no site “Portal de Tratamento de Águas” (<https://tratamentodeagua.com.br/unesp-sensor-antibiotico-esgotos/>)

Pesquisadores da Unesp Araraquara criam biossensor que detecta antibiótico em rios - Reportagem Publicada no site “A Cidade On Araraquara” (<https://www.acidadeon.com/araraquara/cotidiano/cidades/NOT,0,0,1592839,pesquisadores-da-unesp-araraquara-criam-biossensor-que-detecta-antibiotico-em-rios.aspx>)

Unesp cria sensor para detectar antibiótico em rios e esgotos - Reportagem Publicada no site “Canal de Notícias, Conteúdos e Rede Profissional em Meio Ambiente, Saúde e Tecnologias da Rede T4H” (<https://ambiental.t4h.com.br/noticias/unesp-cria-sensor-para-detectar-antibiotico-em-rios-e-esgotos/>)

Instrumentação Analítica - Unesp cria sensor para detectar antibiótico em rios e esgotos - Reportagem Publicada no site “Labnetwork” (<https://www.labnetwork.com.br/noticias/unesp-cria-sensor-para-detectar-antibiotico-em-rios-e-esgotos/>)

Instituto de Química da Unesp de Araraquara cria sensor que detecta antibiótico em esgotos - Reportagem Publicada no site “Jornal Agora Cidades” (<https://agoracidades.com/noticia/1514/instituto-de-quimica-da-unesp-de-araraquara-cria-sensor-que-detecta-antibiotico-em-esgotos.html>)

Instituto de Química da Unesp de Araraquara cria sensor que detecta antibiótico em esgotos - Reportagem Publicada no site “São Paulo Jornal” (<https://saopaulojornal.com.br/noticia/1037/instituto-de-quimica-da-unesp-de-araraquara-cria-sensor-que-detecta-antibiotico-em-esgotos.html>)

Instituto de Química da Unesp de Araraquara/SP cria sensor que detecta antibiótico em esgotos - Reportagem Publicada no site “quimiweb” (<https://news.quimiweb.com/instituto-de-quimica-da-unesp-de-araraquara-sp-cria-sensor-que-detecta-antibiotico-em-esgotos-14060.html>)

Unesp cria sensor para detectar antibiótico em rios e esgotos - Reportagem Publicada no site “Sociedade Brasileira de Química” (http://www.s bq.org.br/matogrossosul/riograndesul/para/ambiental/inorganica/parana/analitica/riograndenorte/materiais/paraiba/fisicoquimica/interiorpaulista/maranhao/noticia/unesp-cria-sensor-para-detectar-antibi%C3%B3tico-em-rios-e-esgotos))

Biossensor detecta presença de antibiótico em rios e esgotos - Reportagem Publicada no site do “Conselho Federal de Química” (<http://cfq.org.br/noticia/biossensor-detecta-presenca-de-antibiotico-em-rios-e-esgotos/>)

Dedico este trabalho a Deus, grande autor da minha vida, meus amados pais Lucília e José Rafael, meu irmão Thiago, meu esposo Douglas e *in memoriam* dos tios João Braz e Maria das Graças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado coragem, saúde, força, determinação, e por ter colocado em meu caminho, as pessoas certas nas horas certas.

Aos meus pais Lucília e José Rafael, por todo amor, carinho, encorajamento, e por todos os ensinamentos ao longo de todos esses anos, por terem me ensinado o “Caminho do Bem” e por serem meu porto seguro. É uma honra ser filha de vocês, agradeço a Deus todos os dias por isto.

Ao meu irmão Thiago, pela cumplicidade, carinho, confidencialidade, amor, amizade, por sempre se fazer presente independente da distância que nos separa.

Ao meu esposo Douglas, por todo amor, carinho, cumplicidade, por dividir comigo sonhos, momentos difíceis e desejos de construção de uma família. É um prazer dividir meus dias com você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Clairmont pela receptividade no grupo, pela orientação, amizade, por ter sempre me incentivado e acreditado no meu trabalho. Hoje, vejo que além dos ensinamentos valiosos que você me proporcionou, me inspiro para algum dia ser como você, célebre profissional e excelente pessoa. Me faltam palavras para lhe agradecer por tudo, obrigada!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcelo Nalin, pela amizade, orientação, incentivo, ensinamentos e disposição em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Younès Messaddeq, pela acolhida em seu grupo, pela possibilidade de realização do meu estágio de doutorado na Université Laval e pela concessão da bolsa de pesquisa no Canadá.

Aos amigos de laboratório: Giovana, Natália, César, Mateus, Thaís, Karen e Gabriel pelas conversas e compartilhamento de conhecimentos. Agradeço em especial, a amiga Andressa Bonjorno pela ajuda no início do desenvolvimento do método de análises por imagens digitais.

Aos amigos de outros laboratórios em especial aos amigos Juliana Brito, Juliano Passaretti Filho e Maísa Lázaro pelas descontraídas e proveitosas conversas. Agradeço também ao amigo Rafael Pupin, pela inestimável ajuda na compreensão dos MIPs que foram apresentados no seminário geral.

A minha querida amiga Caroline Varella, obrigada pelas risadas, bons conselhos e pela amizade sincera. Você foi presente do Instituto de Química da UNESP e levarei para sempre nossa amizade.

Ao amigo Ricardo Adriano da UFMG e Université Laval por ter me ensinado sobre biossensores, imobilização de anticorpos e ter ajudado a compreender melhor sobre a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Obrigada também pela amizade sincera e verdadeira que transpôs os limites Québécois.

A equipe de divulgação do Instituto de Química da UNESP, aqui representada pelo jornalista Henrique Fontes, que através de sua formidável divulgação fez com que meu trabalho fosse destaque em diferentes regiões do Brasil.

A Pós-Graduação em Química e ao Instituto de Química da UNESP, por toda infraestrutura e assistência que possibilitaram a concretização deste trabalho. Agradeço também, a equipe da biblioteca, em especial a diretora técnica Valéria Novelli por todo apoio, assistência e ajuda no entendimento das normas da ABNT.

A Université Laval, pela acolhida e possibilidade da realização de uma parte desta tese.

A profa. Dra. Céline Vaneeckhaute da Université Laval pelas amostras de águas residuárias.

Ao técnico especialista da Université Laval, Steeve Morency pelo preparo das fibras ópticas utilizadas nesta tese.

Aos técnicos de laboratório, profissionais administrativos, profissionais da limpeza e portaria do Instituto de Química da UNESP, sempre solícitos em ajudar nas mais diversas situações.

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado, a FAPESP (2016/03369-3 e 2018/22393-8), ao CNPq e INCT-DATREM (14/50945-4) pelos financiamentos.

A banca por ter aceitado o convite de participar da defesa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação, obrigada por tudo!

“Vocês não podem esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar na sua própria melhora”. (Marie Curie)

RESUMO

O desenvolvimento de dispositivos para análise rápida, e que consuma volumes reduzidos de reagentes e solventes, em consonância com os conceitos de química analítica verde, vêm sendo tema de diversos estudos nas últimas décadas. Neste contexto, esses dispositivos se destacam, por oferecerem resultados equivalentes aos equipamentos de bancada, além de atenderem as demais prerrogativas supracitadas. Nesta tese foram desenvolvidos diferentes dispositivos de análise rápida para determinação de compostos farmacêuticos em amostras ambientais e farmacêuticas. Na primeira parte foram desenvolvidos dispositivos de análises rápidas para determinação de formaldeído, carbamazepina (CBZ), ciprofloxacina (CIP) e norfloxacina (NOR) em formulações farmacêuticas e produtos cosméticos usando imagens digitais captadas por smartphone. Para a determinação de formaldeído foram obtidos limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de 0,200 mg kg⁻¹ e 0,500 mg kg⁻¹, respectivamente. Já para os fármacos, os LD e LQ variaram respectivamente de 3,00 mg L⁻¹ e 5,00 mg L⁻¹ para CBZ; 1,00 mg L⁻¹ e 3,00 mg L⁻¹ para NOR e 1,00 mg L⁻¹ e 3,00 mg L⁻¹ para CIP. As concentrações determinadas nas formulações cosméticas e farmacêuticas foram comparadas por espectrofotometria, e não foram evidenciadas diferenças significativas entre os resultados obtidos. O uso de imagens digitais mostrou-se uma alternativa eficaz, apresentando baixo custo, reduzido volume de amostra e reagentes (8,00 µL requerida para as análises), e com elevado potencial para implementação em laboratórios com limitados recursos para pesquisas. Na segunda parte deste trabalho, desenvolveram-se dois diferentes imunossensores para a determinação de ciprofloxacina em amostras de águas residuárias. Para o imunossensor impedimétrico, na superfície do eletrodo SPCE, foram imobilizados anticorpos anti-CIP para a determinação de CIP nas amostras. Neste imunossensor, foram obtidos respectivamente, LD e LQ de 1,00 x 10⁻⁷ µg mL⁻¹ e 1,00 x 10⁻⁵ µg mL⁻¹. A concentração determinada na amostra de água residuária foi 2,90 x 10⁻⁴ µg mL⁻¹. A recuperação obtida nas amostras utilizando o imunossensor foi de 97 %, utilizando apenas 30,0 µL de amostra. E por fim, foi desenvolvido um imunossensor baseado em fibras ópticas de sílica para a determinação de ciprofloxacina em amostras de águas residuárias. A superfície da fibra óptica foi funcionalizada com um material polimérico condutor e sobre este foi imobilizado anticorpos anti-CIP. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de CIP nas águas residuárias, obtendo concentrações de 267 e 549 ng L⁻¹, recuperação de 91 %, limites de detecção e quantificação de 3,30 x 10⁻³ ng L⁻¹ e 1,00 x 10⁻² ng L⁻¹, respectivamente, com uso de apenas 5,00 mL de amostra.

Palavras-Chave: Dispositivos de análise rápida. Imagens digitais. Imunossensores. Compostos farmacêuticos. Águas residuárias.

ABSTRACT

The development of device which permits fast analysis requiring low consumption of reagents and solvents and in agreement with green analytical chemistry has been researched in recent decades. Moreover, rapid analysis devices highlight, since they offer results equivalent compared to benchtop equipment. In this thesis different rapid analysis devices were developed for determination of pharmaceuticals compounds present in environmental samples and pharmaceutical formulations. In the first part, rapid analysis devices were developed for the determination of formaldehyde, carbamazepine (CBZ), ciprofloxacin (CIP) and norfloxacin (NOR) in pharmaceutical formulations and cosmetic products using digital images captured by smartphone. For the determination of formaldehyde in cosmetic products achieved LD and LQ of 0.200 mg kg^{-1} and 0.500 mg kg^{-1} , respectively. The method for CBZ, CIP and NOR present in pharmaceuticals products achieved LD and LQ ranged respectively from 3.00 mg L^{-1} and 5.00 mg L^{-1} for CBZ; 1.00 mg L^{-1} and 3.00 mg L^{-1} for NOR and 1.00 mg L^{-1} and 3.00 mg L^{-1} for CIP. The concentrations determined in the cosmetic and pharmaceutical formulations were compared by spectrophotometric, and no significant differences were evidenced between the results obtained. The use of digital images proved to be an effective alternative, environmentally friendly, low cost requiring low sample volume and reagents ($8.00 \text{ }\mu\text{L}$) and with high potential for implementation in different laboratories with limited resources for research. In the second part of this thesis, two different immunosensors were developed for the determination of ciprofloxacin in wastewater samples. For the impedimetric immunosensor, on the SPCE electrode surface an anti-CIP antibodies were immobilized for the determination of CIP in the samples. In this immunosensor, LD and LQ of $1.00 \times 10^{-7} \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.00 \times 10^{-5} \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ were obtained, respectively. The concentration determined in the wastewater sample was $2.90 \times 10^{-4} \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. The recovery obtained in the samples using the immunosensor was 97% recovery using only $30.0 \text{ }\mu\text{L}$ of sample. Finally, an immunosensor based on silica fiber optics was developed for the determination of ciprofloxacin in wastewater samples. A conductive polymeric material was functionalized over the optical fiber and anti-CIP antibodies were immobilized on the optical fiber surface. The method developed was applied in the determination of CIP in wastewater obtaining concentrations of 267 and 549 ng L^{-1} , recovery of 91%, LD and LQ limits of $3.30 \times 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$ and $1.00 \times 10^{-2} \text{ ng L}^{-1}$, respectively, using only 5.00 mL of sample.

Keywords: Rapid analysis devices. Digital images. Immunosensors. Pharmaceutical compounds. Wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do sistema de extração usado em GDME	40
Figura 2 - Estrutura plana dos fármacos: (A) Carbamazepina, (B) Ciprofloxacina e (C) Norfloxacin	43
Figura 3 - Fluxograma da entrada dos CEs em diferentes compartimentos ambientais	45
Figura 4 - (A) Foto original, e decomposição pelos três canais RGB; (B) Canal R; (C) Canal G; (D) Canal B	55
Figura 5 - Tipos de reflexão sobre a superfície de um material: (A) Reflexão especular; (B) Reflexão difusa após o feixe atingir um spot-test com reação colorimétrica.....	56
Figura 6 - Representação de circuitos elétricos equivalentes. (A) Célula eletroquímica simples; (B) Reação Faradaica no eletrodo demonstrada pela impedância Z_f ; (C) Processo difusional representado pela impedância de Warburg (Z_w). Este circuito é comumente conhecido como modelo de Randles	63
Figura 7 - Representação das diferentes formas de impedância complexa em função da frequência; (A) Diagrama de Nyquist (plano complexo) e (B) Diagrama de Bode (em função do módulo da impedância e do ângulo de fase).....	65
Figura 8 - Esquema da interação ocorrida na interface eletrodo/solução.....	68
Figura 9 - Desenho de uma fibra óptica em corte vertical apresentando as estruturas da fibra.....	69
Figura 10 - A) Princípio da reflexão interna total, sendo $\theta_i > \theta_c$; B) Reflexão interna total dentro da fibra óptica, sendo $n_1 > n_2$	72
Figura 11 - Representação das fibras ópticas: A) Multimodo; B) Monomodo	74
Figura 12 - Spot-test e suporte usados na captação das imagens digitais	106
Figura 13 - (A) Projeto da caixa utilizada para manutenção da luminosidade durante a captura das imagens digitais; (B) Destaque do spot-test inserido na parte central da caixa	107
Figura 14 - Sistema utilizado na GDME aplicado na determinação de formaldeído..	109
Figura 15 - Otimização de extração de formaldeído usando a GDME e derivatização com acetilcetona. (A) Extração térmica; (B) Extração em ultrassom; (C) Tempo de extração usando ultrassom	112
Figura 16 - (A) Spot-test contendo a curva analítica obtida para o formaldeído usando imagens digitais e extração por GDME na concentração de 0,500 a 10,0 mg kg ⁻¹ ; (B)	

Seleção do canal B feito no software ImageJ para obtenção do sinal analítico; (C) Região de interesse (ROI) presente em cada poço do spot-test e usada para obtenção do sinal analítico	113
Figura 17 - Proposta de reação entre formaldeído e acetilcetona em presença de sais de amônio	115
Figura 18 - Curvas analíticas obtidas para o formaldeído com detecção por: (A) Espectrofotometria; (B) Smartphone.....	116
Figura 19 - Teste de interferência envolvendo as reações com cloreto férrico (A) e Ácido cloranílico (B), com a NOR e a CIP	131
Figura 20 - A, C, E) Imagens capturadas pelo smartphone referentes a CBZ, CIP e NOR, respectivamente. O poço central (número do ponto 1) refere-se ao branco e o número do ponto 2 a 9 refere-se à curva analítica (CBZ 5,00 a 60,0 mg L ⁻¹ ; CIP 3,00 a 35,0 mg L ⁻¹ ; e NOR 3,00 a 40,0 mg L ⁻¹); B, D, F) Região de interesse (ROI), selecionada para extrair os valores dos canais RGB usados como sinal analítico	132
Figura 21 - Proposta de reação para cada fármaco estudado: (A) Reação entre CBZ e alaranjado de metila em tampão biftalato de potássio; (B) Reação entre CIP e cloreto férrico; (C) Reação entre NOR e ácido cloranílico	133
Figura 22 - Fotografia da célula eletroquímica usada para as análises por EIE	146
Figura 23 - Eletrodo SPCE utilizado nas análises por EIE	147
Figura 24 - Esquema resumido das etapas de funcionalização do eletrodo	148
Figura 25 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE não recoberto (linha vermelha); modificado por EDC/NHS, representado pela linha cinza; EDC/NHS/ anti-CIP, representado pela linha verde; EDC/NHS/anti-CIP/etanolamina, representado pela linha preta, em solução de 0,100 mol L ⁻¹ de KCl, 5,00 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em 1,00 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ de tampão PBS (pH 7,4). A velocidade de varredura utilizada foi de 50 mV s ⁻¹ na faixa de -0,7 a +0,8 V <i>versus</i> Ag/AgCl; B) Diagramas de Nyquist na faixa de frequência de 10.000 a 0,1 Hz e amplitude de 10 mV	153
Figura 26 - (A) Espectro FTIR para o eletrodo não recoberto, anticorpo anti-CIP em solução de 1,00 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ de tampão PBS (pH 7,4), e eletrodo após a imobilização com (EDC/NHS/IgG em tampão PBS/Etanolamina). Imagens de AFM; (B) Eletrodo não recoberto; e (C) Eletrodo após a imobilização	155
Figura 27 -Variação do potencial de circuito aberto em função do tempo com o respectivo imunossensor imerso em KCl e par redox, ambos preparados em tampão PBS	156

Figura 28 - Curvas obtidas pela Transformada de K-K e pela medição experimental de EIE representada em Diagramas de Bode para o ângulo de fase utilizando eletrodo sem imobilização e o imunossensor em presença de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS.....	157
Figura 29 - Diagramas de Nyquist para as medidas de impedância de CIP na faixa de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. O circuito elétrico equivalente encontra-se inserido na figura	160
Figura 30 - Curva analítica obtida pela fortificação de CIP em esgoto lab-made na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	162
Figura 31 - Resposta do imunossensor na presença de possíveis interferentes como CBZ, NOR e VLF	163
Figura 32 - Representação do sistema utilizado para captura das ondas evanescentes	174
Figura 33 - Imagem da fibra dobrada em “U” evidenciando o raio de curvatura	176
Figura 34 - Etapas de funcionalização da fibra óptica. (I) Adição da solução de persulfato de amônio e anilina (1:1, preparados em solução de HCl $0,100 \text{ mol L}^{-1}$) sobre a área com polímero removido; (II) oxidação da anilina a polianilina após 5 min; e (III) formação da fase condutora sal de esmeraldina	177
Figura 35 - Foto do imunossensor após todas as etapas de funcionalização, com destaque para a área funcionalizada	178
Figura 36 - Foto das amostras coletadas na estação de tratamento experimental da Université Laval	181
Figura 37 - Intensidade de sinal necessária para estabilizar o sinal do LED	183
Figura 38 - Tempo de incubação necessário para proporcionar a melhor absorbância	183
Figura 39 - Imagem obtida por MEV de uma porção do imunossensor desenvolvido (mag. 498 x).....	184
Figura 40 - MEV das etapas de funcionalização da fibra: (A) Fibra óptica sem o revestimento (mag. 9.945 x); (B) PANI depositada na fibra (mag. 49.750 x); (C) Espessura do filme de PANI depositada sobre a fibra (mag. 49.750 x); (D) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (mag. 49.750 x); (E) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + caseína (mag. 49.750 x); (F) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + caseína + analito (mag. 49.750 x)	185
Figura 41 - Espectros Raman normalizados de ciprofloxacina (CIP) sólida ($\geq 98 \%$) (linha preta); fibra óptica de sílica não-funcionalizada (linha verde); fibra óptica de sílica funcionalizada com polianilina (PANI) (linha vermelha) e imunossensor aplicado na	

análise de solução contendo CIP a $10,0 \text{ ng L}^{-1}$ em esgoto lab-made (linha azul) utilizando o laser 785 nm	187
Figura 42 - (A) Espectros de absorção da CIP na faixa de 400 a 700 nm obtidos na faixa linear de $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$; (B) Curva analítica obtida para CIP na faixa $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$ preparada em esgoto lab-made	189
Figura 43 - Resposta do imunossensor em esgoto lab-made para os fármacos CIP, NOR, CBZ, VLF e FLX na concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ e $1,00 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$	192

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Técnicas usadas para determinação dos fármacos em amostras ambientais e formulações farmacêuticas	47
Quadro 2 - Dispositivos miniaturizados para aplicações em análises químicas e bioquímicas.....	51
Quadro 3 - Correlação estabelecida entre os processos físicos e o elemento de circuito elétrico	62
Quadro 4 - Estrutura e condutividade dos principais polímeros condutores ^{132, 133}	80
Quadro 5 - Polianilina em diferentes estados de oxidação ¹³³	82
Quadro 6 - Determinação de formaldeído em amostras de PCPs	117
Quadro 7 - Principais técnicas utilizadas para análise de CIP em diferentes tipos de amostras	164
Quadro 8 - Comparação do método desenvolvido com outros métodos previamente publicados.....	191

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da CBZ, CIP e NOR ^{32, 33}	43
Tabela 2 - Dados obtidos referentes aos parâmetros das figuras de mérito do método	114
Tabela 3 - Comparação de diferentes métodos aplicados na análise de formaldeído em PCPs	117
Tabela 4 - Dados obtidos pela análise de variância (ANOVA) para os métodos utilizando imagens digitais e espectrofotometria	134
Tabela 5 - Dados obtidos referentes aos parâmetros das figuras de mérito do método	134
Tabela 6 - Aplicações dos métodos na determinação de CBZ, CIP e NOR presentes nas formulações farmacêuticas	137
Tabela 7 - Comparação dos dados obtidos com dados previamente publicados.....	138
Tabela 8 - Componentes presentes na solução de esgoto lab-made	150
Tabela 9 - Figuras de mérito obtidas para análises das amostras de águas residuárias usando imunossensor e o método adotado como referência (EIE).....	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS: Acrilonitrila butadieno estireno

AFM: Microscopia de força atômica

ANA: Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: Análise de variância

ATR-FTIR: Reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier

C: Concentração da espécie química

C_a: Capacitâncias do antígeno

CA: Corrente alternada

C_b: Capacitâncias do anticorpo

CBZ: Carbamazepina

CC: Corrente contínua

C_{dc}: Capacitância da dupla camada elétrica

CEs: Contaminantes emergentes

CIE XYZ: *Commission Internationale de L'éclairage*

CIP: Ciprofloxacina

CMOS: Fotodiodo semicondutor de óxido metálico complementar

CMYK: Ciano, magenta, amarelo, preto

COEs: Contaminantes orgânicos emergentes

CPE: Elemento de fase constante

D: Espessura da camada dielétrica

dB: Decibel

DMDM: Dimetil dimetil

DPR: Desvio padrão relativo

DU: Diazolidinil ureia

EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ETEs: Estações de tratamento de esgoto

FQs: Fluoroquinolonas

FLX: Fluoxetina

GD: Difusão gasosa

GDME: Microextração por difusão gasosa

HDR: Alto alcance dinâmico

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HSV: Tonalidade Cromática, saturação e luminância

IARC: Agência de Proteção de Pesquisa sobre o Câncer

ICC: *International Color Consortium*

IgG: Imunoglobulina G

IU: Imidazolidinil ureia

K_{ow}: Coeficiente de partição octanol/água

L: Caminho óptico

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

Mag.: Magnificação

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MIP: Polímero de impressão molecular

MS/MS: Espectrometria de massas sequencial

NOR: Norfloxacin

PCA: Potencial de circuito aberto

OMS: Organização Mundial da Saúde

PANI: Polianilina

PCPs: Produtos de higiene e cuidado pessoal

PBS: Tampão fosfato salino

PLA: Polímero em ácido polilático

QToF: Quadrupolo com tempo de voo

R_{tc}: Resistência à transferência de carga

R_e: Resistência do eletrólito

RGB: Vermelho, verde, azul

RMS: Raiz quadrada média

ROI: Região de interesse

SPCE: Eletrodo impresso de carbono

SPE: Extração em fase sólida

TSL: Teoria de sistemas lineares

UHPLC: Ultra cromatografia líquida de alta eficiência

US EPA: *United States - Environmental Protection Agency*

UV: Ultravioleta

VC: Voltametria cíclica

VLF: Venlafaxina

Z: Impedância elétrica

Z_w: Impedância de Warburg

μPADs: Microdispositivos baseado em papel

LISTA DE SÍMBOLOS

I : Intensidade da radiação

I_0 : Intensidade da radiação do branco analítico

n : Índice de refração

Δ : Variação

ϵ : Permissividade

θ_i : Ângulo de incidência

λ : Comprimento de onda

χ^2 : Qui-drado

ω : Frequência angular

ϕ : Ângulo de fase

Φ : Eficiência quântica

ϵ : Coeficiente de absorvidade molar

θ_t : Ângulo de refração

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	37
	INTRODUÇÃO GERAL	37
1.1	FORMALDEÍDO EM AMOSTRAS DE PRODUTOS DE CUIDADO PESSOAL	37
1.2	PREPARO DE AMOSTRA	38
1.2.1	<i>Microextração por difusão gasosa para extração de formaldeído em amostras de produtos de higiene e cuidado pessoal.....</i>	<i>38</i>
1.3	CONTAMINANTES EMERGENTES	40
1.4	PRINCIPAIS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, CIPROFLOXACINA E NORFLOXACINA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.....	46
1.5	DISPOSITIVOS DE ANÁLISES RÁPIDAS	49
1.6	IMAGENS DIGITAIS.....	53
1.7	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	59
1.8	REPRESENTAÇÕES DOS RESULTADOS GERADOS POR EIE.....	63
1.9	PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SUPERFÍCIES	66
1.9.1	<i>Uso da impedância em sistemas biológicos</i>	<i>67</i>
1.10	FIBRAS ÓPTICAS	69
1.10.1	<i>Princípios de funcionamento das fibras ópticas</i>	<i>70</i>
1.10.2	<i>Modos de propagação em fibras ópticas.....</i>	<i>73</i>
1.10.3	<i>Sensores baseados em fibras ópticas</i>	<i>74</i>
1.10.4	<i>Princípios ópticos envolvidos nos sensores químicos</i>	<i>76</i>
1.10.5	<i>Sensores em formato “U”</i>	<i>77</i>
1.10.6	<i>Imobilização de reagentes em fibras ópticas</i>	<i>78</i>
1.10.7	<i>Materiais poliméricos imobilizados em fibras ópticas.....</i>	<i>79</i>

1.11	FIGURAS DE MÉRITO OU DE QUALIDADE DE UM MÉTODO DE ANÁLISE	83
1.11.1	<i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i>	83
1.11.2	<i>Precisão intra e inter-dia</i>	84
1.11.3	<i>Linearidade e Faixa de Trabalho</i>	84
1.11.4	<i>Recuperação</i>	85
1.11.5	<i>Avaliação do método</i>	86
	Referências	87
2	CAPÍTULO 2	104
	DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM COSMÉTICOS	104
2.1	INTRODUÇÃO	104
2.2	OBJETIVOS	105
2.3	PARTE EXPERIMENTAL	105
2.3.1	<i>Instrumentação</i>	105
2.3.2	<i>Reagentes e soluções</i>	107
2.3.3	<i>Aplicação do método desenvolvido nas formulações cosméticas</i>	108
2.3.4	<i>Determinação de formaldeído em amostras de produtos de cuidado pessoal</i>	108
2.3.5	<i>Figuras de mérito do método desenvolvido para determinação de formaldeído</i>	109
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	110
2.4.1	<i>Otimização das condições de extração do formaldeído</i>	110
2.4.2	<i>Figuras de mérito do método</i>	112
2.4.3	<i>Determinação de formaldeído nas amostras de produtos de cuidado pessoal</i>	116
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
	Referências	119
3	CAPÍTULO 3	123
	DETERMINAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, CIPROFLOXACINA E NORFLOXACINA EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS	123

3.1	INTRODUÇÃO.....	123
3.2	OBJETIVOS.....	124
3.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	125
3.3.1	<i>Instrumentação</i>	125
3.3.2	<i>Reagentes e soluções</i>	125
3.3.3	<i>Aplicação do método desenvolvido nas formulações farmacêuticas</i>	125
3.3.4	<i>Reações colorimétricas aplicadas na determinação dos fármacos CBZ, CIP e NOR em formulações farmacêuticas</i>	126
3.3.5	<i>Aplicações dos métodos colorimétricos</i>	127
3.3.6	<i>Figuras de mérito do método desenvolvido.....</i>	128
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	129
3.4.1	<i>Reações colorimétricas aplicadas</i>	129
3.4.2	<i>Determinação da CBZ, CIP e NOR nas formulações farmacêuticas.....</i>	136
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
	Referências	140
4	CAPÍTULO 4.....	144
	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO LABEL-FREE PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	144
4.1	INTRODUÇÃO.....	144
4.2	OBJETIVOS.....	145
4.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	145
4.3.1	<i>Instrumentação</i>	145
4.3.2	<i>Reagentes e soluções</i>	146
4.3.3	<i>Funcionalização do eletrodo SPCE</i>	147
4.3.4	<i>Caracterização morfológica e espectroscópica do imunossensor</i>	148
4.3.5	<i>Análises por EIE</i>	149
4.3.6	<i>Figuras de mérito do método.....</i>	149

4.3.7	<i>Aplicação do método desenvolvido na determinação de CIP em águas residuárias</i>	150
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	151
4.4.1	<i>Comportamento eletroquímico</i>	151
4.4.2	<i>Caracterização morfológica e espectroscópica do imunossensor</i>	154
4.4.3	<i>Validação da EIE</i>	156
4.4.4	<i>Avaliação da detecção de CIP</i>	158
4.4.5	<i>Figuras de mérito do método desenvolvido</i>	160
4.4.6	<i>Estudo da seletividade do imunossensor</i>	162
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	165
	Referências	166
5	CAPÍTULO 5	172
	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR LABEL-FREE BASEADO EM FIBRAS ÓPTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS	172
5.1	INTRODUÇÃO	172
5.2	OBJETIVOS	173
5.3	PARTE EXPERIMENTAL	173
5.3.1	<i>Instrumentação</i>	173
5.3.2	<i>Reagentes e soluções</i>	174
5.3.3	<i>Preparo dos imunossensores</i>	175
5.3.4	<i>Caracterização do imunossensor</i>	179
5.3.5	<i>Figuras de mérito do método desenvolvido</i>	179
5.3.6	<i>Aplicação do método desenvolvido nas análises de águas residuárias</i>	180
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	182
5.4.1	<i>Avaliação dos parâmetros do imunossensor</i>	182
5.4.2	<i>Caracterização do imunossensor</i>	184
5.4.3	<i>Figuras de mérito do método desenvolvido</i>	187

5.4.4	<i>Seletividade do imunossensor</i>	192
5.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	193
	Referências	194
6	CAPÍTULO 6	199
	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	199
	APÊNDICES DAS AUTORIZAÇÕES PARA USO DE FIGURAS E	
	TABELAS	200

PREFÁCIO

Esta tese apresenta o desenvolvimento de dispositivos analíticos aplicados em análises rápidas com o objetivo de determinar formaldeído, carbamazepina, ciprofloxacina e norfloxacina em amostras ambientais e farmacêuticas.

Este estudo, para melhor compreensão, foi dividido em Capítulos.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão geral da literatura científica, sobre os temas que serão abordados, bem como, apresentado de forma detalhada todos os conceitos necessários para o entendimento das técnicas de análises utilizadas.

O Capítulo 2 descreve o desenvolvimento de um dispositivo de análise rápida para a determinação de formaldeído em cosméticos.

O Capítulo 3 descreve o desenvolvimento de um dispositivo de análise rápida para a determinação de carbamazepina, ciprofloxacina e norfloxacina em formulações farmacêuticas.

Os Capítulos 4 e 5 são resultados de um estágio de doutorado realizado na Université Laval, localizada em Québec - Canadá, durante um ano, onde foram desenvolvidos imunossensores labels-free para análises do contaminante emergente ciprofloxacina em amostras de águas residuárias.

O Capítulo 6 descreve as conclusões gerais e perspectivas futuras.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FORMALDEÍDO EM AMOSTRAS DE PRODUTOS DE CUIDADO PESSOAL

O formaldeído, um composto altamente reativo, solúvel em água, acetona e etanol, tem sido frequentemente utilizado nas indústrias de bens de consumo, seja na produção de vários tipos de resina, plásticos e produtos à base de madeira, ou até como conservante, na indústria farmacêutica. Pode ser adicionado aos produtos de higiene pessoal e cosméticos, como forma de preservar a formulação, e ao mesmo tempo inibir o crescimento bacteriano e fúngico, apesar de ser considerado um produto tóxico, corrosivo, irritante, podendo ocasionar sérios problemas de saúde.^{1,2}

Segundo a Agência de Proteção de Pesquisa sobre o Câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC), o formaldeído é considerado uma substância alergênica para uma grande parcela da população, e a exposição a este composto pode ocasionar, dermatite de contato e asma.³ Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA), classifica o formaldeído como provável carcinogênico humano.⁴

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da resolução RDC 15/2013, regulamenta a utilização do formaldeído como conservante, a concentração máxima permitida é de 0,2 % (2.000 mg kg⁻¹), sendo que, em concentração superior a 0,05 % (500 mg kg⁻¹), deve ser escrito na embalagem a frase “contém formaldeído”.⁵

Normalmente, o formaldeído não é adicionado diretamente nos produtos de higiene e cuidado pessoal (PCPs). Alguns conservantes, geram o formaldeído ao conservar e estabilizar os PCPs cosméticos durante o período de sua validade, além de prevenir o crescimento de microrganismos.^{6,7}

Alguns exemplos de conservantes que desempenham esse papel e que são adicionados a shampoos, condicionadores, géis de banho e sabonetes líquidos são o quaternium 15, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano (Bronidox), dimetil dimetil hidantoína

(DMDM hidantoína), 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol), imidazolidinil ureia (IU) e diazolidinil ureia (DU).¹

Desta forma, a determinação de formaldeído em PCPs é de fundamental importância, para evitar reações adversas oriundas do uso desses produtos que são abundantemente usados pela população diariamente.

1.2 PREPARO DE AMOSTRA

Para a determinação de formaldeído em formulações cosméticas, foi empregada a Microextração por Difusão Gasosa, que será descrita em detalhes no tópico abaixo.

1.2.1 Microextração por difusão gasosa para extração de formaldeído em amostras de produtos de higiene e cuidado pessoal

Nas últimas décadas, foi verificado um aumento significativo no desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas de análise, desenvolvendo novos métodos utilizando um menor volume de reagentes, além de obter respostas analíticas extremamente rápidas.⁸ Estas melhorias, também estimularam que a etapa de preparo de amostras fosse miniaturizada, para acelerar o processo extrativo e reduzir o volume de reagentes, dispensando técnicas com etapas longas de preparo de amostras, como extração por Soxhlet, extração convencional líquido-líquido (LLE) e extração convencional em fase sólida (SPE).⁸

Em conjunto com a extração do analito, observa-se a necessidade da realização de modificações químicas, tal como a derivatização, como forma de melhorar a detecção e/ou separação do analito do restante da amostra. Como alternativa às técnicas citadas anteriormente, vêm sendo estudada a viabilização da utilização de membranas impregnadas com solventes para a extração de espécies químicas de interesses variados. Uma dessas alternativas é o uso da extração por membranas poliméricas. Nesta, separa-

se o analito do restante da amostra por meio do uso de uma membrana permeável a gases (GD).⁹ Essa técnica sofreu um aprimoramento, foram reduzidos os volumes dos reagentes utilizados na fase extratora sendo denominada como Microextração por Difusão Gasosa (GDME).

A GDME apresenta algumas vantagens como, a possibilidade de extração direta tanto para analitos voláteis como semi-voláteis, em amostra de natureza líquida ou sólida.¹⁰

A GDME, consiste na transferência do analito presente na amostra (também conhecida como fase doadora), para uma fase, normalmente líquida, denominada fase aceptora que está presente sobre uma membrana que é permeável. Essa transferência de massa, baseia-se no equilíbrio que ocorre do analito presente na fase doadora, e o *headspace*.¹⁰ A permeabilidade do analito na forma gasosa, permite atravessar a membrana que possui finos espaços de ar em seus poros, permitindo que os analitos difundam-se por ela sem dificuldades.¹⁰

No entanto, como forma de aperfeiçoar ainda mais essa técnica, pode-se adicionar um agente derivatizante na solução aceptora, promovendo a detectabilidade do analito.¹¹ Os processos que envolvem a derivatização, são uma forma eficaz e inteligente de melhorar a susceptibilidade dos analitos a serem quantificados, uma vez que envolve uma reação entre a espécie de interesse com um agente derivatizante, produzindo um derivatizado.¹²

Geralmente para a extração da espécie de interesse, o aquecimento do frasco contendo a amostra é necessário para que ocorra a volatilização do analito de interesse.¹³ Alguns fatores afetam de forma direta a eficiência da extração, sendo: volume de amostra; tempo e temperatura de aquecimento; além do pH, força iônica e efeito *salting out*, sendo imprescindível o controle e otimização destes parâmetros.¹³

O sistema de extração consiste em um frasco extrator, também conhecido como módulo GDME, uma solução aceptora, uma membrana permeável a gases e um banho termostaticado. Uma demonstração do esquema de extração, encontra-se ilustrado na Figura 1.

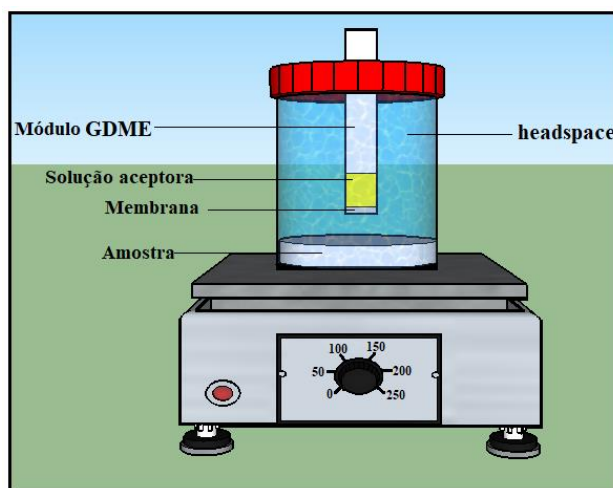


Figura 1- Ilustração do sistema de extração usado em GDME

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

1.3 CONTAMINANTES EMERGENTES

Nos últimos anos, foi evidenciado um rápido crescimento demográfico, o que ocasionou o aumento da utilização de produtos de higiene pessoal, e produtos farmacêuticos como forma de zelar pela saúde e bem-estar dos indivíduos. Estes produtos, após a sua utilização, podem contaminar águas residuárias, sendo estas, fontes de contaminação de corpos hídricos.¹⁴

As águas residuárias podem ser definidas como qualquer água escoada por sistemas de águas pluviais, tais como esgoto doméstico, industrial ou comercial ou qualquer outra combinação destes. O volume e tipo dessas águas residuárias, são delineados pelo número de indivíduos da população, atividade doméstica, industrial ou recreativa. Nesta vertente as águas residuárias urbanas caracterizam-se pela combinação de águas residuárias domésticas e industriais, bem como a infiltração de esgotos circundantes e até a água da chuva.¹⁵

Nas águas residuárias, rotineiramente são identificadas substâncias conhecidas, como contaminantes emergentes (CEs) ou contaminantes orgânicos emergentes (COEs). Estes CEs incluem hormônios, pesticidas ou praguicidas, surfactantes, antibióticos, anti-inflamatórios, protetores solar, diuréticos, beta-bloqueadores, retardante de chama,

detergentes, desinfetantes e produtos de higiene pessoal, sendo encontrados em corpos hídricos na faixa de concentrações de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$.¹⁶ A biomagnificação e a susceptibilidade com que estes compostos difundem-se facilmente até as matrizes aquáticas, está relacionado com as propriedades físico-químicas dos compostos, tais como, coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), constante de ionização ácida (K_a) e pH do meio, além de fatores ambientais e as condições climáticas.¹⁷

Alguns exemplos de CEs amplamente presentes em corpos hídricos são os produtos farmacêuticos. Estes acabam entrando no meio ambiente por duas principais rotas, sendo a primeira, por inclusão em lixões, o que pode ser facilmente evitável, pela conscientização do descarte apropriado. A segunda rota, via fezes e urina de humanos e animais.¹⁷ Atualmente milhares de toneladas de produtos farmacêuticos são usados anualmente em todo o mundo.¹⁸

Como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por diversos produtos farmacêuticos, tem sido considerada por muitos países como um problema ambiental de total relevância, alguns países desenvolveram um programa de pesquisa, exclusivo para tal tema, conhecido como “*Pharmaceuticals in the Environment*”.¹⁷

Exemplos de produtos farmacêuticos comumente presentes em matrizes ambientais são: norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP) e carbamazepina (CBZ), cujas informações químicas são apresentadas na Tabela 1.

A CBZ, representada na Figura 2A), é um antiepiléptico comumente prescrito para tratamento de epilepsia, tanto em crianças como adultos, também usado em doenças psiquiátrica e para o tratamento da neuralgia do trigêmeo.¹⁹⁻²¹ O seu consumo mundial é estimado em mais de 1.000 toneladas por ano.¹⁴ Por ser um produto farmacêutico, sintético e frequentemente detectado em águas residuárias, água potável, águas superficiais e por apresentar alta resistência a biodegradação nas estações de tratamento de esgoto (ETEs), esse é considerado um marcador antropogênico.²²

Outra classe de CEs encontrado em corpos hídricos são os antibióticos. Desde a sua descoberta na década de 1930, os antibióticos são usados como forma de terapia tratando diversos tipos de infecções.^{23,24}

Dentre os antibióticos de amplo espectro administrado para o tratamento de infecções bacterianas, uma classe merece destaque, a classe em questão é da família das

fluoroquinolonas (FQs). Introduzidos como objeto de tratamento pela primeira vez em 1980, os antibióticos das FQs se tornaram rapidamente uma das classes mais populares de antibióticos.²⁵ Por apresentarem um átomo de flúor em sua estrutura, esses antibióticos apresentam alta resistência e persistência ambiental e biológica.^{26,27}

Como representantes dessa classe de antibióticos destaca-se a ciprofloxacina (CIP) e a norfloxacina (NOR), representadas pelas Figuras 2B) e 2C). Tanto a CIP quanto a NOR são antibióticos da segunda geração das fluoroquinolonas, e consideradas de amplo espectro, e utilizadas tanto na terapia humana quanto veterinária.²⁸

A CIP geralmente é usada no tratamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo administrada também para tratamento de infecções de tecidos moles, infecções bacterianas, doenças sexualmente transmissíveis e sinusite. Este fármaco apresenta biodisponibilidade absoluta de 70 – 80 %, e excreção na forma não metabolizada via urina e fezes, são respectivamente, 44,7 % e 25,0 %, e aproximadamente 20 % sob a forma de quatro metabólitos (desetilenociprofloxacino, sulfociprofloxacino, oxociprofloxacino e formilciprofloxacino).²⁹

Já a NOR, similarmente à CIP, também usada no tratamento de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, para o tratamento de infecções do trato urinário, prostatite, infecções do trato genital, gonorreia, além de ser utilizada na pecuária e avicultura.³⁰ A NOR, apresenta uma biodisponibilidade absoluta de 30 – 40 %, cerca de 26 – 32 % é excretada na urina, 30 % é excretada pelas fezes, além da excreção de 5 – 8 % sob a forma de seis metabólitos ativos de menor potencial antimicrobiano.³¹

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da CBZ, CIP e NOR^{32, 33}

Composto	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade		
			em H ₂ O a 25 °C (g L ⁻¹) ^a	^b pKa	^b log k _{ow}
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,27	0,220	13,9	2,45
Ciprofloxacina	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331,34	0,0430	6,09; 8,74	0,280
Norfloxacina	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319,33	0,140	6,34; 8,75	0,460

Dado:

K_{ow} refere-se ao coeficiente de partição octanol-água,

pKa refere-se a constante de ionização ácida,

^a Fonte de dados pubchem,

^b Fonte de dados SciFinder.

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

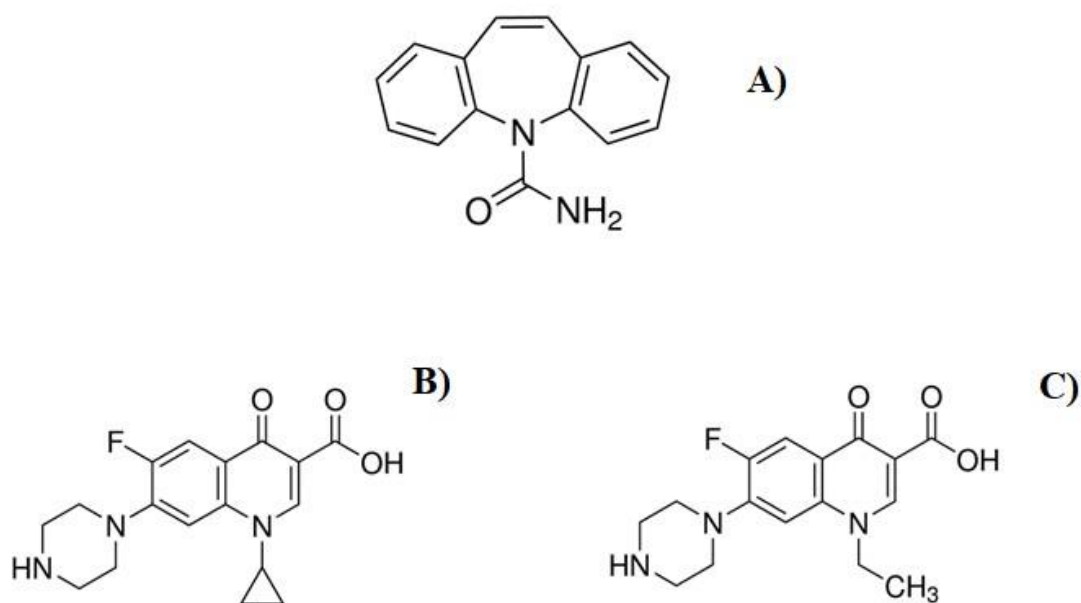


Figura 2 - Estrutura plana dos fármacos: (A) Carbamazepina, (B) Ciprofloxacina e (C) Norfloxacina

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A problemática concentra-se no fato que todas as classes dos compostos apresentados anteriormente são usadas diariamente não só no Brasil, mas em todo o mundo. Dessa forma, o monitoramento dessas substâncias é de fundamental importância, já que a água é essencial em todos os aspectos da vida, e ainda não está totalmente elucidada quais consequências poderão ocorrer pela longa exposição à esses compostos.³⁴

A US EPA, define como contaminante emergente qualquer substância de natureza química, física, biológica ou radiológica incomum na água.³⁵ Segundo a Organização Mundial da Saúde da Europa (OMS/EUROPA), o acesso à água potável e adequada higiene em casa, são itens imprescindíveis para a vida no século XXI.³⁶ Fato este, que está diretamente relacionado a um adequado saneamento básico, já que a liberação de águas residuárias para o meio ambiente, além de danificar o ambiente aquático, expõe a população aos contaminantes emergentes, e aos agentes etiológicos tais como vírus, bactérias, e até mesmo o vírus SARS-CoV-2.³⁶

Os CEs acabam sendo introduzidos ao meio ambiente por meio das águas residuárias municipais, hospitalares, veterinárias e das indústrias farmacêuticas, isto acaba acontecendo, uma vez que as ETEs não foram desenvolvidas para a remoção completa desses compostos. Um esquema da entrada desses contaminantes no meio ambiente é apresentado na Figura 3.

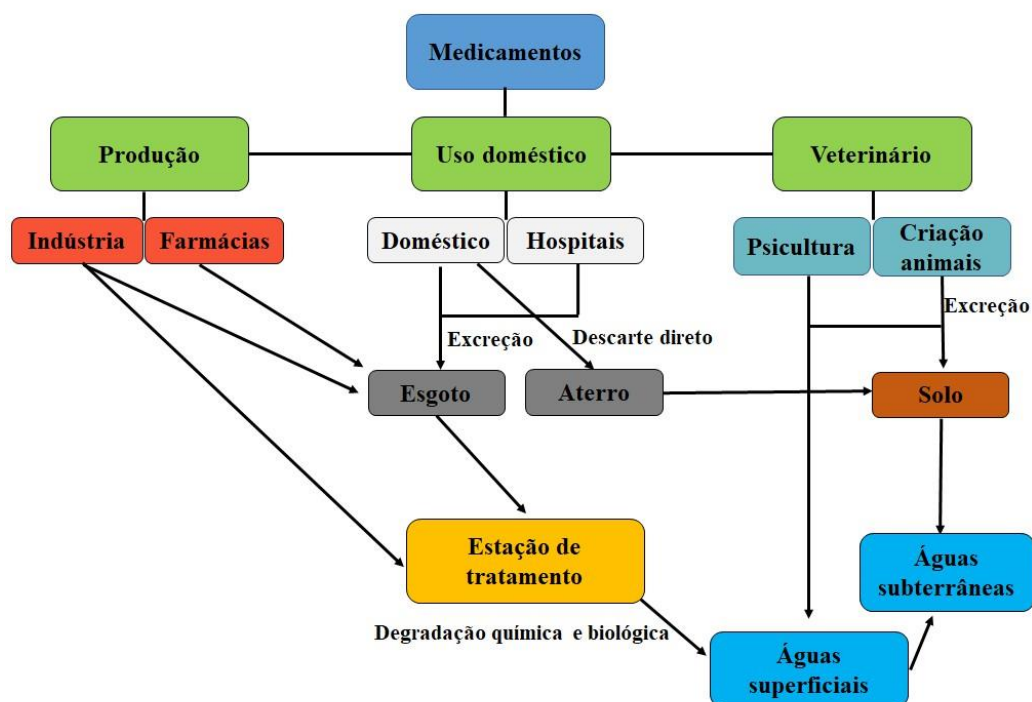


Figura 3 - Fluxograma da entrada dos CE em diferentes compartimentos ambientais

Fonte: Adaptada de Lima Gomes (2012).³⁷

A problemática acentua-se ainda mais se pensarmos nas condições sanitárias do Brasil. Segundo o Atlas do Esgoto, desenvolvido pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) e a Secretaria Nacional do Saneamento Ambiental, em 2017, no Brasil, somente 43 % do esgoto coletado era tratado; 12 % utilizavam soluções individuais, tais como fossa séptica; 18 % do esgoto coletado não era tratado e 27 % não possuíam coleta e muito menos tratamento de esgoto.^{38, 39}

No entanto, observa-se que muitas cidades ao redor do mundo não apresentam as ETEs. Segundo a US EPA, o principal objetivo das ETEs é acelerar os processos físico-químicos para remover contaminantes presentes na água coletada, e entregá-la adequada para a reutilização, ou para lançamento em fontes receptoras. O grande problema é o tratamento aplicado, principalmente no Brasil, já que o tratamento quando é aplicado, ainda não tem como objetivo a remoção de uma ampla gama de compostos químicos, como, agentes anti-hipertensivos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, drogas ilícitas, estimulantes, anti-inflamatórios e antibióticos.^{40, 41}

Com isso as águas residuárias acabam sendo fontes primárias de contaminação em águas receptoras e solos.

1.4 PRINCIPAIS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, CIPROFLOXACINA E NORFLOXACINA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

A US EPA por meio do método 1694, criado em 2007, recomenda como método oficial para determinação de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais em água, solo, sedimento e biosólidos sejam realizados por HPLC/MS/MS.⁴²

Após uma busca rápida na literatura (Quadro 1), sobre as técnicas mais utilizadas para determinação dos fármacos discutidos anteriormente no ambiente aquático ou formulações farmacêuticas, as técnicas cromatográficas ainda são as mais utilizadas conforme recomenda as farmacopeias Americana e Brasileira.^{55,56} Em amostras ambientais, um destaque especial são direcionadas às cromatografias gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas sequencial, que possibilitaram a sistematização de técnicas analítica nos Estados Unidos e Europa.⁵⁵ Entretanto, mesmo essas sendo as técnicas mais recomendadas, elas ainda apresentam elevado custo, além de produzirem grandes volumes de resíduos químicos. Pensando nisso o desenvolvimento de novos estudos em diferentes grupos vem crescendo objetivando a determinação CBZ, CIP e NOR usando técnicas alternativas como: imunossensores impedimétricos²⁹, sensores eletroquímicos baseados em polímeros com impressão molecular (MIP)^{57,58}, sensores fluorescentes baseados em MIP⁵⁹ e imunossensores baseados em fibras ópticas⁶⁰ e demais dispositivos e microssistemas.

Quadro 1 - Técnicas usadas para determinação dos fármacos em amostras ambientais e formulações farmacêuticas

(continua)

Analito	Matriz estudada	Método utilizado	Concentração monitorada	Referência
Carbamazepina	Água superficial	LC-MS/MS	$12,7 \times 10^{-2}^*$	43
	Água superficial	UHPLC-QToF/MS	$5,40 \times 10^{-3} - 2,50 \times 10^{-3}^*$	44
	Efluente (ETE)	HPLC-UV	0,132*	22
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	0,291*	45
	Efluente (ETE)		0,232*	
	Formulações farmacêuticas	HPLC-UV	201**	46
Ciprofloxacina	Efluente hospitalar	LC-FLD LC-MS/MS	32,0 – 99,0*	47
	Efluente hospitalar	SPE-UHPLC-MS/MS	1,30 – 33,9*	48
	Efluente (ETE)	UHPLC-MS/MS	$6,40 \times 10^{-2}^*$	49
	Formulações farmacêuticas	Quimioluminescência	476 – 535**	50
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	2,83*	45
	Efluente (ETE)		0,564*	

Quadro 1 - Técnicas usadas para determinação dos fármacos em amostras ambientais e formulações farmacêuticas

(conclusão)

Analito	Matriz estudada	Método utilizado	Concentração monitorada	Referência
Norfloxacin	Efluente hospitalar	SPE-UHPLC-MS/MS	0,800 - 4,40 *	48
	Água superficial	LC-MS/MS	$3,00 \times 10^{-2}$ - $5,40 \times 10^{-2}$ *	51
	Afluente (ETE)	LC-MS/MS	385*	52
	Efluente (ETE)		149*	
	Água residuária	LC-MS/MS	$8,32 \times 10^{-3}$ *	53
	Formulações farmacêuticas	Espectrofotometria	399**	54

Dado:

*concentração representada em $\mu\text{g L}^{-1}$,

** concentração representada em mg / comprimido.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

1.5 DISPOSITIVOS DE ANÁLISES RÁPIDAS

A preocupação em desenvolver métodos de análises rápidas, portáteis, com baixo consumo de reagentes e solventes e que atendam aos princípios da química verde, vem impulsionando diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Neste sentido, os laboratórios de química analítica vêm desempenhando um papel crucial, no desenvolvimento de tais métodos que sejam ambientalmente amigáveis, preservando assim, o meio ambiente e a saúde do operador.⁶¹

Neste contexto, as técnicas miniaturizadas surgem como alternativas ecológicas frente as técnicas clássicas de análise, uma vez que possibilitam desenvolver dispositivos em tamanhos reduzidos, permitem a obtenção de resultados equivalentes aos equipamentos clássicos, além de oferecerem portabilidade das análises, baixo custo e baixa geração de resíduos químicos, e fácil operação e manuseio.⁶²

O processo de miniaturização possibilitou que fossem desenvolvidos, por exemplo, dispositivos de análise totalmente miniaturizados, os chamados *lab-on-chip* ou μ -TAS, nos quais os consumos de reagentes seriam baixos, além do rápido tempo de processamento, permitindo pesquisas rápidas e com alta tecnologia.^{63,64}

Os *lab-on-chips* podem ser integralizados a várias unidades funcionais em um único dispositivo miniaturizado, como por exemplo, a microfluídica.⁶⁵ Esta caracteriza-se por usar baixo volume de amostra (10^{-9} a 10^{-18} L) em canais micrométricos.^{63,66} A tecnologia microfluídica concentra-se em usar o mínimo de fluido para obter informações precisas.⁶⁷

Quando os dispositivos microfluídicos são confeccionados em papel, seja ele cromatográfico ou de filtro, estes acabam por serem denominados de dispositivos analíticos microfluídicos à base de papel (μ PADs), e apresentam como principais características a portabilidade para detecção *in situ*, descartáveis, não necessitam de sistemas de distribuição externa, além de oferecerem baixo custo.⁶⁸

Integradas ao μ PADs, vários sistemas de detecção são utilizados, incluindo os métodos quimioluminescentes, eletroquímicos, fluorescentes, ópticos, dentre outros.⁶⁹ Entre estes, um dos mais empregados é o óptico, com destaque para o método colorimétrico, devido a simplicidade de operação e baixo custo.

A colorimetria ou método colorimétrico consiste na obtenção de um produto de reação colorido ou que se descolore, possibilitando a determinação de compostos orgânicos ou inorgânico após a reação química. Os métodos baseados neste tipo de reação, geralmente são miniaturizados, e os produtos de reação são normalmente captados por dispositivos digitais tais como, câmeras digitais, webcams, smartphones e scanners.⁷⁰

Os dispositivos digitais tornaram-se uma promissora alternativa para a captação de reações colorimétricas, pois apresentam software e hardware cada vez mais atualizados, sendo comparados por muitos à microcomputadores, além de oferecerem portabilidade e conectividade sem fio a outros dispositivos.⁷¹ De forma resumida, quando utilizam-se dispositivos digitais para a captura dessas imagens, o método torna-se uma alternativa atraente para laboratórios que dispõem de baixos recursos financeiros, além de permitir análises *in situ*.

Os produtos das reações colorimétricas podem ter suas imagens captadas em diferentes superfícies, sendo as mais utilizadas, papel de filtro quantitativo, placas de porcelana ou spot-tests fabricados por exemplo, em impressoras tridimensionais (3D). Os dispositivos 3D podem ser confeccionados sob diferentes formas geométricas e polímeros de impressão. Neste tipo de impressão, é possível a criação de protótipos precisos e de fácil repetição, além da facilidade no ajuste do modelo de impressão no computador, quando necessário. A gama de aplicações dos dispositivos impressos em 3D, envolve desde componentes para instrumentos analíticos, sensores eletroquímicos, células em fluxo, reatores de fluxo, spot-test, dentre outros.⁷²

Nesta vertente alguns exemplos da empregabilidade de dispositivos de análises rápidas e de baixo custo desenvolvidos e utilizados em análises químicas e bioquímicas encontram-se destacados no Quadro 2.

Quadro 2 - Dispositivos miniaturizados para aplicações em análises químicas e bioquímicas

(continua)

Dispositivo miniaturizado	Aplicação	Técnica de detecção	Referência
Biossensor para determinação de glicose	Determinação de glicose no sangue	Detecção colorimétrica	73
Dispositivo microfluídico em papel	Determinação de microrganismos patogênicos (<i>E. coli</i>) em amostras de urina	Comparação visual	74
Polarímetro portátil criado por impressão 3D	Medição do ângulo de rotação da luz polarizada	Mudança do feixe da luz polarizada	75
Dispositivo colorimétrico em papel	Detecção da presença de sulfonamidas em amostras de leite	Detecção colorimétrica utilizando scanner	76
Eletrodos impressos em impressora 3D	Sensores para fins analíticos	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica	77

Quadro 2 - Dispositivos miniaturizados para aplicações em análises químicas e bioquímicas

(conclusão)

Dispositivo miniaturizado	Aplicação	Técnica de detecção	Referência
Microchip fabricado em filtro de papel qualitativo	Análise de benzoato de sódio em alimentos	Detecção colorimétrica utilizando smartphone	78
Microamostrador portátil	Determinar de NO ₂ no ar atmosférico	Detecção colorimétrica	79
Spot-test de porcelana	Determinação de ácido ascórbico em frutas brasileiras	Detecção colorimétrica utilizando smartphone	80
Spot-test de porcelana	Determinação de bumetanida em urina humana	Detecção colorimétrica utilizando scanner	81
Folha de transparência	Determinação de Fe (III) em superfícies metálicas	Detecção colorimétrica utilizando scanner	82

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

1.6 IMAGENS DIGITAIS

Um aumento considerável na utilização de imagens digitais obtidas por dispositivos como câmeras digitais, webcams, scanners ou smartphones, cresceram nas últimas décadas e foram as responsáveis por oferecerem portabilidade, análises rápidas e *in situ*.^{83,84} Os smartphones atualmente apresentam hardware e software cada vez mais aprimorados, possuindo memória interna de elevada capacidade de armazenamento, uma ou mais câmeras de alta resolução, além de fácil conectividade sem fio a outros dispositivos. Desta forma, o smartphone cada vez mais é compatível para ser usado como ferramenta analítica usando a captação de imagens, tendo como aliado, o seu fácil manuseio pela maioria da população.⁸⁵

Essas melhorias, principalmente associadas aos avanços no hardware óptico permitiram que os smartphones se tornassem, ferramentas de análises rápidas utilizadas em técnicas espectroscópicas, tais como, em análises por fluorimetria e colorimetria, apresentando aplicações em diferentes áreas do conhecimento como química, biologia e ciências médicas.⁸⁶

Nas câmeras embutidas nos smartphones, as leituras dos sinais ópticos capturados, passam por um algoritmo de contagem de pixels, seguido pelo processamento das imagens usando o sistema operacional que pode ser o Android ou iOS.⁸⁷

Geralmente nas câmeras dos smartphones, o sensor mais amplamente utilizado é o fotodiodo semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS), que pode variar de acordo com o fabricante e o modelo.^{88,89} Esse sensor tem como principal objetivo capturar os fótons e convertê-los em um sinal elétrico. Este sinal é então alinhado em pontos, chamados pixels, e próximo a cada pixel existem transistores que são os responsáveis pelo processamento de informações claras, escuras e incolores.⁹⁰

Como o sensor não apresenta a capacidade de atribuir cores aos pixels, há a necessidade de inserir filtros que serão os responsáveis pela atribuição de tons aos pixels. Diferentes filtros podem ser utilizados, e distribuídos pelos diferentes espaços de cores.⁸⁶ Atualmente existem diferentes espaços de cores, mas os mais utilizados são ciano, magenta, amarelo e preto (CMYK), ou vermelho, verde, azul (RGB). O espaço de cor CMYK é geralmente usado em técnicas de impressão por utilizar das cores ciano, magenta e amarelo para formar uma variedade de cores, sendo a cor preta, k, formada

pela combinação destas 3 cores.⁹¹ A grande desvantagem ao se utilizar o espaço de cor CMYK, é a incapacidade de se obter um preto puro, já que esta cor é obtida pela mistura das demais cores, e além disso, com esse espaço de cor não se consegue abranger todo o espectro de cores.

O filtro Bayer é o mais utilizado nos sensores CMOS, que usa o sistema de cores RGB.⁸⁶ Este sistema é usado principalmente no sistema de captura de imagens, pois funciona de modo semelhante à visão humana, sendo possível obter as coordenadas de outros espaços de cores. No sistema RGB, as 3 matrizes R, G, B são usadas para armazenar as informações de intensidade destas componentes e posteriormente, podem ser usadas para estabelecer uma relação entre a concentração do analito e os componentes de cor.^{84, 92}

Como forma de garantir uma representação precisa das cores, o *International Color Consortium* (ICC), definiu um padrão de cor independentemente do dispositivo usado, onde os valores de R, G, B poderiam variar no intervalo de zero a 255 (formato de 8 bits) ou 0 a 1 (formato fracionário), podendo serem usados como intensidade do canal.⁹³ Nessa representação, se escolhermos, por exemplo, uma imagem e a decomposmos no sistema RGB, veríamos que ela seria representada em tons claros e escuros, de acordo com a intensidade de cada canal selecionado. Esta variação ocorre pelos tons atribuídos a cada pixel e o resultado, pode ser um cinza neutro, branco puro ou preto puro, conforme a seleção do canal.

Um exemplo de como ocorre a decomposição dos três canais pelo sistema RGB, é representada pela Figura 4.

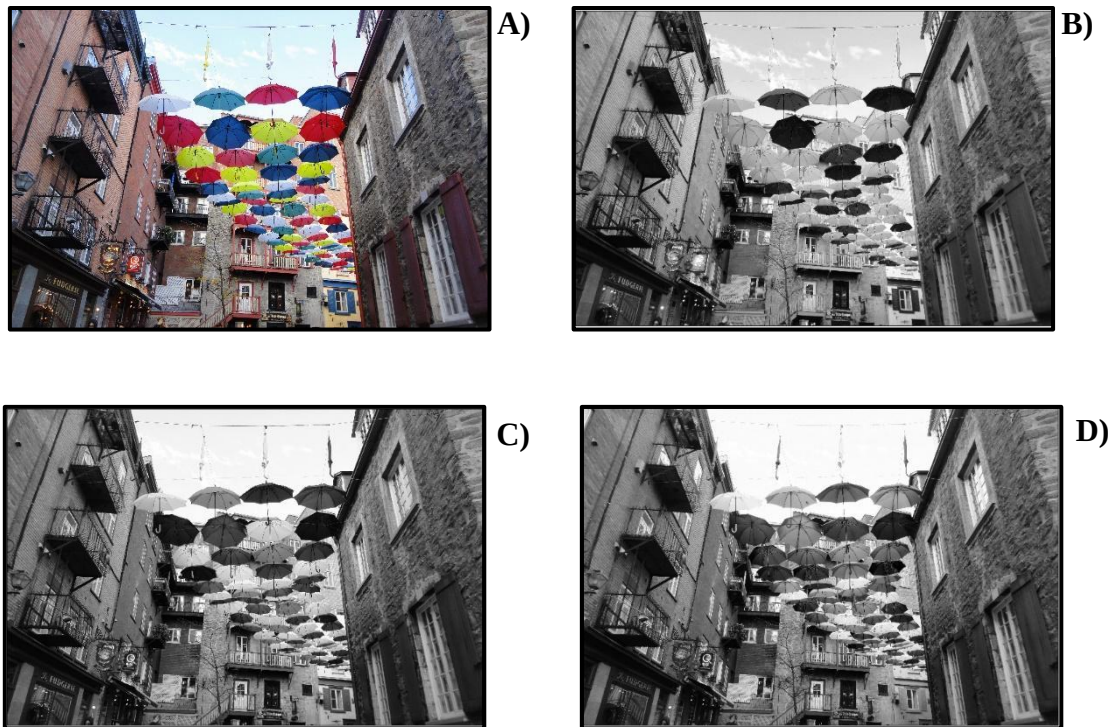


Figura 4 - (A) Foto original, e decomposição pelos três canais RGB; (B) Canal R; (C) Canal G; (D) Canal B

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Tal como o sistema CMYK, as cores dos canais RGB, podem ser combinadas de forma a obter as demais cores, como por exemplo, a cor preta pode ser representada por $[R = 0, G = 0, B = 0]$, o branco $[R = 255, G = 255, B = 255]$ e o violeta por $[R = 238, G = 130, B = 238]$.

As intensidades de cores são então usadas para estabelecer a concentração do analito após a captura das imagens, tendo como fenômeno, a reflectância difusa.⁹²

Quando a radiação incide sobre um objeto, dois fenômenos distintos podem ser observados, a absorção ou a reflexão. A reflectância ou reflexão, ocorre quando a radiação incidente atinge uma determinada superfície culminando nos processos de reflectância, a difusa ou a especular.⁹⁴ Nesta última, a radiação é refletida sem transmissão pela superfície da amostra, enquanto a reflectância difusa penetra no material, sendo transmitida em sua superfície após sofrer reabsorção parcial e dispersão na camada interna do material ⁹⁴, conforme observado na Figura 5.

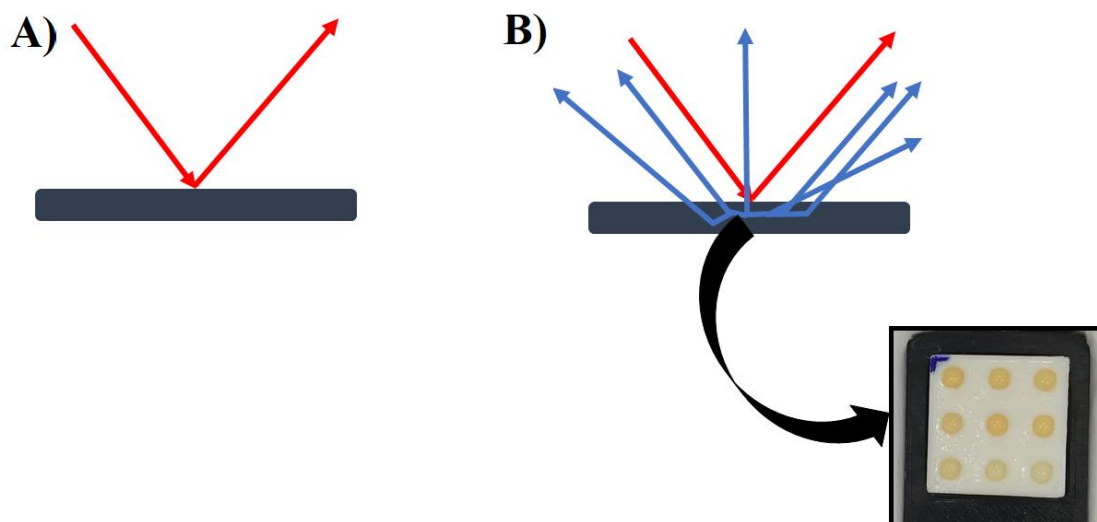


Figura 5 - Tipos de reflexão sobre a superfície de um material: (A) Reflexão especular; (B) Reflexão difusa após o feixe atingir um spot-test com reação colorimétrica

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Ambos os fenômenos (absorção ou reflexão) podem ser usados nas análises obtidas por imagens digitais. Portanto, para determinar a concentração da amostra, de maneira direta, utilizando dados da reflectância difusa, usa-se a função de Kubelka-Munk (F_R) (Equação (1)) para correlacionar com a concentração do analito. Ou ainda é possível também utilizar a Lei Lambert-Beer para determinar a concentração do analito, de forma indireta já que o fenômeno detectado pelo smartphone não é a absorção da radiação e sim a transmitância (Equação (2)).

$$F_R = \frac{(1 - R^2)}{2R} = KC \quad (1)$$

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

Sendo, R a reflectância difusa, K uma constante envolvendo os coeficientes de absortividade e espalhamento, e C a concentração do analito. Desta forma, para o cálculo de F_R deve-se obter os valores absolutos de reflectância difusa.

I_0 refere-se à intensidade do sinal em branco e I refere-se à intensidade do sinal da amostra em relação aos canais RGB monitorados a partir de reações químicas, bioquímicas ou enzimáticas.

Os valores obtidos de transmitância variam de 0 a 1, e permitem construir a curva analítica para determinar a concentração do analito nas amostras de interesse.^{84,95}

Cabe destacar que ainda não há um consenso na comunidade científica sobre a ocorrência de forma isolada ou simultânea dos processos de reflexão, absorção de luz, refração, dentre outros, nos produtos das reações colorimétricas a serem captadas por dispositivos digitais. Sabe-se, no entanto, que as técnicas colorimétricas baseiam-se nos fenômenos de reflexão e transmissão da radiação, e desta forma, diferentes modos de expressar esses resultados podem ser empregados.⁷¹

Existem ainda outros espaços de cores, que embora não apresentem uma uniformidade nas cores para comparação, podem ser convertidos para o sistema RGB, usando equações matemáticas, como é o caso do *Commission internationale de l'éclairage* (CIE XYZ). O CIE XYZ propõe a existência de três tipos de radiações de caráter imaginário, e a combinação dessas seriam as responsáveis pela formação de diferentes cores dentro do campo da visão humana. A CIE XYZ independe do dispositivo usado, sendo dependente somente das matrizes de conversão XYZ, sendo X e Z as coordenadas cromáticas e o Y é a luminância. Este espaço de cor, é comumente usado em um espectrofotômetro. Existe ainda, um espaço de cor chamado de HSV, que descreve as cores em função de suas tonalidades e brilho, sendo a tonalidade (H) definida como o comprimento de onda do espectro de radiação, variando de 0 a 360°. A saturação (S), é definida como a pureza da cor, e pode variar na faixa de 0 a 100 %. E por último, o brilho (V), descreve o brilho ou a intensidade da cor, podendo variar de 0 a 100 %.⁸²

Dependendo do espaço de cor usado não se faz a correlação com a Lei de Lambert-Beer para determinar a concentração do analito. Ao usar o espaço de cor CIE XYZ, é possível obter a concentração do analito, baseando-se nas coordenadas cromáticas, e o mesmo se observa no sistema HSV.

Diversos aplicativos como Better camera, Pixlr, Camera FV-5, ProShot, e Open Camera, são utilizados para captura de imagens digitais, sendo possível fazer o controle do brilho, macros, ISO e foco. Já para o processamento dos diferentes espaços de cores,

os aplicativos mais utilizados são Image J, Photometrix e Image color Picker. O destaque, no entanto, é para o Image J, um aplicativo de domínio público que utiliza a linguagem Java, e é muito utilizado no tratamento das imagens digitais.⁷¹

O uso do smartphone como ferramenta de detecção para reações colorimétricas é uma alternativa promissora, pois permite a redução do volume da amostra e redução do consumo de reagentes químicos, como solventes. O advento da impressão 3D, permitiu aprimorar a utilização do smartphone como detector, garantindo a precisão e a qualidade na aquisição das imagens, evitando radiação espúria, distorção da imagem e perda de foco.⁹⁶ Além disso, a impressão de spot-tests poliméricos são uma alternativa eficaz na baixa produção de resíduos químicos, baixo consumo de solventes e diminuição no custo final das análises.⁹⁶

Os spot-tests podem ser usados para acomodar uma ampla variedade de reações colorimétricas, podendo serem confeccionados com uma infinidade de materiais, tais como, polímeros em ácido polilático (PLA) ou acrilonitrila butadieno estireno (ABS) usando a impressão 3D e até os μ PADs.

Da Silva, Araujo e Paixão, desenvolveram uma plataforma em papel, com capacidade de 11 μ L, para análise de fenacetina usada como adulterante incorporado à drogas ilícitas, como a cocaína. A determinação foi feita usando um smartphone como dispositivo de captura das imagens obtidas por reação colorimétrica.⁹⁷

Dos Santos et al., desenvolveram uma reação colorimétrica para determinação de ácido ascórbico presente em amostras de frutas brasileiras da Amazônia com o uso de um spot-test de porcelana de 600 μ L e um smartphone.⁹⁸ Pessoa et al., utilizaram uma câmera digital para a captação das imagens colorimétricas geradas pela reação entre aguardente de cana-de-açúcar e um agente quelante e cromóforo para a determinação de cobre em amostras de aguardente.⁹²

Ravazzi et al., utilizou um spot-test de porcelana de 600 μ L e um smartphone para capturar os produtos da reação entre captopril e cloreto de paládio (II) aplicado na determinação de captopril em formulações farmacêuticas e urina sintética.⁹⁹

1.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

O uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) tem-se mostrado uma ferramenta poderosa em diferentes campos do conhecimento, e caracteriza-se pelo estudo da impedância elétrica (Z) de um sistema ou material que varia em função da frequência de um sinal senoidal de entrada. O conceito de impedância foi inicialmente discutido por Oliver Heaviside em 1886, que adequou os conceitos de números complexos na análise de circuitos, o que tornou possível a interpretação da impedância elétrica por dois elementos, sendo estes a resistência e as reatâncias (indutivas e capacitivas).¹⁰⁰

A resistência, caracteriza por ser o elemento real e por não alterar com a frequência; enquanto a reatância representa o elemento complexo e depende da frequência.¹⁰¹

Em linhas gerais, a EIE baseia-se na teoria das correntes alternadas (CA), e a resistência do sistema pode ser definida pela Lei de Ohm (Equação (3)).^{102,103}

$$E = I R \quad (3)$$

Sendo E o potencial em volts (V), I a corrente em Ampères (A) e R a resistência em Ohms (Ω). Cabe ressaltar que nesses tipos de circuitos, o elemento resistivo (resistor) é o único elemento responsável por oferecer uma barreira ao fluxo de elétrons. Essa relação é amplamente reconhecida e utilizada para representar um resistor ideal. O resistor ideal apresenta algumas particularidades, tais como: segue a Lei de Ohm em todos os níveis de tensão e corrente; possui valor independente da frequência e, por fim, a corrente e tensão que atravessam um resistor estão em fase um com o outro.¹⁰³

Em um sistema eletroquímico de corrente alternada, no entanto, as relações elétricas são mais complexas do que aquelas limitadas pelo resistor ideal e, assim, essas propriedades simplificadoras não são sempre válidas. No lugar da resistência, emprega-se o conceito de impedância (Equação (4)).¹⁰² De forma análoga à resistência, a impedância relaciona-se com a habilidade apresentada pelo circuito elétrico em resistir ao fluxo de corrente elétrica.^{102,103}

$$E = I Z \quad (4)$$

A impedância, dada em Ohms (Ω), caracteriza-se por ser um conceito mais geral do que a resistência, uma vez que ela considera não somente as amplitudes da tensão e corrente, mas considera também as fases relativas entre as grandezas e a dependência à frequência.¹⁰³

A impedância, normalmente, relaciona um potencial alternado em uma célula eletroquímica com a corrente alternada produzida ou vice-versa. Quando for aplicado um sinal senoidal de excitação, a resposta gerada será uma corrente senoidal de mesma frequência.¹⁰³

A expressão equivalente à Lei de Ohm e que permite o cálculo da impedância em um sistema eletroquímico é dada pela Equação (5).¹⁰³

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t \pm \phi)} \quad (5)$$

Sendo $E(t)$ o potencial em função do tempo t ; E_0 a amplitude desse sinal, ω a frequência angular (com $\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência); $I(t)$ a corrente em função do tempo gerada como resposta à aplicação de $E(t)$ e I_0 é a amplitude do sinal de corrente. Na equação, ϕ é o ângulo de fase correspondente à defasagem entre o potencial e a corrente.¹⁰³

A partir da relação matemática de Euler, torna-se possível expressar a impedância como uma função complexa em termos de corrente e potencial. Dessa forma, a impedância será expressa como um número complexo, ou seja, apresenta uma parte real (Z') e outra imaginária (Z'') conforme a Equação (6), em que $|Z|$ é o módulo da impedância.¹⁰³

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (6)$$

O estudo da EIE possibilita a avaliação de diversos processos fundamentais que ocorrem na interface eletrodo-solução, sendo esses, a formação de filmes finos, adsorção, taxa de transferência de carga, difusão e troca iônica.¹⁰⁴ Como os eventos eletroquímicos são, em essência, reações químicas, estas ocorrem segundo os princípios químicos gerais. Algumas envolvem, por exemplo, a transferência de elétrons (reações redox), apresentam natureza e cinética heterogênea, e dependem da relação área e interface do eletrodo.¹⁰⁵

O fundamento da técnica concentra-se na aplicação de um estímulo elétrico, que pode ser um potencial ou uma corrente conhecida, em uma faixa de frequências (que pode variar por exemplo de 10^6 a 10^{-4} Hz) seguida da observação da resposta gerada.¹⁰⁴

Geralmente, os experimentos envolvendo a EIE são realizados após o sistema entrar em equilíbrio, condição tipicamente observada pelo monitoramento do potencial de circuito aberto (PCA), que deverá permanecer ou atingir um valor constante, que corresponda ao equilíbrio eletroquímico. A amplitude do sinal de perturbação comumente utilizada para as medidas de EIE são baixas, geralmente na faixa de 5 a 20 mV, como forma de não alterar o estado de equilíbrio do sistema, e para facilitar a linearização das respostas obtidas.¹⁰⁶

As modificações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo-solução eletrolítica podem ser modeladas em associação a um circuito elétrico equivalente que visa representar o espectro da impedância. Para a extração do circuito equivalente de um sistema eletroquímico, geralmente são utilizados softwares que possibilitam tal simulação. Os principais componentes, de maneira simplificada, que modelam os circuitos equivalentes são: resistor, capacitor e indutor.¹⁰⁷

De modo geral, esses componentes estão associados aos processos físicos que estão ocorrendo no sistema, conforme observado no Quadro 3.

Quadro 3 - Correlação estabelecida entre os processos físicos e o elemento de circuito elétrico

Processo Físico	Elemento de Circuito
Transferência de carga	Resistores R_e e R_{tc}
Dupla camada elétrica	Capacitor C_{dc}
Camadas superficiais dielétricas (revestimentos orgânicos e óxidos)	Capacitor C
Adsorção	Pseudocapacitor C_θ e resistor R_θ
Transporte de massa	Pseudocapacitor C_w e pseudo-resistor R_w

Dado: R_e é a resistência do eletrólito;

R_{tc} é a resistência à transferência de carga.

Fonte: Retirado de Wolynech (2002).¹⁰⁸

Nos eletrodos, podem ocorrer dois diferentes processos, sendo estes, processos Faradaicos e não-Faradaicos. Nos processos Faradaicos, observa-se transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Já nos processos não-Faradaicos, o eletrodo encontra-se polarizado e não há, dessa forma, transferência de cargas, mas alterações no potencial elétrico da interface.¹⁰⁹ Além disso, na EIE não-Faradaica, não há a exigência do uso de par-redox, e consequentemente, não é necessário eletrodo de referência, uma vez que não é aplicado potencial de corrente contínua (CC).¹⁰⁸

Nas mais simples células eletroquímicas, o conjunto eletrodo-solução apresenta comportamento análogo a uma combinação em série de uma resistência R_e , que representa a resistência da solução (eletrólito), e um capacitor ideal, de capacitância C_{dc} (distribuição da dupla camada elétrica), como demonstrado na Figura 6A).¹⁰⁶ Nesse tipo de configuração, diz-se que o eletrodo é bloqueante (ou idealmente polarizado), uma vez que não existe movimentação de cargas elétricas entre a solução eletrolítica e o eletrodo. Isso ocorre porque o potencial aplicado no eletrodo bloqueante não produz corrente no eletrólito.¹⁰⁶

Pode-se, ainda em uma grande classe de sistemas, adicionar em paralelo com o capacitor C_{dc} , uma impedância Z_f (característica de reações Faradaicas no eletrodo), como forma de representar os processos que ocorrem na interface eletrodo-solução eletrolítica,

conforme apresentado na Figura 6B). Dessa forma, essa Z_f pode ser subdividida, em alguns casos, em uma resistência R_{tc} (ocasionada pelo processo de transferência de carga entre o eletrodo e as espécies eletroativas da solução) em série com a impedância, conhecida como impedância de Warburg (Z_W), relacionada ao fenômeno proveniente do transporte de massa (difusão) dessas espécies eletroativas (Figura 6C)).¹⁰⁶

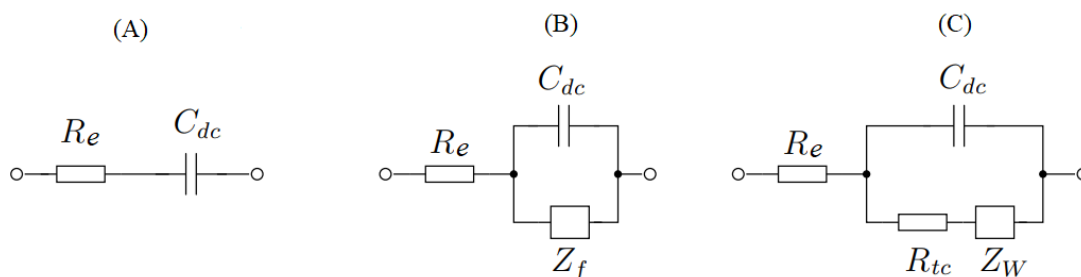


Figura 6 - Representação de circuitos elétricos equivalentes. (A) Célula eletroquímica simples; (B) Reação Faradaica no eletrodo demonstrada pela impedância Z_f ; (C) Processo difusional representado pela impedância de Warburg (Z_W). Este circuito é comumente conhecido como modelo de Randles

Fonte: Retirado de Santoro (2014).¹⁰⁶

Cabe ressaltar que a escolha do circuito elétrico equivalente que melhor descreva o sistema eletroquímico sob investigação deve principalmente, corresponder de forma adequada aos fenômenos físicos observados na interface eletrodo/solução.

1.8 REPRESENTAÇÕES DOS RESULTADOS GERADOS POR EIE

Os resultados provenientes da impedância complexa em função da frequência na EIE podem ser representados por duas diferentes configurações, os diagramas de Nyquist e de Bode.

No diagrama de Nyquist, também conhecido como representação de Argand ou Cole-Cole, expressa-se a impedância imaginária em função da impedância real medida para uma dada frequência angular (ω), que pode tender de zero a infinito. O conjunto de pontos obtidos em uma gama de frequências é utilizado para compor a curva no plano imaginário.¹⁰⁷

Os dados de impedância obtidos são representados no plano cartesiano em função da variação de ω e do mecanismo eletroquímico predominante. Cabe ressaltar que no diagrama de Nyquist, cada ponto irá representar as partes imaginária e real da impedância, obtidas a uma determinada frequência. Os conjuntos de pontos medidos durante a impedância, sob frequências pré-estabelecidas, irão formar a curva no plano complexo. Uma representação do diagrama de Nyquist é apresentada na Figura 7 A). Para interpretar o diagrama de Nyquist, faz-se a extrapolação da parte direita do semicírculo até o eixo horizontal. Dessa forma, o diâmetro do semicírculo obtido, por exemplo, quando são investigadas as reações Faradaicas no sistema, representará a resistência à transferência de carga. Logo, quanto maior o diâmetro do semicírculo, maior será a R_{tc} .¹⁰⁷

Já o diagrama de Bode, Figura 7 B), pode ser representado por dois diferentes diagramas. Sendo estes: um representando a dependência do módulo da impedância em relação à frequência, e o outro diagrama representando a dependência do ângulo de fase em função da frequência.¹⁰⁷

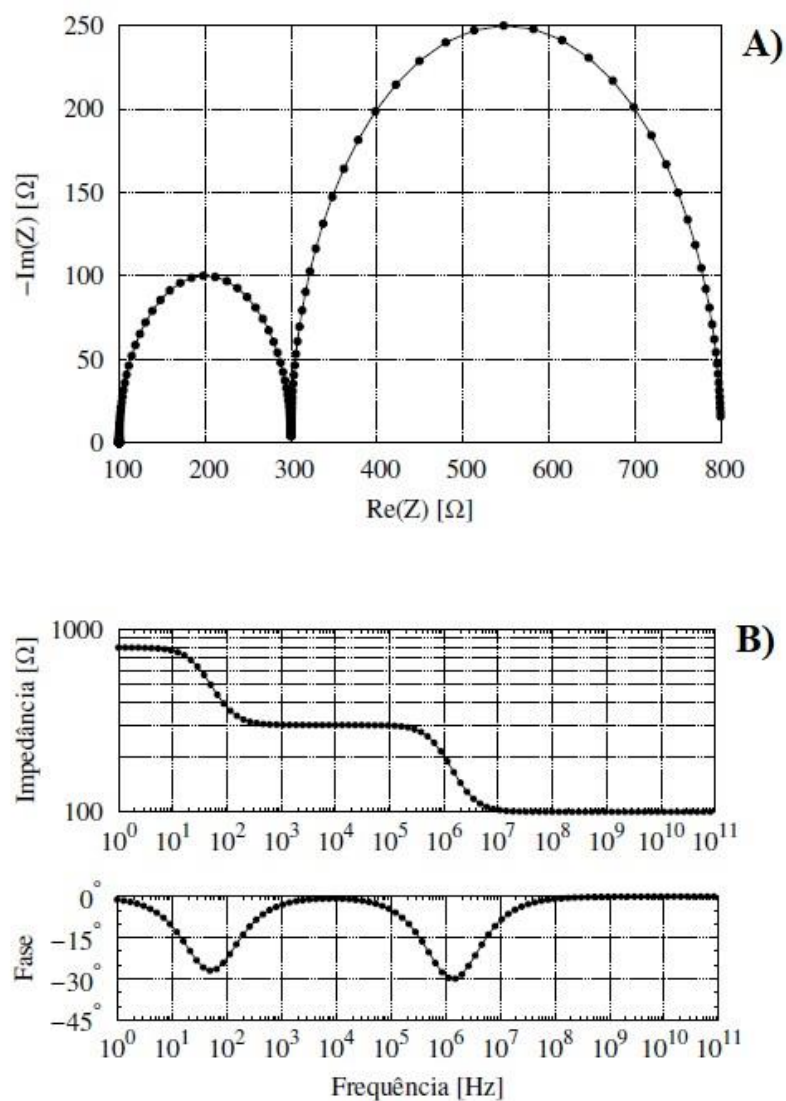


Figura 7 - Representação das diferentes formas de impedância complexa em função da frequência; (A) Diagrama de Nyquist (plano complexo) e (B) Diagrama de Bode (em função do módulo da impedância e do ângulo de fase)

Fonte: Retirado de Chiappetta Filho (2014).¹⁰⁷

Em linhas gerais, ambos os diagramas são usados de forma complementar para a obtenção de informações adicionais e também para compreensão dos processos eletroquímicos que estão ocorrendo no sistema.

1.9 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SUPERFÍCIES

A imobilização de biomoléculas em superfícies é de vital importância para a construção de um biossensor de alta especificidade. Segundo Tarley, Sotomayor e Kubota (2005), um sensor químico ou biossensor é caracterizado como um dispositivo que utiliza um elemento de reconhecimento acoplado a um transdutor, e este transdutor terá como principal objetivo, converter a energia proveniente do reconhecimento em sinal mensurável.¹¹⁰

Os biossensores são caracterizados pelo reconhecimento biológico usando a resposta biológica fornecida para antígeno, anticorpo, DNA, RNA ou enzima.¹¹¹ Quando são utilizados anticorpos, como elemento de reconhecimento biológico no desenvolvimento de biossensores, estes acabam sendo denominados de imunossensores, por apresentarem alta seletividade de ligação com a respectiva molécula alvo.¹¹²

Sabe-se que o desempenho do biossensor está associado à eficiência da ligação do elemento biológico à sua superfície, baixa ligação não-específica e estabilidade da camada biológica imobilizada. Assim, a escolha do método a ser utilizado na etapa de imobilização, depende do bioelemento empregado e da superfície selecionada para a imobilização, de tal modo que a biomolécula imobilizada permaneça estável, para obter repetibilidade nas análises e nos dados adquiridos. Adicionalmente, para obtenção dos requisitos descritos anteriormente um cuidado especial deve ser tomado, evitar expor o imunossensor a condições extremas, como por exemplo meio ácido, ou mesmo elevada temperatura, que promova a desnaturação das biomoléculas imobilizadas. Deve-se também atentar para ligações inespecíficas, que poderão gerar resultados equivocados. Para evitar isto, poderão ser utilizados moléculas bloqueantes na superfície do sensor, utilizando, por exemplo, a caseína ou albumina de soro bovino, antes da exposição do biossensor ao analito.^{113,114}

Um dos principais modos de promover a imobilização de biomoléculas na superfície do sensor é por meio da utilização de ligações covalentes. Esta ligação pode ocorrer usando certos grupos químicos ativados quimicamente, por meio de ligações cruzadas, usando o glutaraldeído, por exemplo.¹¹³ A imobilização pode ocorrer ainda por oclusão, adsorção física ou imobilização entre camadas de polímeros.

Quando se utiliza a oclusão, imobiliza-se as biomoléculas em membranas ou outras matrizes como gel, sílica gel e poliacrilamida, utilizando ligações cruzadas. Essa técnica oferece a vantagem de controlar o tamanho dos poros.¹¹³

A imobilização por adsorção física, embora seja mais simples, é pouco reprodutiva, já que as biomoléculas podem se desprender do sensor (dessorção ao manter armazenado por longo período), uma vez que as ligações observadas no processo são geralmente fracas e instáveis. Em contraposição, pode-se usar a adsorção química, que quando comparada com a adsorção física, apresenta vantagens como, a redução de ligações não-específicas e possibilidade de armazenamento sem prejuízos ao sensor.¹¹³

E por fim, as biomoléculas podem ser imobilizadas em camadas de polímeros, e um eletrodo pode ser imerso em uma solução polimérica, seguida da etapa de evaporação do solvente utilizado, fixando a biomolécula na superfície do eletrodo. As camadas poliméricas podem ainda, ser formadas por eletrodeposição, quando um potencial é aplicado sobre a molécula polimerizante pré-existente.¹¹³

Atualmente, observa-se uma tendência na utilização de eletrodos revestidos com polímeros, uma vez que há diversos tipos que podem ser imobilizados, além da possibilidade da construção de sensores tridimensionais.¹¹³

1.9.1 Uso da impedância em sistemas biológicos

Sabendo-se que a medida de impedância é considerada uma técnica sensível para avaliações de variações que ocorrem na C_{dc} , essa é fortemente influenciada pelas espécies que adsorvem na interface solução/eletrodo.¹¹⁵

Na região da dupla camada, observa-se que o potencial eletrostático diverge do potencial eletrostático do interior da solução, o que resulta em um acúmulo ou deficiência de determinadas espécies em relação ao meio da solução. Este é comumente conhecido como processo de adsorção de espécies e pode abranger tanto dipolos quanto íons.¹¹⁵

A sensibilidade oferecida pela EIE na biodetecção, proporciona análises contínuas, além de não provocar impactos no sistema em estudo, provenientes da

aplicação de um potencial externo. Esse potencial aplicado apresenta pequena amplitude de corrente alternada e pode ser realizado no potencial de repouso entre o eletrodo e a biomolécula, preservando ao máximo as condições naturais do processo.

A impedância pode ser utilizada para o monitoramento da adsorção, por exemplo, de proteínas, não necessitando que estas sejam eletroativas, o que confere grande avanço nos estudos imunológicos.¹¹⁵

Ao monitorar as interações entre antígenos-anticorpos a partir da capacitância, utilizando um modelo elétrico bastante simples, observa-se um aumento da espessura da camada dielétrica “d” devido às interações ocasionadas pelo imuno-complexo antígeno-anticorpo, sendo a capacitância total (C_t) medida como a soma das capacitâncias individuais do antígeno (C_a) e anticorpo (C_b)¹¹⁵, conforme observado na Figura 8 e Equação (7).

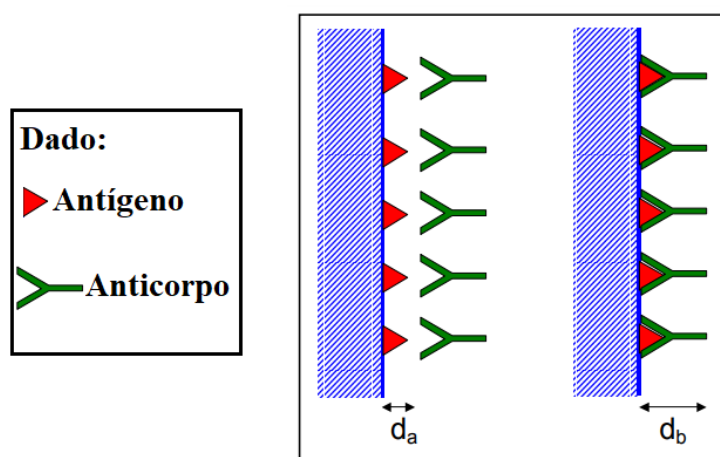


Figura 8 - Esquema da interação ocorrida na interface eletrodo/solução

Fonte: Retirado de Ueta (2002).¹¹⁵

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_a} + \frac{1}{C_b} \quad (7)$$

Dado: C_a é capacitância do antígeno; C_b é a capacitância do anticorpo; C_t é soma das capacitâncias C_a e C_b ; d_a é a espessura da camada dielétrica do antígeno e d_b é o aumento da espessura da camada dielétrica produzida pelo anticorpo.

1.10 FIBRAS ÓPTICAS

As fibras ópticas são guias de ondas amplamente utilizadas para condução da luz. Estas se apresentam na forma de filamentos finos, flexíveis, similar a um fio de cabelo. As fibras ópticas mais comuns são produzidas usando sílica (SiO_2) (material de elevada pureza e baixa perda óptica), são materiais dielétricos (isolantes), e apresentam grande janela de transparência que se estende do ultravioleta até o infravermelho médio. No formato cilíndrico, a fibra óptica é constituída por uma região central, chamada núcleo, por onde a luz é conduzida, e circundada por uma região externa, conhecida como casca. O núcleo, geralmente, possui diâmetro de alguns poucos micrômetros ($10\text{ }\mu\text{m}$, para uma fibra monomodo) até algumas dezenas de microns (fibra multimodo).^{116,117}

Como forma de proteção, as fibras são geralmente envoltas por uma capa plástica (revestimento), que normalmente é composta por PMMA (polimetilmetacrilato), que visa oferecer proteção mecânica. Um esquema de uma fibra óptica encontra-se elucidada na Figura 9.

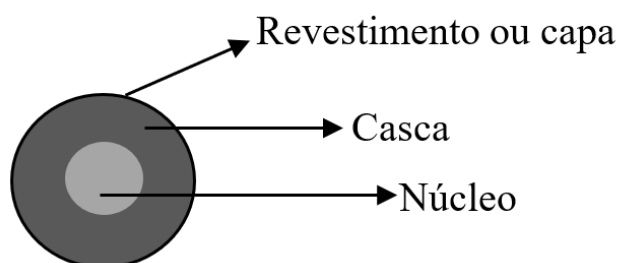


Figura 9 - Desenho de uma fibra óptica em corte vertical apresentando as estruturas da fibra

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Inicialmente, a fibra foi extensivamente explorada como um meio de transmissão de dados para redes de computadores, em acesso locais. Mas isso foi mudando ao longo dos anos, e as fibras ópticas são atualmente usadas em telecomunicações, tecnologia biomédica, captura de imagens, e na química analítica.¹¹⁶

Entretanto, a versatilidade no emprego das fibras ópticas ainda encontra um obstáculo proveniente de sua funcionalidade e estrutura superficial. Desta forma, esforços têm sido dedicados às funcionalizações na superfície da fibra para que esta seja usada de forma efetiva em diferentes tecnologias.

1.10.1 Princípios de funcionamento das fibras ópticas

Com base na teoria de Maxwell, as ondas eletromagnéticas propagam-se no vácuo sob velocidade c , conforme a Equação (8).

$$c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}} \quad (8)$$

sendo ε_0 a permissividade e μ_0 a permeabilidade no vácuo.³

Quando muda-se para um meio material, observa-se que a velocidade de deslocamento passa a ser representada por v_n , conforme a Equação (9).

$$v_n = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon \mu}} \quad (9)$$

sendo ε a permissividade e μ a permeabilidade do meio.

O índice de refração (n), pode ser então obtido por meio de um rearranjo das Equações (8) e (9), descritas anteriormente e elucidado de forma simplificada pela Equação (10).

$$n = \frac{c}{v_n} = \sqrt{\frac{\varepsilon \mu}{\varepsilon_0 \mu_0}} \quad (10)$$

Quando um feixe de luz, incide sobre a interface que separa dois meios com índices de refração distintos, podem ser observados dois fenômenos, conhecidos como

refração e reflexão. Estes fenômenos são regidos pela Lei de Snell, que baseia-se no ângulo de incidência do feixe de luz e é representada pela Equação (11).¹¹⁸

$$n_1 \text{sen}_{\theta_i} = n_2 \text{sen}_{\theta_t} \quad (11)$$

Sendo n_1 e n_2 representam os índices dos meios de incidência e refração, e θ_i e θ_t representa os ângulos de incidência e refração, respectivamente.

Conforme o ângulo de incidência utilizado, observa-se que a refração, de certa forma, deixa de ocorrer, dando lugar a reflexão total da luz. Este é o princípio básico observado na condução da luz dentro da fibra óptica. Além disso, outros importantes parâmetros são a abertura numérica, atenuação (causada pela diminuição da potência do sinal propagado) e tipo de fibra.¹¹⁷

No fenômeno de reflexão interna total, o índice de refração do núcleo (n_1) é superior ao índice de refração da casca (n_2), sendo o responsável pelas reflexões ao longo das fibras e consequentemente, pela propagação da luz incidente.¹¹⁶ Para isto ocorrer, a luz deve ser projetada nas terminações da fibra óptica na interface núcleo e casca em um ângulo de incidência (θ_i) maior que o ângulo crítico (θ_c), conforme demonstrado na Figura 10 , e isto resultará em um cone de aceitação, dentro do qual a luz precisará ser lançada.

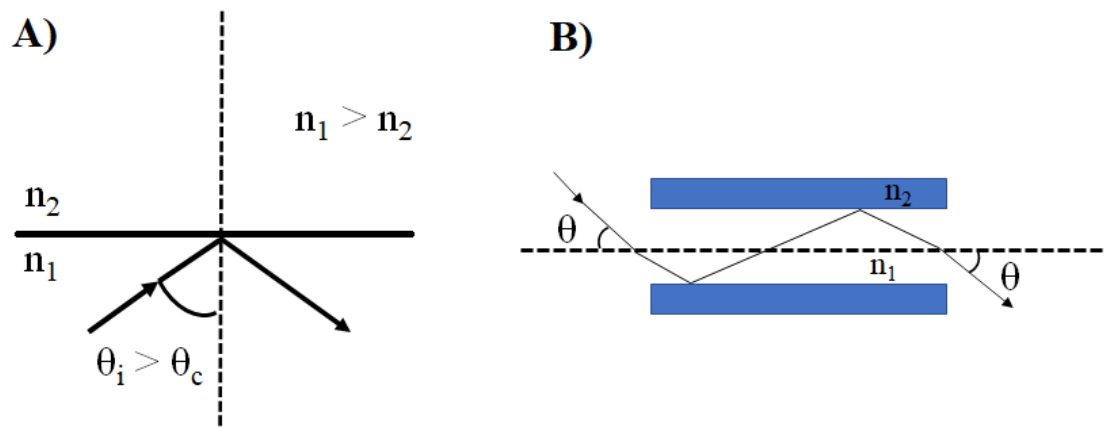


Figura 10 - A) Princípio da reflexão interna total, sendo $\theta_i > \theta_c$; B) Reflexão interna total dentro da fibra óptica, sendo $n_1 > n_2$

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Para que um feixe de luz seja propagado ao longo de uma fibra óptica, esse feixe deverá formar obrigatoriamente com o eixo central da fibra, um ângulo máximo, para que o fenômeno da reflexão interna total ocorra. Tal fato será determinante na quantidade de luz que poderá ser aceita no interior da fibra. Produz-se então, o chamado cone de aceitação de luz na fibra óptica, observando que todo raio que não cumpra esta condição, não será propagado pela fibra. Em suma, o ângulo máximo, depende dos índices de refração do núcleo e da casca da fibra, e do meio onde ela encontra-se imersa.¹¹⁹

Já a atenuação da fibra, é uma característica de total relevância pois indica o quanto de potência a fibra perde durante a transmissão da luz, sendo uma função do comprimento de onda, e é expressa em decibel (dB) por km ou metro. A fibra que apresentar menor valor de atenuação, dentro da faixa de comprimento de onda desejado, terá melhor qualidade.¹¹⁷ Contudo, observa-se na prática, que a atenuação é ocasionada principalmente, pela absorção e espalhamento da radiação decorrentes da presença de impurezas. Além disso, há também perdas geradas nas curvaturas, conexões e emendas entre segmentos da fibra com a fonte e o conector utilizado.

1.10.2 Modos de propagação em fibras ópticas

Entender a forma como a luz se propaga no interior do núcleo das fibras ópticas, é de fundamental importância na escolha da fibra a ser utilizada. Todavia é preciso inicialmente compreender o termo “modo”. Este é um conceito matemático e físico, utilizado para descrever a propagação da luz em determinado meio, satisfazendo sempre as Equações de Maxwell.^{120,121}

As fibras ópticas podem ser subdivididas em duas diferentes categorias, multimodo e monomodo.^{120,121}

Na fibra multimodo são verificados maiores diâmetros de núcleos, geralmente de 50 - 62,5 μm , o que proporciona um maior impulso de sinal por diferentes caminhos ópticos, fazendo com que a luz chegue ao detector em diferentes momentos, ocasionando o alargamento temporário de sinal. Esse tipo de fibra, apresenta menor custo e é utilizada para curtas distâncias.¹¹⁹

Já a fibra monomodo, apresenta menores diâmetros de núcleo, 5 - 10 μm , e são mais usadas em distâncias mais longas, como por exemplo, em sistemas de telecomunicações. Como nas fibras monomodos, o diâmetro do núcleo é pequeno, quando comparado ao da fibra multimodo, a transmissão do sinal ocorre no eixo paralelo ao da fibra óptica.¹¹⁹

Em suma, uma das grandes diferenças das fibras, monomodo e multimodo, estão na menor atenuação observada quando se utilizada a fibra monomodo, e além disso, na fibra multimodo verifica-se maior dispersão de sinal, ocasionado pela diferença de velocidades de propagação dos diversos modos que a compõe.¹²²

Na Figura 11, encontra-se uma imagem dos diferentes modos de propagação nas fibras ópticas.

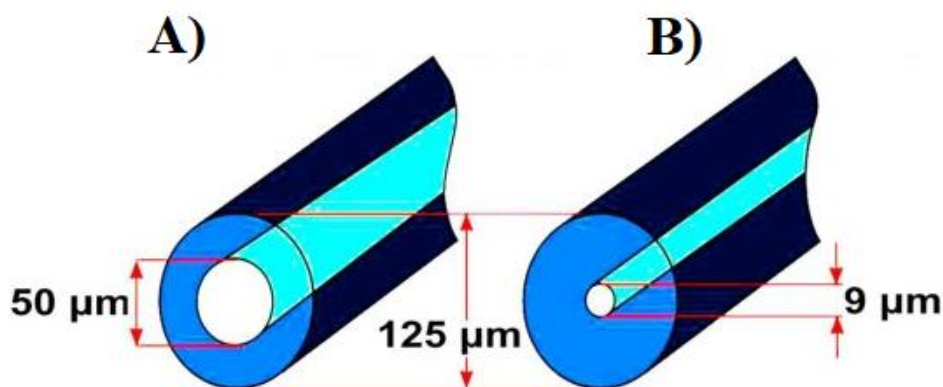


Figura 11- Representação das fibras ópticas: A) Multimodo; B) Monomodo

Fonte: Retirado de Addanki, Amiri, Yupapin (2018).¹¹⁹

1.10.3 Sensores baseados em fibras ópticas

Com os avanços verificados na utilização das fibras ópticas, foi possível que estas fossem usadas no desenvolvimento de sensores químicos, conhecidos como optodos ou optrodos.^{117,123}

A utilização das fibras ópticas no desenvolvimento de optodos, oferece algumas vantagens, tais como^{121,122}: (i) análise remota, in situ e em tempo real; (ii) não são necessários dispositivos de referência; (iii) são livres de interferências elétricas, uma vez que não são dispositivos elétricos; (iv) baixo custo na confecção dos optodos; e (v) pode-se determinar mais de uma espécie química de interesse com um único optodo, bastando monitorar mais de um comprimento de onda para as análises.

O funcionamento dos sensores desenvolvidos a partir das fibras ópticas, tem como princípio de funcionamento a condução da luz. A luz, proveniente de certa fonte, é introduzida dentro da fibra óptica e direcionada de forma a interagir com a fase sensora.

A fase sensora, também conhecida como transdutor químico, constitui-se por um reagente imobilizado as fibras, sendo este sensível ao analito e capaz de fornecer um sinal óptico.¹²³

Esta interação produzida, resultará em uma modificação do sinal óptico, que está intimamente relacionado com a informação química desejada. O sinal, pode voltar pela mesma fibra ou por outra fibra de modo a chegar até o sistema de detecção.¹¹⁷

Os sensores desenvolvidos a partir da utilização das fibras ópticas, podem ser classificados em duas diferentes categorias, segundo a transdução, sendo estes, extrínsecos e intrínsecos.^{117,124}

Nos sensores extrínsecos, a fase responsável pelo reconhecimento, também conhecida como fase sensora, é inserida nas extremidades das fibras ópticas. Não sendo necessário, o contato entre as fibras ópticas e o reagente responsável para o reconhecimento do analito de interesse. Neste tipo de sensor, a fibra óptica será utilizada exclusivamente para a condução da luz entre a fase sensora e o detector.¹²⁴ Os sensores extrínsecos destacam-se por apresentarem maior facilidade de construção, além de envolverem uma grande gama de aplicação, sendo largamente aplicáveis quando os sistemas analisados refletem ou emitem luz.¹²⁴

Já nos sensores intrínsecos, as espécies químicas funcionalizadas sobre a fibra óptica serão responsáveis por mudanças oriundas na transmissão da luz nas fibras, e isto só é possível, devido ao contato direto da fibra com a amostra a ser analisada. Nesse sensor, uma ou mais propriedades físicas da fibra óptica são modificadas para promover alterações nas propriedades da luz. Estas alterações realizadas, agem sobre as fibras e causam perturbações nas características da luz no interior das mesmas.¹²⁴ Nesses sensores, a detecção é baseada nos princípios do campo elétrico evanescente.

As ondas evanescentes produzidas, surgem do fenômeno de reflexão interna total, devido as interferências ocorridas entre os raios incidentes e os feixes refletidos, gerando uma onda constante, harmônica e estacionária, perpendicular à superfície de reflexão e que interage com os analitos próximos ao meio circundante presentes em uma pequena distância.^{116,117} A presença do analito, bem como sua concentração, são determinadas pela variação fracionária da potência da luz na outra extremidade da fibra.¹²⁵

1.10.4 Princípios ópticos envolvidos nos sensores químicos

Em sensores químicos, a interação entre espécies químicas e luz, podem ser monitoradas por diferentes técnicas ópticas, tais como, absorção, emissão e reflexão ou espalhamento de luz.¹²⁴

Os sensores classificados como sensores de absorbância, recebem este nome, por determinarem quantitativamente as informações químicas de interesse, por meio da variação da intensidade da radiação absorvida, quando esses são imersos em uma solução contendo o analito a ser estudado.¹²⁴

Desta forma, à medida que um raio de luz atravessa a fase sensora, observa-se um aumento da absorção, ocasionado pelas transições nos estados eletrônicos das moléculas ou átomos presentes. Após a interação com as moléculas, esse raio de luz é transmitido pela fase sensora com a intensidade reduzida, e esta redução da intensidade é então determinada pela Lei de Lambert-Beer, e está relacionada com a concentração das espécies químicas absorventes presentes no percurso óptico.¹²⁴

Os sensores baseados em fluorescência utilizam um indicador fluorescente, imobilizado na ponta do sensor, para obtenção do sinal do analito. Esses sensores são melhores empregados quando se pretende determinar analitos em baixas concentrações (pg L^{-1} a ng L^{-1}). O princípio de funcionamento desse tipo de sensor, baseia-se na promoção de átomos e moléculas a níveis de energia mais altos (estado excitado), quando irradiados por um raio de luz de comprimento de onda específico (λ_{ex}). Quando essas espécies retornam ao seu estado fundamental (menor energia), liberam energia em comprimentos de onda característicos (λ_{em}). Esta luz detectada relaciona-se com a eficiência do indicador utilizado, e está relacionado com a concentração do analito na amostra analisada.¹²⁴ A Equação de Parker (Equação (12)), é usada para a determinação da espécie fluorescente.

$$I_{(\lambda_{\text{em}})} = K_{(\lambda)} I_{(\lambda_{\text{ex}})} \Phi_{(\lambda_{\text{ex}})} \varepsilon_{(\lambda_{\text{ex}})} LC \quad (12)$$

Sendo, respectivamente, $I_{(\lambda_{\text{em}})}$ e $I_{(\lambda_{\text{ex}})}$ as intensidades das radiações emitidas e de excitação; $\Phi_{(\lambda_{\text{ex}})}$ é a eficiência quântica no comprimento de onda da excitação;

$K_{(\lambda)}$ representa as variações instrumentais que irão influenciar as intensidades emitidas; $\varepsilon_{(\lambda_{ex})}$ é o coeficiente de absortividade molar no comprimento de onda de excitação; L é o caminho óptico a ser percorrido; e C é a concentração da espécie química luminescente.

Os sensores ópticos, podem ainda, estar livres de um marcador fluorescente para identificação das moléculas alvos, sendo desta forma conhecidos como sensores livres de etiqueta ou label-free. Neste, não ocorre marcação de biomoléculas, e estas são detectadas na sua forma natural.¹¹⁹

Há ainda os sensores baseados em reflexão, que utilizam a reflexão da luz incidente para a determinação da concentração da espécie de interesse. Neste tipo de sensor, o fenômeno de reflexão da luz incidente pode ocorrer por dois diferentes processos (reflexão difusa ou reflexão especular), conforme discutido anteriormente. A escolha do processo reflexivo a ser utilizado dependerá da fase sensora e/ou do arranjo óptico a ser usado para as análises.

1.10.5 Sensores em formato “U”

O desenvolvimento de sensores baseado em fibras ópticas tem sido largamente utilizado em diversas áreas, já que as fibras, conforme já descrito anteriormente, apresentam imunidade a interferência eletromagnética e temperatura, baixo custo, baixa atenuação, sendo uma ótima opção de escolha em relação aos sensores convencionais. Mesmo com todas estas vantagens, a sensibilidade na região de detecção nas fibras pode ser aperfeiçoada, pela modificação da sua geometria.

Diferentes geometrias de sensores confeccionados com as fibras são conhecidas: retas, em “U”, ponta cônica e cones bicônicos, todos utilizados no desenvolvimento de sensores baseados em absorbância.¹²⁶

Um destaque especial ocorre quando são desenvolvidos sensores com fibras em “U”, uma vez que estas são facilmente reproduzíveis, altamente sensíveis (quando comparada com as fibras retas). O processo de dobra é fácil, sendo que a fibra dobrada

nesta geometria em “U”, conhecida como “U-Bent”, apresenta uma melhora de 10 vezes na sensibilidade da absorbância em comparação com as fibras retilíneas.^{126,127}

Isto pode ser justificado devido à maior profundidade de penetração do campo evanescente na região de curvatura em “U” e maior direção para a propagação da luz.^{127,128}

Esta profundidade de penetração é descrita pela teoria das ondas. Observa-se que as propriedades da luz no núcleo da fibra são determinadas pelos números de modos (N). Por exemplo, em fibras monomodos, como a utilizada nesta tese, a luz no interior do núcleo, propaga-se em apenas um modo. No entanto, com a mudança geométrica ou mudança no índice de refração, esta fibra monomodo se comporta como uma fibra multimodo, e a transmissão passa a ocorrer por vários modos, aumentando assim a porção da onda evanescente. E com isso, ocorre o aumento na resposta do dispositivo construído.¹²⁹

1.10.6 Imobilização de reagentes em fibras ópticas

A imobilização dos reagentes na superfície da fibra óptica pode ser feita de diferentes modos, usando adsorção, oclusão ou atração eletrostática, ou mesmo ligações covalentes.^{123,130}

A adsorção é mais comumente usada, uma vez que é simples de execução e apresenta baixo custo. No entanto, a grande desvantagem desse tipo de imobilização está na possibilidade de lixiviação do reagente, uma vez que este está fracamente ligado ao material suporte e pode ser desprendido facilmente.¹²³

Já a imobilização por oclusão, o reagente, por não ser lixiviado com facilidade, permanece mais tempo preso ao material polimérico, acarretando maior tempo de resposta do sensor.¹²³

E por fim, a imobilização por ligação covalente, considerada mais adequada e eficiente, sendo geralmente a escolhida dentre as várias formas de imobilização pois esta apresenta menores perdas do reagente por lixiviação. Neste tipo de imobilização, diversos

materiais poliméricos são utilizados para imobilizar covalentemente o reagente, oferecendo sensores químicos com tempos de resposta mais curtos, além de vida útil longa e elevada estabilidade.¹²³ Entre os reagentes mais imobilizados em suporte sólidos têm sido os materiais poliméricos hidrofóbicos e vários tipos de celulose.¹¹⁷

Quando os polímeros são utilizados sobre materiais sólidos, observa-se uma maior seletividade de permeação para certas espécies enquanto favorecem a rejeição para outras substâncias.¹³¹

1.10.7 Materiais poliméricos imobilizados em fibras ópticas

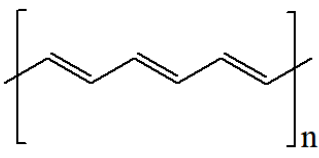
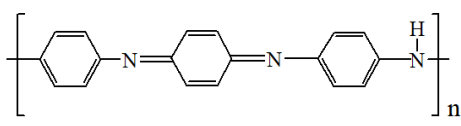
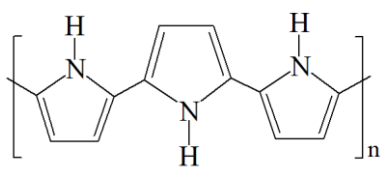
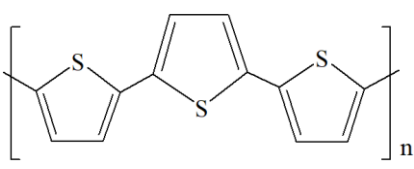
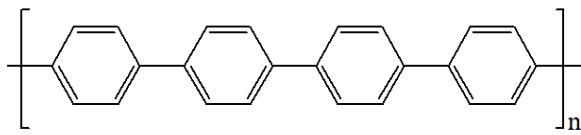
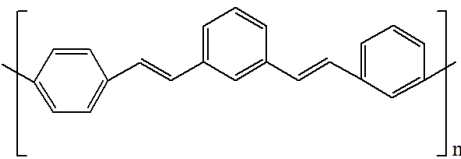
Na década de 70 foi iniciado o estudo de modificações nos polímeros que permitiriam a condução de corrente elétrica, chamando atenção de diversos pesquisadores.¹³²

Esses polímeros condutores, comumente chamados de “metais sintéticos”, têm se destacado por apresentarem propriedades elétricas, magnéticas e ópticas de metais semicondutores.¹³³ Outro termo muito usado para designar esses polímeros, são “polímeros conjugados”, já que apresentam longas cadeias com ligações C=C conjugadas. O fato de possuírem ligações C=C conjugadas permitem que fluxos de elétrons sejam criados, e em determinadas condições, o polímero pode ser oxidado ou reduzido, de forma a convertê-lo em material semicondutor ou condutor.¹⁸

Os polímeros conjugados, podem ser sintetizados por três diferentes formas de polimerização: química, eletroquímica e fotoeletroquímica. Dentre estas, a mais utilizada pela indústria é a química, uma vez que apresenta a possibilidade de produção em larga escala.¹³³

No Quadro 4 são apresentados os polímeros mais utilizados, bem como, suas condutividades.¹³³

Quadro 4 - Estrutura e condutividade dos principais polímeros condutores^{132, 133}

Polímero condutor	Estrutura	Condutividade (S cm⁻¹)
Poliacetileno		1,00 x 10 ³ – 1,00 x 10 ⁶
Polianilina		10,0 – 1,00 x 10 ³
Polipirrol		600
Politiofeno		200
Poli(<i>p</i> -fenileno)		500
Poli(<i>p</i> -fenileno vinileno)		1,00

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Dentre todos os polímeros destacados anteriormente, a polianilina (PANI), tem recebido maior atenção nas últimas décadas, por apresentar boa estabilidade em condições ambientais (tais como, pH e temperatura), fácil obtenção, baixo custo, maior possibilidade de utilização, além de excelentes propriedades condutoras.¹³⁴

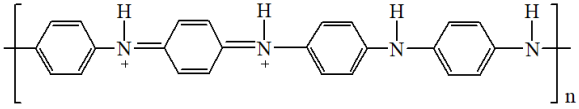
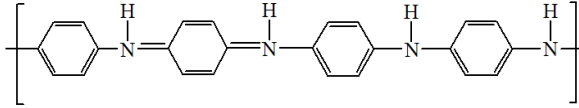
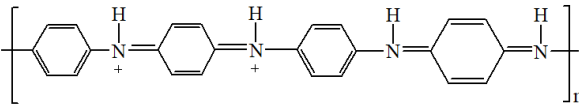
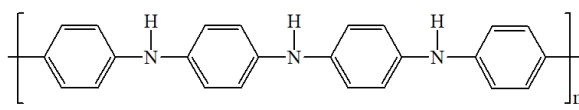
Desta forma, a PANI, tem sido comumente utilizada no desenvolvimento de biossensores, dispositivos fotovoltaicos, transistores, eletrodos usados em baterias, dentre outras aplicações.¹³³ A PANI e seus derivados, com relação ao processo de modificação, formam uma outra classe de polímeros condutores. A modificação por protonação, por exemplo, não altera o número de elétrons associados a cadeia polimérica. Neste processo, os grupos iminos, podem estar totalmente ou parcialmente protonados dependendo do pH da solução, o que propiciará na formação de polímeros com diferentes propriedades condutoras.¹³⁵

Talvez uma das principais características da PANI se concentra na capacidade deste material em exibir diferentes colorações, dependendo do pH da solução ou do potencial elétrico quando aplicado, tornando facilmente distinguível a fase condutora presente.¹³⁵

A PANI pode ser obtida por polimerização química, pela oxidação da anilina em meio ácido. Quando oxida-se a anilina, em presença de ácidos fortes, obtém-se a polianilina na sua forma mais condutora, chamada sal de esmeraldina, que possui cor verde. Isto ocorre, pois quando utiliza-se de ácidos que contenham ânions e solventes capazes de interagir com estes ânions, as cadeias poliméricas formadas, assumem a forma estendida, facilitando assim o transporte de carga, e conseqüentemente, aumentam a condutividade.¹³²

Os principais estados de oxidação da polianilina, encontram-se descritos no Quadro 5.¹³³

Quadro 5 - Polianilina em diferentes estados de oxidação¹³³

Estado de oxidação da polianilina	Estrutura química	*Coloração	Característica condutora
Sal de esmeraldina		Verde	Condutora (parcialmente oxidada)
Base de esmeraldina		Azul	Isolante (parcialmente oxidada)
Pernigranilina		Púrpura	Isolante (completamente oxidada)
Leucoesmeraldina		Amarela	Isolante (completamente reduzida)

Dado: *Cor determinada no comprimento de onda da absorção máxima

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Desta forma o desenvolvimento de dispositivos que usem as propriedades condutoras dos polímeros são uma alternativa no desenvolvimento de sensores.

1.11 FIGURAS DE MÉRITO OU DE QUALIDADE DE UM MÉTODO DE ANÁLISE

Durante o desenvolvimento de um novo método de análise, alguns cuidados devem ser levados em consideração como forma de assegurar que os dados obtidos estejam em consonância com as agências regulamentadoras. Este processo, na grande maioria das vezes, é longo e laborioso. A avaliação das figuras de mérito de um método de análise (conhecido também como validação ou avaliação das figuras de mérito do método) é o ato pelo qual os métodos analíticos desenvolvidos são avaliados, como forma de comprovar que esse método está apto para ser utilizado para o uso pretendido.

O processo de validação visa atender a requisitos específicos das agências reguladoras, sendo estas as responsáveis por estabelecerem os parâmetros utilizados para tais avaliações. No Brasil, as principais agências responsáveis por estabelecerem os padrões de validação, são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹³⁶ e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)¹³⁷, que disponibilizam alguns guias de validação. A nível internacional, os órgãos regulamentadores mais conhecidos são a União de Química Pura e Aplicada (IUPAC)¹³⁸, US EPA⁴ e FDA¹³⁹.

Cabe ressaltar, que embora estes sejam os principais órgãos regulamentadores, o protocolo de validação pode sofrer pequenas variações dependendo da matriz a ser analisada.

Alguns dos parâmetros que são avaliados pela maioria das agências regulamentadoras são o limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa linear de trabalho, precisão intra e inter-dia, recuperação e análise estatística. A seguir, estes serão abordados baseando-se na ANVISA¹³⁶, IUPAC¹³⁸, INMETRO¹³⁷ e FDA¹³⁹.

1.11.1 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para os cálculos dos LD e LQ, nesta tese, usaram-se as diretivas supracitadas, sendo o LQ determinado como a menor concentração a oferecer um desvio-padrão

relativo (DPR) inferior a 15 %, sendo neste caso, considerado o primeiro ponto da curva analítica. Já o LD foi determinado a partir da razão entre o valor de LQ e dividido por três representando a menor concentração do analito determinado na amostra, e com DPR inferior a 20 %.^{138,139}

1.11.2 Precisão intra e inter-dia

O cálculo da precisão é de extrema importância para avaliação da qualidade do método, uma vez que essa exprime a proximidade dos resultados após uma série de análises realizadas, além de demonstrar a dispersão dos resultados de uma mesma amostra ou amostras semelhantes.¹³⁷ Geralmente, o cálculo da precisão é realizado pela análise do desvio-padrão ou desvio-padrão relativo das medidas de pelo menos três replicatas.¹³⁷

A precisão intra-dia, também conhecida como repetibilidade, consiste na avaliação da concordância dos resultados obtidos em um curto período, utilizando sempre as mesmas condições de análise e o mesmo operador. No caso desta tese, para avaliação da precisão intra-dia, o cálculo foi realizado no mesmo dia e usando sempre três replicatas. Cabe ressaltar, que o valor máximo de DPR % depende da faixa de concentração estudada, sendo que em baixas concentrações maiores valores de DPR % são toleráveis. Algumas normativas de órgãos oficiais recomendam de forma geral, valores máximos aceitáveis de DPR % entre 10 - 20 %.^{136, 139}

Já a precisão inter-dia, é avaliada de forma semelhante a precisão intra-dia, com diferença que essa é feita em dias alternados, e se possível, por analistas diferentes.^{137,138}

1.11.3 Linearidade e Faixa de Trabalho

Segundo o INMETRO, a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação do método, além de ser responsável pela determinação da massa ou concentração da espécie de interesse.¹³⁷ Dentro dessa faixa, pode existir uma faixa sendo observado uma resposta

linear, conhecida como linearidade, e o sinal analítico é proporcional a massa ou concentração do analito. Para estudo da linearidade, recomenda-se o uso de cinco ou seis concentrações diferentes.¹³⁷ A avaliação da linearidade envolve o uso de um gráfico que fornecerá a resposta em função da concentração do analito. Matematicamente falando, uma equação da reta é obtida, obtendo dados relevantes, como por exemplo, a sensibilidade do método desenvolvido. Além disso, uma correlação entre os dados obtidos e o modelo são avaliados, pelo chamado coeficiente de determinação (R^2), que indica quanto próximos os pontos estão da linha de regressão. R^2 próximo de um, indica um ajuste perfeito.¹⁴⁰

Uma outra maneira de avaliar a linearidade do método é através da padronização por adição de padrão. Esta é usada quando se têm matrizes complexas e/ou quando há interferência causada pela interação entre o analito e a matriz a ser analisada. Nesta os analitos são adicionados diretamente à amostra com concentrações e volumes conhecidos, de modo a obter uma reta. Para obter a concentração do analito na amostra inicial, realiza-se a extrapolação da reta $y = ax + b$, até que esta toque o eixo da abscissas (eixo x), fazendo-se $y = 0$. Assim, a concentração inicial relativa do analito será determinada.¹³⁷

1.11.4 Recuperação

A recuperação do método visa avaliar a eficiência do método de preparo de amostra utilizado, ao adicionar certa quantidade conhecida de massa do mesmo analito. Recomenda-se realizar a fortificação em pelo menos três níveis diferentes de concentração. Considera-se uma recuperação satisfatória, se esta variar de 70 a 120 %, podendo obviamente, ocorrerem exceções que devem ser analisadas caso a caso.¹³⁷ Para o cálculo da recuperação usou-se a Equação (13).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (13)$$

Sendo C_1 a concentração do analito na amostra fortificada,

C_2 é a concentração do analito na amostra não-fortificada,

C3 é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada,

1.11.5 Avaliação do método

Como forma de avaliar resultados obtidos em diferentes equipamentos, testes estatísticos são usados, para assegurar que os dados apresentam concordância. Um dos testes é a Análise de Variância (ANOVA).¹⁴⁰ Esta é uma ferramenta estatística utilizada para comparação de vários grupos, sendo possível investigar se há ou não falta de ajuste do modelo, por meio da comparação entre valores obtidos e tabelados de F.¹³⁷ O nível de confiança é determinado pelo analista, sendo o mais comumente utilizado, o nível de 95 %. Não havendo falta de ajuste, pode-se inferir que a equação obtida é linear e está apta para ser utilizada na quantificação das amostras.¹³⁷

Outro teste muito utilizado para validação de métodos é o teste-t de Student, que estabelece se há ou não diferenças significativas entre as médias dos métodos usados para análise.¹⁴⁰

Referências

- 1 BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; RODRIGUES, J. A. GDME-based methodology for determination of free formaldehyde in cosmetics and hygiene products containing formaldehyde releasers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 6873 – 6880, 2018.
- 2 LAVILLA, I.; CABALEIRO, N.; PENA, F.; L CALLE, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted emulsification microextraction with simultaneous derivatization coupled to fibre optics-based cuvetteless UV–vis micro-spectrophotometry for formaldehyde determination in cosmetic samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 59 – 63, 2010.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-29.pdf> . Acesso em: 03 nov. 2021.
- 4 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Disponível em: <https://www.epa.gov/formaldehyde>. Acesso em: 03 nov. 2021.
- 5 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 nov. 2021.
- 6 LAMARCA, R. S.; LUCHIARI, N. C.; BONJORNO, A. F.; PASSARETTI FILHO, J.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. F. Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. **Analytical Methods**, v. 11, p. 3697– 3705, 2019.
- 7 C. LV, C.; HOU, J.; XIE, W.; CHENG, H. Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 474 – 478, 2015.
- 8 BARRETO, D. N.; CONRADO, J. A. M.; LAMARCA, R. S.; BATISTA, A. D.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. F.; PETRUCI, J. F. S. UV/Vis-based optical sensors for gaseous and volatile analytes. **Encyclopedia of Sensors and Biosensors Edited By Roger Narayan**, 2021.
- 9 FERREIRA, R. C.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, P. J.; RODRIGUES, J. A. Application of gas-diffusion microextraction to solid samples using

the chromatographic determination of α -diketones in bread as a case study. **Analyst**, v. 140, p. 3648 – 3653, 2015.

10 RAMOS, R. M., GONÇALVES, L. M., VYSKOČIL, V., RODRIGUES, J. A. Voltammetric determination of trace amounts of diacetyl at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode following gas-diffusion microextraction. **Talanta**, v. 169, p. 203 – 208, 2017.

11 RODRIGUES, J. A., GONÇALVES, L. M., PACHECO, J. G., BARROS, A. A. (inventors). Módulo extractor e processo de extracção de espécies voláteis e semi-voláteis baseado em difusão gasosa. PT Patent 104789, 2011.

12 DE LIMA, L. F.; BRANDÃO, P. F.; DONEGATTI, T. A.; RAMOS, R. M.; GONÇALVES, L. M.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A.; RODRIGUES, J. A. 4-hydrazinobenzoic acid as a derivatizing agent for aldehyde analysis by HPLC-UV and CE-DAD. **Talanta**, v. 187, p.113 – 119, 2018.

13 BRANDAO, P. F., RAMOS, R. M., ALMEIDA, P. J., RODRIGUES, J. A. Determination of carbonyl compounds in cork agglomerates by GDME-HPLC-UV: Identification of the extracted compounds by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1037 – 1042, 2017b.

14 ZHU, S.; DONG, B.; WU, Y.; BU, L.; ZHOU, S. Degradation of carbamazepine by vacuum-UV oxidation process: Kinetics modeling and energy efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 178 – 185, 2019.

15 NAIDOO, S.; OLANIRAN, A. O. Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 11, n. 1, p. 249 – 270, 2014.

16 LI, S.; CHEN, J.; HU, S.; WANG, H.; JIANG, W.; CHEN, X. Facile construction of novel Bi₂WO₆/Ta₃N₅ Z-scheme heterojunction nanofibers for efficient degradation of harmful pharmaceutical pollutants. **Chemical Engineering Journal**, v. 402, n. 126165, 2020.

17 RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; FERRO-GARCÍA, M. A.; PRADOS-JOYA, G.; OCAMPO-PÉREZ, R. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n.7, p. 1268 – 1287, 2013.

18 LEEPHOON, B.; ONG, C. C.; SAHEED, M. S. M.; SHOW, P.-L.; CHANG, J. -S.; LING, T. C.; LAM, S. S.; JUAN, J. C. Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, n. 122961, 2020.

19 ELMOWAFY, M.; SHALABY, K.; BADRAN, M. M.; ALI, H. M.; ABDEL-BAKKY, M. S.; IBRAHIM, H. M. Multifunctional carbamazepine loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 550, p. 359 – 371, 2018.

20 ALI, F.; KHAN, J. A.; SHAH, N. S.; SAYED, M.; KHAN, H. M. Carbamazepine degradation by UV and UV-assisted AOPs: Kinetics, mechanism and toxicity investigations. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 117, p. 307 – 314, 2018.

21 NKOOM, M.; LU, G.; LIU, J.; YANG, H.; DONG, H. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 11 – 18, 2019.

22 KHAZRI, H.; HASSINE, S. B.; GHORBEL-ABID, I.; KALFAT, R.; TRABELSI-AYADI, M. Presence of carbamazepine, naproxen, and ibuprofen in wastewater from northern Tunisia. **Environmental Forensics**, v. 20, p. 121 – 128, 2019.

23 HE, K.; BLANEY, L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 96 – 105, 2015.

24 SUN, Z.-L.; SUN, S.-C.; HE, J. -M.; LAN, J. -E.; GIBBONS, S.; MU, Q. Synergism of sophoraflavanone G with norfloxacin against effluxing antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, n° 106098, 2020.

25 EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, Suppl. S1, p. 13 – 20, 2003.

26 LI, N.; LIU, H.; XUE, Y.; WANG, H.; DAI, X. Partition and fate analysis of fluoroquinolones in sewage sludge during anaerobic digestion with thermal hydrolysis pretreatment. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 715 – 721, 2017.

- 27 TEGLIA, C. M.; PEREZ, F. A.; MICHLIG, N.; REPETTI, M. R.; GOICOECHEA, H. C.; CULZONI, M. J. Occurrence, distribution, and ecological risk of fluoroquinolones in rivers and wastewaters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 2305 – 2313, 2019.
- 28 KAUR, G.; KAUR, M.; SHARAD, L.; BANSAL, M. Theoretical molecular predictions and antimicrobial activities of newly synthesized molecular hybrids of norfloxacin and ciprofloxacin. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 225 – 237, 2019.
- 29 LAMARCA, R. S.; DE FARIA, R. A. D.; ZANONI, M. V. B.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor. **RSC Advances**, v. 10, p. 1838 – 1847, 2020.
- 30 SALAHUDDIN, N.; ABDELWAHAB, M.; GABER, M.; ELNEANAIEY, S. Synthesis and design of norfloxacin drug delivery system based on PLA/ TiO₂ nanocomposites: Antibacterial and antitumor activities. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, n. 110337, 2020.
- 31 PERUCHI, L. M.; FOSTIER, A. H.; RATH, S. Sorption of norfloxacin in soils: Analytical method, kinetics and Freundlich isotherms. **Chemosphere**, v. 119, p. 310 – 317, 2015.
- 32 PUBCHEM. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 03 mar. 2021.
- 33 SCIFINDER. Disponível em: <https://sso-cas.ez87.periodicos.capes.gov.br/as/>. Acesso em: 03 mar. 2021.
- 34 MONTAGNERA, C. C.; VIDALA, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analítico, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094 – 1110, 2017.
- 35 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) - Safe Drinking Water Act. Disponível em: <https://www.epa.gov/sdwa>. Acesso em: 03 fev. 2021.
- 36 WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL FROM OFFICE FOR EUROPE. Water and Sanitation. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health->

topics/environment-and-health/water-and-sanitation/water-and-sanitation. Acesso em: 03 fev. 2021.

37 LIMA GOMES, P. C. F. **Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra na determinação de fármacos no ambiente**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

38 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA) - Atlas Esgoto, Situação da Coleta e do Tratamento de Esgotos. Disponível em: <http://atlasesgotos.ana.gov.br/>. Acesso em: 03 fev. 2021.

39 BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL. Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-esgotamento-sanitario>. Acesso em: 03 fev. 2021.

40 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Disponível em: <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/bastre.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2021.

41 CHRISTOFILOPOULOU, S.; KALIAKATSOS, A.; TRIANTAFYLLOU, K.; GOUNAKI, I.; VENIERI, D.; KALOGERAKIS, N. Evaluation of a constructed wetland for wastewater treatment: Addressing emerging organic contaminants and antibiotic resistant bacteria. **New Biotechnology**, v. 52, p. 94 –103, 2019.

42 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, 2007.

43 CAMPANHA, M. B.; AWAN, A. T.; DE SOUSA, D. N. R.; GROSSELI, G. M.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936 – 7947, 2015.

44 SODRÉ, F. F.; CAVALCANTI, C. M. P. Method development for assessing carbamazepine, caffeine, and atrazine in water sources from the Brazilian Federal District using UPLC-QTOF/MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1–10, 2018.

- 45 BIEL-MAESO, M.; CORADA-FERNÁNDEZ, C.; LARA-MARTÍN, P. A. Monitoring the occurrence of pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed wastewater. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 312 – 321, 2018.
- 46 MANSOUR, N. M.; EL-SHERBINY, D. T.; IBRAHIM, F. A.; EL SUBBAGH, H. I. Development of an inexpensive, sensitive and green HPLC method for the simultaneous determination of brivaracetam, piracetam and carbamazepine; application to pharmaceuticals and human plasma. **Microchemical Journal**, v. 163, n. 105863, 2021.
- 47 MARTINS, A. F.; VASCONCELOS, T. G.; HENRIQUES, D. M.; FRANK, C. S.; KÖNIG, A.; KÜMMERER, K. Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 36, n. 3, p. 264 – 269, 2008.
- 48 RODRIGUES-SILVA, C.; PORTO, R. S.; DOS SANTOS, S. G.; SCHNEIDER, J.; RATH, S. Fluoroquinolones in hospital wastewater: analytical method, occurrence, treatment with ozone and residual antimicrobial activity evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1447 – 1457, 2019.
- 49 BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil. **Environmental Technology**, v. 42, n. 15, p. 2292 – 2303, 2021.
- 50 PAVÃO, D.P.; BOTELHO, C. N.; FERNANDES, R. N.; DOS SANTOS, C. C.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. A simple, cost-effective, and environmentally friendly method for determination of ciprofloxacin in drugs and urine samples based on electrogenerated chemiluminescence. **Electroanalysis**, v. 32, p. 1498 – 1506, 2020.
- 51 JANK, L.; HOFF, R. B.; DA COSTA, F. J.; PIZZOLATO, T. M. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 1013 – 1037, 2014.
- 52 GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173 – 188, 2013.

53 KAFAEI, R.; PAPARI, F.; SEYEDABADI, M.; SAHEBI, S.; TAHMASEBI, R.; AHMADI, M.; SORIAL, G. A.; ASGARI, G.; RAMAVANDI, B. Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 703 – 712, 2018.

54 AL-TAMRAH, S. A.; ABDALLA, M. A.; AL-OTIBI, A. A. Spectrophotometric determination of norfloxacin using bromophenol blue. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, p. 3993 – 3997, 2019.

55 THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2012) National Formulary 35, United States Pharmacopeia Convention Inc., 30th Ed.

56 BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2.

57 RABELO, P.; COSTA-RAMA, E.; SEGURO, I.; PACHECO, J. P.; NOUWS, H. P. A.; CORDEIRO, M. N. D. S.; DELERUE-MATOS, C. Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, n. 112719, 2021.

58 MOTIA, S.; TUDOR, I. A.; RIBEIRO, P. A.; RAPOSO, M.; BOUCHIKHI, B.; EL BARI, N. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for sensitive triclosan detection in wastewater and mineral water. **Science of The Total Environment**, v. 664, p. 647 – 658, 2029.

59 XIE, W.; ZHANG, J.; YANBO ZENG, Y.; WANG, H.; YANG, Y.; ZHAI, Y.; MIAO, D.; LI, L. Highly sensitive and selective detection of 4-nitroaniline in water by a novel fluorescent sensor based on a molecularly imprinted poly(ionic liquid). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 5653 – 5661, 2020.

60 LAMARCA, R. S.; FRANCO, D. F.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Label-free ultrasensitive and environment-friendly immunosensor based on a silica optical fiber for the determination of ciprofloxacin in wastewater samples. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 21, p. 14415 – 14422

61 EID, S. M.; KELANI, K. M.; BADRAN, O. M.; REZK, M. R.; ELGHOBASHY, M. R. Surface enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) as a green analytical chemistry approach: Coating of recycled aluminum TLC sheets with citrate capped silver nanoparticles for chemometric quantitative analysis of ternary mixtures as a green alternative to the traditional methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 1117, p. 60 – 73, 2020.

62 HOLKEM, A. P.; VOSS, M.; SCHLESNER, S. K.; HELFER, G. A.; COSTA A. B.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; MELLO, P. A. A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v. 289, n. 119941, 2021.

63 BOOBPHAHOM, S.; LY, M. N.; SOUM, V.; PYUN, N.; KWON, O. -S.; RODTHONGKUM, N.; SHIN, K. Recent advances in microfluidic paper-based analytical devices toward High-Throughput screening. **Molecules**, v. 25, n. 2970, 2020.

64 HAO, Z.; CHEN, H.; SHI, X.; TAN, W.; ZHU, G. Fabrication for paper based microfluidic analytical devices and saliva analysis applications. **Microfluid Nanofluid**, v. 25, n. 80, 2021.

65 ZHOU, W.; DOU, M.; TIMILSINA, S. S.; XU, F.; LI, X. J. Recent innovations in cost-effective polymer and paper hybrid microfluidic devices. **Lab Chip**, v. 21, p. 2658 – 2683, 2021.

66 SILVA, M. L. S. Microfluidic devices for glycobiomarker detection in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 521, p. 229 – 243, 2021.

67 PARK, E.; LIM, S. Dynamic phase control with printing and fluidic materials' interaction by inkjet printing an RF sensor directly on a stereolithographic 3D printed microfluidic structure. **Lab Chip**, v. 21, p. 4364 – 4378, 2021.

68 ALAHMAD, W.; SAHRAGARD, A.; VARANUSUPAKUL, P. An overview of the recent developments of microfluidic paper-based analytical devices for the detection of chromium species. **Microchemical Journal**, v. 170, n. 106699, 2021.

69 FENG, L. -X.; TANG, C.; HAN, X. -X.; ZHANG, H. -C.; GUO, F. -N.; YANG, T.; WANG, J. -H. Simultaneous and sensitive detection of multiple small biological molecules by microfluidic paper-based analytical device integrated with zinc oxide nanorods. **Talanta**, v. 232, n. 122499, 2021.

70 NOVIANA, E.; CARRÃO, D. B.; PRATIWI, R.; HENRY, C. S. Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1116, p. 70 – 90, 2020.

71 FERNANDES, G. M.; SILVA, W. R.; BARRETO, D. N.; LAMARCA, R. S.; LIMA GOMES, P. C. F.; PETRUCI, J. F. S.; BATISTA, A. D. Novel approaches

for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187 – 203, 2020.

72 VORÁČOVÁ, I.; PŘIKRYL, J.; NOVOTNÝ, J.; DATINSKÁ, V.; YANG, J.; ASTIER, Y.; FORET, F. 3D printed device for electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.1154, n. 338246, 2021.

73 FATONI, A.; AZIZ, A. N.; ANGGRAENI, M. D. Low-cost and real-time color detector developments for glucose biosensor. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 28, n. 100325, 2020.

74 MAŠKOVÁ, T.; HÁRENDARČÍKOVÁ, L.; PETR, J. Determination of *Escherichia coli* in urine using a low-cost foil-based microfluidic device. **Talanta**, v. 170, p. 36 – 40, 2017.

75 BERNARD, P.; MENDEZ, J. D. Low-cost 3D-printed polarimeter. **Journal of Chemistry Education**, v. 97 (4), p. 1162 – 1166, 2020.

76 SOUSA, A. C. R.; MAKARA, C. N.; BRAZACA, L. C.; CARRILHO, E. A colorimetric microfluidic paper-based analytical device for sulfonamides in cow milk using enzymatic inhibition. **Food Chemistry**, v. 356, n ° 129692, 2021.

77 HAMZAH, H. H. B.; KEATTCH, O.; COVILL, D.; PTAEEL, B. A. The effects of printing orientation on the electrochemical behaviour of 3D printed acrylonitrile butadiene styrene (ABS)/carbon black electrodes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 9135, 2018.

78 KO, C. -H.; LIU, C. -C.; CHEN, K. -H.; SHEU, F.; FU, L. -M.; CHEN, S. -J. Microfluidic colorimetric analysis system for sodium benzoate detection in foods. **Food Chemistry**, v. 345, n ° 128773, 2021.

79 PASSARETTI FILHO, J.; COSTA, M. A. M.; CARDOSO, A. A. A micro-impinger sampling device for determination of atmospheric nitrogen dioxide. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 19, p. 2597 – 2603, 2019.

80 SANTOS, V. B.; DA SILVA, E. K. N.; DE OLIVEIRA, L. M. A.; SUAREZ, W. T. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 285, p. 340 – 346, 2019.

81 LUIZ, V. H. M.; LIMA, L. S.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 43 – 48, 2019.

82 PASSARETTI FILHO, J.; VALENTE JUNIOR, M. A. G.; DE LIMA GOMES, P. C. F.; FUGIVARA, C. S.; CARDOSO, A. A. Determination of Fe(III) using digital images: study of corrosion in steel plates using a polyester laser printed device. **Analytical Methods**, v. 9, p. 655 – 663, 2017.

83 MEI, Q.; JING, H.; LI, Y.; YISIBASHAER, W.; CHEN, J.; LI, B. N.; ZHANG, Y. Smartphone based visual and quantitative assays on upconversional paper sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 427 – 432, 2016.

84 BENEDETTI, L. P. S.; SANTOS, V.B.; SILVA, T. A.; BENEDETTI FILHO, E.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7 p. 4138 – 4144, 2015.

85 KANCHI, S.; SABELA, M. I.; MDLULI, P. S.; INAMUDDIN; BISETTY, K. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 136 – 149, 2018.

86 MCCracken, K. E.; YOON, J-Y. Recent approaches for optical smartphone sensing in rein resource-limited settings: a brief review. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6591 – 6601, 2016.

87 GENG, Z.; ZHANG, X.; FAN, Z.; LV, X.; SU, Y.; CHEN, H. Recent progress in optical biosensors based on smartphone platforms. **Sensors**, v. 17, p. 1 –19, 2017.

88 ANSARI, N.; LODHA, A.; PANDYA, A.; MENON, S. K. Determination of cause of death using paper-based microfluidic device as a colorimetric probe. **Analytical Methods**, v. 9, p. 5632 – 5639, 2017.

89 ULEP, T. H.; YOON, J. Y. Challenges in paper-based fluorogenic optical sensing with smartphones. **Nano Convergence**, v. 5 (14), p. 1–11, 2018.

90 AXIS Communications. “CCD and CMOS sensor technology,” [Online]. Disponível em: https://www.axis.com/files/whitepaper/wp_ccd_cmos_40722_en_1010_lo.pdf . Acesso em: 03 fev. 2021.

- 91 CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; LÓPEZ-RUIZ, N.; MARTÍNEZ-OLMOS, A.; ERENAS, M. M.; PALMA, A. J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23 – 56, 2015.
- 92 PESSOA, K. D.; SUAREZ, W. T.; REIS, M. F.; FRANCO, M. O. K.; MOREIRA, R. P. L.; SANTOS, V. B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310 – 316, 2017.
- 93 YUSUFU, D.; MILLS, A. Spectrophotometric and digital colour colourimetric (DCC) analysis of colour-based indicators. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 273, p. 1187 – 1194, 2018.
- 94 LUIZ, V. H. M.; SARAIVA, L. M.; MARTINS, A. P.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Rapid determination of lead in progressive hair dye lotion by spot test/diffuse reflectance spectroscopy with a paper platform. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2137 – 2143, 2015.
- 95 ColorMeter RGB Hex Color Picker and Colorimeter by White Marten. Disponível em: <https://itunes.apple.com/us/app/colormeter-rgb-hex-color-picker-andcolorimeter/id713258885?mt=8>. Acesso em: 03 fev. 2021.
- 96 LAMARCA, R. S.; LIMA GOMES, P. C. F. A low cost method for carbamazepine, ciprofloxacin and norfloxacin determination in pharmaceutical formulations based on spot-test and smartphone images. **Microchemical Journal**, v. 152, n. 104297, 2020.
- 97 DA SILVA, G. O.; ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L.C. Portable and low-cost colorimetric office paper-based device for phenacetin detection in seized cocaine samples. **Talanta**, v. 176, p. 674 – 678, 2018.
- 98 DOS SANTOS, V. B.; DA SILVA, E. K. N.; DE OLIVEIRA, L. M. A.; SUAREZ, W.T. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 285, p. 340 – 346, 2019.
- 99 RAVAZZI, C. G.; FRANCO, M. O. K.; VIEIRA, M. C. R.; SUAREZ, W. T. Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging. **Talanta**, v. 189, p. 339 – 344, 2018.

100 MARTINSEN, O. G.; GRIMNES, S. **Bioimpedance and Bioelectricity Basics**, Second Edition. 2 ed. London: Academic Press, 2008.

101 SOUZA, A. F. C. **Desenvolvimento de hardware para análise de bioimpedância em banda larga**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2017.

102 DE CARVALHO, L. A. **Investigação das propriedades eletroquímicas do sistema $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{(0,7-x)}\text{SnO}_2$ utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

103 FARIA, E. S. **Efeito do tempo de exposição nas temperaturas de 645 °C e 820 °C na corrosão localizada do aço inoxidável duplex uns S31803 avaliado por espectroscopia de impedância eletroquímica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica, Área: Materiais e Processos de Fabricação) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

104 PEJCIC, B.; MARCO, R. D. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 28, p. 6217 – 6229, 2006.

105 CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

106 SANTORO, P. A. **Uma análise de espectros de impedância utilizando o modelo de Poisson-Nernst-Planck com difusão anômala**. 2014. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

107 CHIAPPETTA FILHO, E. J. D. **Projeto e fabricação de um sistema sensor de espectroscopia de impedância eletroquímica**. 2014 Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica, Área: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica.) - Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

108 WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. 1 ed. São Paulo: EDUSP, 2002.

109 DE FARIA R. A. D.; MATENCIO, T.; MESSADDEQ, Y. Faradaic and non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy as transduction techniques for sensing applications. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 5, n. 1, p. 29 – 31, 2019.

110 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de mip (“molecularly imprinted polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087 – 1101, 2005.

111 SINGH, P. K.; JAIRATH, G.; AHLAWAT, S. S.; PATHERA, A.; SINGH, P. Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. **Journal of Food Science and Technology** v. 53, n. 4, p.1759 – 1765, 2016.

112 MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153 – 159, 2016.

113 TELES, F. S. R. R. **Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluido biológicos**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

114 JANSHOFF, A.; GALLA, H. -J.; STEINEM, C. Piezoeletronic mass-sensing devices as biosensors- an alternative to optical biosensors?. **Angewante Chemie International Edition**, v. 39, p. 4404 – 4032, 2000.

115 UETA, R. R. **A Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo da interface platina/ lectina**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

116 SHUKLA, S. K.; KUSHWAHA, C. S.; GUNER, T.; DEMIR, M. M. Chemically modified optical fibers in advanced technology: An overview. **Optics & Laser Technology**, v. 115, p. 404 – 432, 2019.

117 SOTOMAYOR, M. D. P. T. **Construção e aplicação de optodos em sistemas analíticos baseados em variações de pH**. 2000. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

118 RODRIGUES, D. M. C. **Desenvolvimento e caracterização de sensores a fibra óptica plástica para a refratometria baseados em modulação de amplitude**. 2013.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

119 ADDANKI, S.; AMIRI, I. S.; YUPAPIN, P. Review of optical fibers-introduction and applications in fiber lasers. **Results in Physics**, v. 10, p. 743 – 750, 2018.

120 THYAGARAJAN, K.; GHATAK, A. **Fiber optic essentials**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007. v. 10.

121 MANZO, N. R. **Monitoramento mecânico de tubos utilizando fibra óptica para a determinação de vazamentos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

122 BALAGEAS, D.; FRITZEN, C.-P.; GÜEMES, A. **Structural health monitoring**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2006. v. 90.

123 PINHEIRO, C. L.; RAIMUNDO JR, I. M. Uso de membranas de nafion para a Construção de sensores ópticos para Medida de pH. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 932 – 936, 2005

124 LIMA, K. M. G.; RAIMUNDO, I. M.; SILVA, A. M. S.; PIMENTEL, M. F. Sensores ópticos com detecção no Infravermelho Próximo e Médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1635 – 1643, 2009.

125 PAHURKAR, V. G.; TAMGADGE, Y. S.; GAMBHIRE, A. B.; MULEY, G. G. Evanescent wave absorption based polyaniline cladding modified fiber optic intrinsic biosensor for glucose sensing application. **Measurement**, v. 61, p. 9 – 15, 2015.

126 GAO, S. S. et al. Absorbance response of a graphene oxide coated U-bent optical fiber sensor for aqueous ethanol detection. **RSC Advances**, v. 6, p. 15808 – 15815, 2016.

127 SAI, V. V. R.; KUNDU, T.; MUKHERJI, S. Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2804 – 2809, 2009.

128 PAUL, D.; DUTTA, S.; SASHA, D.; BISWAS, R. LSPR based ultra-sensitive low cost U-bent optical fiber for volatile liquid sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 250, p. 198 – 207, 2017.

- 129 LEUNG, A.; SHANKAR, P. M.; MUTHARASAN, R. A review of fiber-optic biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 125, n. 2, p. 688 – 70, 2007
- 130 NOOR, N. S. M.; TAN, L. L.; HENG, L. Y.; CHONG, K. F.; TAJUDDIN, S. N. Acrylic microspheres-based optosensor for visual detection of nitrite. **Food Chemistry**, v. 207, p. 132 – 138, 2016.
- 131 YANAZ, Z.; FILIK, H. APAK, R. Development of an optical fibre reflectance sensor for lead detection based on immobilised arsenazo III. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, n. 1, p. 15 – 22, 2010.
- 132 VARGAS, V. M. M.; DALMOLIN, C.; PEZZIN, S. H.; OLIVEIRA, M. M.; PERALTA-ZAMORA, P. A polianilina no cenário ambiental: Uma abordagem sobre fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. 41, n. 3, p. 215 – 325, 2018.
- 133 FAEZ, R.; REIS, C.; DE FREITAS, P. S.; KOSIMA, O. K.; RUGGERI, G.; DE PAOLI, M. -A. Polímeros condutores. **Química Nova na Escola**, n. 11, p. 13 – 18, 2000.
- 134 MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 388 – 399, 1996.
- 135 MAIA, D. J.; De PAOLI, M. -A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 204 – 215, 2000.
- 136 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº 899 ANVISA, de 29 de maio de 2003**. Brasília, Série 1.
- 137 BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO), **Orientações sobre validação de ensaios químicos DOQ-CGCRE-088**. Rio de Janeiro, 2003.
- 138 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis** (IUPAC Technical Report), *Pure App. Chem.*, v. 74(5), p. 835 – 855, 2002.

139 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical method validation** – Guidance for industry. Rockville, 2018.

140 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Estatística e quimiometria para química analítica**. 6 ed. Canadá: Pearson Education Canadá, 2019.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM COSMÉTICOS

2 CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM COSMÉTICOS

2.1 INTRODUÇÃO

O formaldeído pode ser encontrado em ambientes internos, externos, materiais de construção, madeiras prensadas, produtos de higiene pessoal, além de cosméticos.¹

Este é um gás incolor de cheiro forte e capaz de provocar efeitos adversos, tais como irritação de olhos, nariz, boca, queimaduras de mucosas, alergias, dentre outros, na saúde do consumidor.^{1,2,3}

O formaldeído não é adicionado de forma direta às formulações, eles são liberados pelos conservantes utilizados pelas indústrias farmacêuticas, com a finalidade de manter as formulações mais estáveis e livres de crescimento por microrganismos.^{3,4}

As agências regulamentadoras ANVISA e US EPA estabelecem a concentração máxima permitida de formaldeído em cosméticos de 0,2 % (2.000 mg kg⁻¹), sendo que acima de 0,05 % (500 mg kg⁻¹), a frase “contém formaldeído”, deve estar evidenciada no rótulo do produto.^{5,6}

O monitoramento e doseamento de tal composto é extremamente importante, como forma de zelar pela saúde e bem-estar da população. Geralmente as técnicas mais empregadas para a análise de formaldeído são as técnicas espectrofotométricas e as técnicas cromatográficas.⁷⁻¹⁰

Pensando nisto, um método baseado em imagens digitais obtidas por smartphones foi desenvolvido para determinação de formaldeído em formulações cosméticas. O smartphone tem sido usado como dispositivo de captura de imagens, por possuírem câmeras de altíssima resolução, além de possibilitar análises remotas.

2.2 OBJETIVOS

Desenvolver um método de análise rápida baseado em imagens obtidas por smartphone para a determinação de formaldeído em cosméticos.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Instrumentação

Para a captação das imagens digitais, foi utilizado um smartphone modelo Moto G5 Plus XT 1683 (com abertura da lente de $f/1.7$), equipado com câmera traseira de 12 Mpx e sistema operacional Android. Nesse smartphone, foi instalado o aplicativo OpenCamera, para captação das imagens; com esse aplicativo é possível monitorar os elementos responsáveis pelas correções das imagens, tais como foco automático, flash, exposição automática (*automatic exposure*), alto alcance dinâmico (HDR) e macros. Em impressora 3D Cloner ST+, foram impressos spot-tests no polímero ácido polilático na cor branca. Os spot-tests apresentavam as dimensões de 1,9 x 1,9 cm, com 9 poços sendo cada poço com um volume interno de 8,00 μL e profundidade de 0,71 mm. O poço central, numerado de 1, sempre foi utilizado para acondicionar o branco da solução, e os demais poços de 2-9, contiveram as amostras e os pontos da curva analítica. Os spot-tests eram colocados em um suporte, de forma a inseri-los na parte inferior da caixa, sem a necessidade de remoção da tampa superior. Uma imagem do spot-test utilizado nas análises e do suporte está demonstrado na Figura 12.

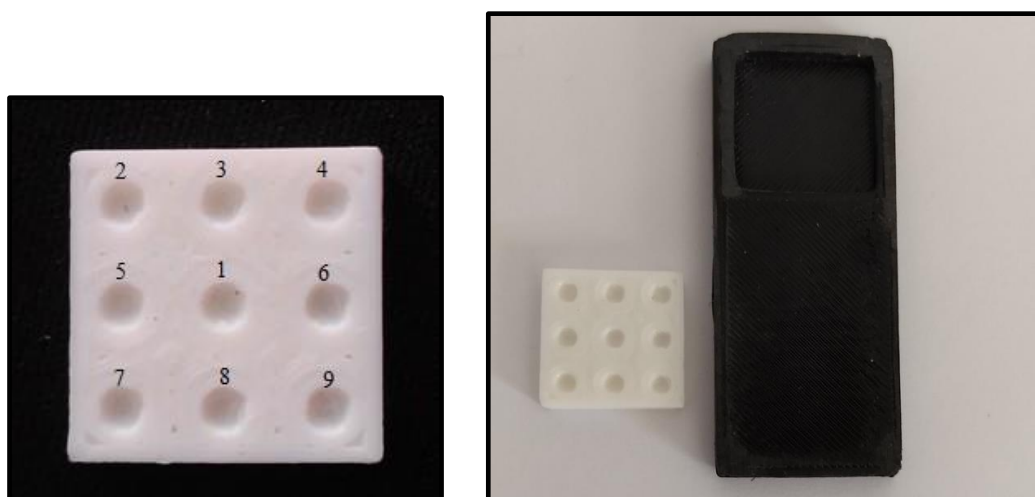


Figura 12 - Spot-test e suporte usados na captação das imagens digitais

Elaborada pela autora (2022).

Como forma de controlar a interferência pela luminosidade externa, foi impresso uma caixa em impressora 3D, usando o polímero PLA de cor preta, com 8,0 cm de diâmetro, e o spot-test foi inserido nessa caixa antes da captação das imagens digitais. Na parte superior desta caixa, como forma de manter a luminosidade em todas as fotos captadas, três LEDs brancos de alta intensidade em posição triangular foram fixados. Estes LEDs estavam conectados a uma fonte externa de 12 V. Desta forma, fez-se um orifício na parte superior da caixa, do tamanho exato da câmera do smartphone, e uma capa de celular foi fixada. Esta capa foi colada, de modo que todas as imagens fossem captadas pelo mesmo ângulo e na altura fixa de 10 cm. Esta altura, entre o spot-test e a câmera do smartphone foi a que apresentou maior repetibilidade entre as fotos, além de não provocar distorção nas imagens. Uma representação da caixa com todos os componentes é mostrada na Figura 13.

No momento anterior a captação das imagens, desativou-se o autofocus, HDR, flash e controle dos macros, com o aplicativo OpenCamera. Certificou-se ainda que a exposição automática estava desativada, uma vez que esta pode influenciar diretamente no ajuste da velocidade do obturador e abertura da lente, já que ela é a responsável pelo ajuste das condições de luminosidade no momento da captura das imagens. Isto se repetiu em todas as fotos ou imagens captadas. O aplicativo de domínio público ImageJ foi

utilizado para obter individualmente os valores dos canais RGB provenientes das imagens captadas.

Os dados obtidos por imagens digitais foram comparados com o método adotado como referência, para esta finalidade, foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800.

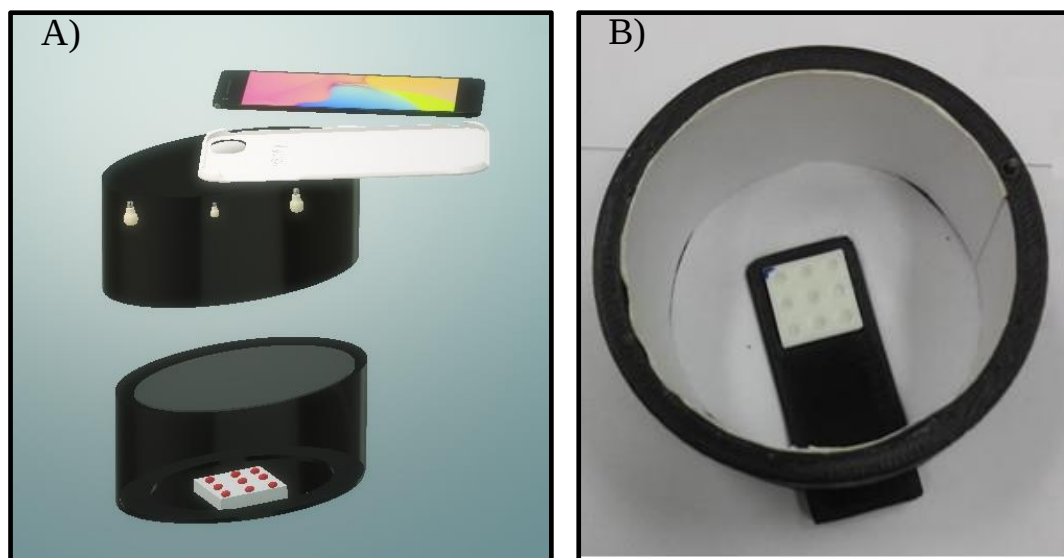


Figura 13 - (A) Projeto da caixa utilizada para manutenção da luminosidade durante a captura das imagens digitais; (B) Destaque do spot-test inserido na parte central da caixa

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

2.3.2 Reagentes e soluções

As soluções de acetato de amônio (98 %) e acetilacetona (99 %) foram adquiridas da Sigma-Aldrich. O formaldeído (37 % m/v) foi adquirido da Neon.

Uma solução estoque de formaldeído a $1,00 \text{ g L}^{-1}$ foi preparada em água ultrapura, sendo mantida sob refrigeração a 4°C por no máximo três dias. Uma solução derivatizante (0,1 % m/v de acetilcetona), foi preparada em água ultrapura pela adição de 0,100 mL de acetilcetona e 10,0 g de acetato de amônio, estocada longe da luz.

2.3.3 Aplicação do método desenvolvido nas formulações cosméticas

Produtos de higiene pessoal e cosméticos contendo prováveis formaldeído na composição cosmética foram obtidos no comércio local da cidade de Araraquara-SP. Um total de sete produtos foram adquiridos, sendo estes: um hidratante corporal, um condicionador de cabelo, um shampoo, um gel de banho, um creme para mãos e dois géis fixadores de cabelo.

Ressalta-se que em nenhum rótulo havia a descrição da frase “contém formaldeído”.

2.3.4 Determinação de formaldeído em amostras de produtos de cuidado pessoal

O procedimento para extração de formaldeído, baseou-se no estudo previamente descrito por Brandão et al (2017)¹¹. Inicialmente, foi avaliada a extração utilizando banho termostatizado e ultrassom, com e sem adição de água, além de diferentes tempos de agitação (10, 20 e 30 min). Após avaliação, foi obtida a condição ótima da extração por GDME. Uma solução estoque de formaldeído a $1,00 \text{ g L}^{-1}$ foi preparada em água ultrapura, sendo mantida sob refrigeração a 4°C por no máximo três dias. Uma solução derivatizante (0,1 % m/v de acetilcetona), foi preparada em água ultrapura pela adição de 0,100 mL de acetilcetona e 10,0 g de acetato de amônio, estocada longe da luz. A concentração da solução derivatizante foi escolhida após testes preliminares demonstrarem ser a melhor concentração capaz de proporcionar maior intensidade de cor, o que facilitava a captura das imagens digitais.

Um frasco do tipo Duran de 100 mL, foi usado na extração. Neste frasco, a massa fixa de 1,00 g de amostra foi pesada. Na tampa do frasco Duran, foi feito um orifício de 1,0 cm de raio. Uma membrana PTFE de poro de $1,0 \mu\text{m}$, 37 mm de diâmetro e espessura de 0,06 mm foi inserida entre a tampa e o frasco. Um total de sete amostras de produtos de cuidado pessoal foram analisadas, sendo dois diferentes géis fixadores de cabelo, um condicionador capilar, um hidratante corporal, um creme para mãos, um shampoo e um gel de banho. Em nenhuma das amostras analisadas havia a descrição recomendada pela

ANVISA de “contém formaldeído”. Uma imagem da adaptação do frasco Duran utilizado na extração, está demonstrada na Figura 14.

As curvas analíticas foram preparadas fortificando o formaldeído em água, na faixa de concentração 0,500 a 10,0 mg Kg⁻¹ (0,500 a 10,0 mg L⁻¹) (n = 7). Em seguida, foi realizada a GDME, seguindo o mesmo processo adotado para as amostras.



Figura 14 - Sistema utilizado na GDME aplicado na determinação de formaldeído

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

2.3.5 Figuras de mérito do método desenvolvido para determinação de formaldeído

O estudo da linearidade do método foi avaliado pelas triplicatas dos sete pontos da curva analítica (0,500 a 10,0 mg kg⁻¹), analisados por ambos os métodos (espectrofotometria e imagens digitais). Os métodos foram comparados ao nível de 95 % de confiança usando teste-t para confirmar a similaridade entre os resultados obtidos.

A repetibilidade (precisão intra-dia) do método foi avaliada pelo preparo de diferentes réplicas em triplicata da curva analítica na faixa de 0,500 a 10,0 mg kg⁻¹, preparadas no mesmo dia e expressas pelo desvio-padrão relativo (DPR %). A precisão inter-dia foi avaliada, em triplicatas, em três diferentes níveis de concentração (0,500; 2,00 e 8,00 mg kg⁻¹) preparadas em cinco diferentes dias.¹²

Foram avaliados o uso de dois diferentes celulares para captação de uma mesma imagem, e estas foram comparadas através do teste-t a 95% de confiança para verificar se havia ou não diferenças significativas. Avaliou-se ainda, através do teste-t a 95 % de confiança, as possíveis diferenças entre imagens enviadas por redes sociais (WhatsApp) e pela plataforma do gmail, provenientes da compactação dos arquivos no momento do envio.

O LQ e o LD do método foram avaliados, segundo US FDA.^{13,14} O LD foi determinado a partir da razão do LQ por um fator de três. Neste caso, adotou-se como critério, para o LQ, a menor concentração do analito quantificável com precisão e exatidão, obtendo o desvio padrão relativo inferior a 15 %, sendo adotado como o primeiro ponto da curva analítica. Enquanto o LD foi o menor valor detectável do analito com precisão e desvio padrão relativo inferior a 20 %.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Otimização das condições de extração do formaldeído

Foi avaliada a eficiência da extração utilizando banho termostatizado e ultrassom, conforme apresentado na Figura 15. A extração utilizando ultrassom e 1,00 mL de água produziu uma maior resposta analítica, e portanto, maior eficácia da extração do formaldeído, possivelmente pela formação das ondas ultrassônicas formadas que podem ter contribuído para a melhor homogeneidade das amostras durante os testes, já que as amostras de PCPs tinham consistências pastosas. Sabe-se que o formaldeído é solúvel em água e poderiam ser observadas uma perda de sinal quando fosse adicionado água, isso de fato ocorreu conforme observado na Figura 15, quando se utilizou banho termostatizado. Ao usar o ultrassom, esta perda de sinal não foi observada, fato que motivou a escolha do ultrassom.

Como o ultrassom ofereceu melhores resultados, foi avaliado o tempo de extração usando uma amostra de gel capilar fortificada com 6,00 mg kg⁻¹ de formaldeído. O tempo

de 30 min apresentou o melhor resultado, sendo escolhido para ser usado. Tempos acima de 30 min, não foram avaliados já que poderiam tornar o método muito longo.

O processo de análise dessas amostras, procedeu-se pela utilização de uma massa fixa de 1,00 g de amostra pesada e inserida dentro do frasco Duran, seguida da adição de 1,00 mL de água para facilitar a homogeneização da amostra. Sobre a membrana, 0,500 mL de solução derivatizante foi adicionada. O sistema foi levado ao banho ultrassônico por 30 min a 60 °C. Em seguida, recolheu-se o extrato, e este foi armazenado longe da luz, em uma caixa vedada por uma hora, para finalização da reação, e a intensificação da coloração amarela. Transcorrido esse tempo, a amostra foi diluída em balão volumétrico de 2,00 mL a 1:20 (amostra/água) como forma de adequar a faixa linear do método. Foram então captadas as imagens das soluções após estas serem transferidas para os poços presentes no spot-test, e os dados obtidos foram comparados com método espectrofotométrico monitorando o comprimento de onda de 412 nm. A calibração por adição de padrão foi feita em algumas amostras para avaliar o efeito de matriz.

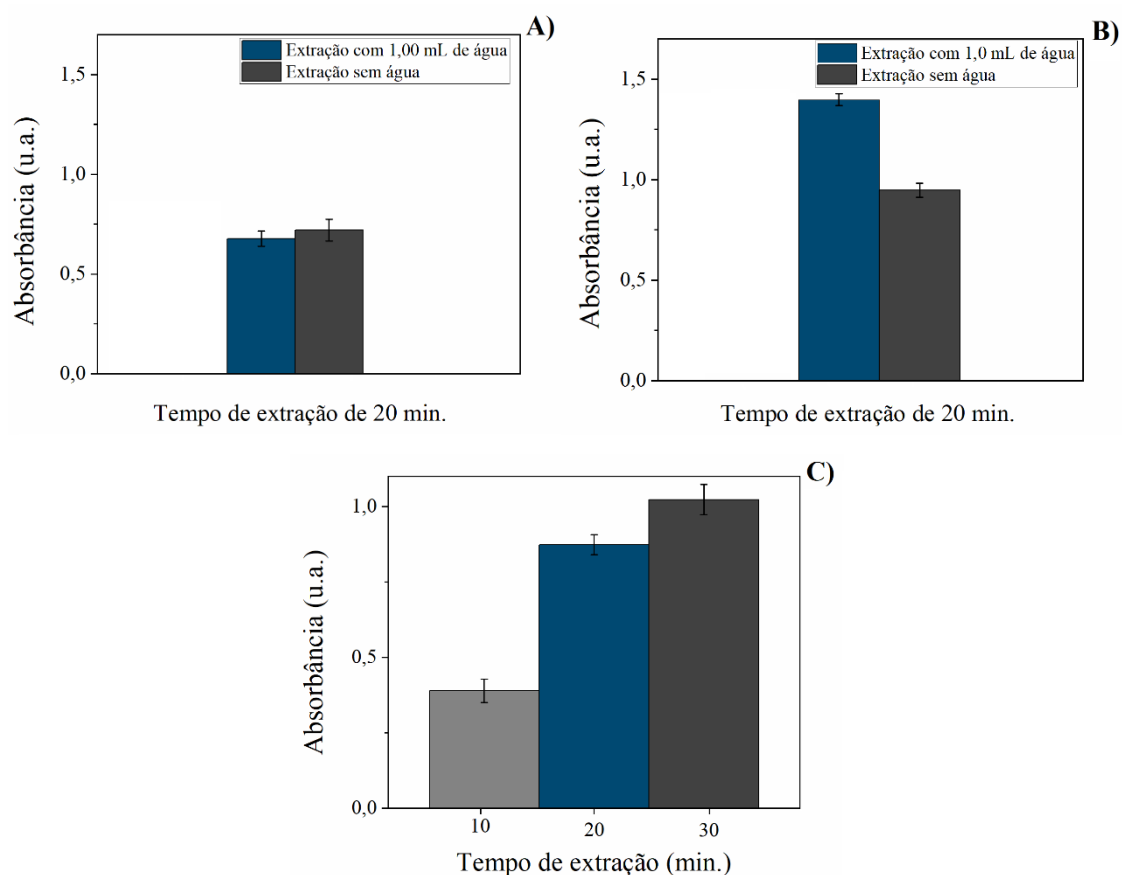


Figura 15 - Otimização de extração de formaldeído usando a GDME e derivatização com acetilcetona. (A) Extração térmica; (B) Extração em ultrassom; (C) Tempo de extração usando ultrassom

Fonte: Retirada de Lamarca et al. (2019).¹⁵

2.4.2 Figuras de mérito do método

Para avaliação da linearidade do método, as curvas analíticas foram preparadas em água, para em seguida, fazer a extração por GDME no intervalo de 0,500 – 10,0 mg kg⁻¹. As imagens das curvas analíticas foram captadas pelo smartphone (Figura 16 A)), e tratadas no software ImageJ, sendo selecionado o canal do sistema RGB complementar a cor observada, e que forneceu maior resposta analítica, neste caso o canal B (Figura 16 B)) e em seguida aplicou-se a Lei de Lambert-Beer, sendo I o sinal obtido no canal selecionado anteriormente, e I₀ o sinal do branco. A região de interesse (ROI), foi a

mesma para todas as análises, conforme observado na Figura 16 C). Após esta etapa, as curvas analíticas obtidas pelos dispositivos digitais foram construídas e comparadas com o método de referência.

Antes da captura de todas as imagens digitais, foram realizados testes nos spot-tests como forma de certificar que estes não apresentavam nenhum tipo de vazamento que pudesse comprometer a captura das imagens.

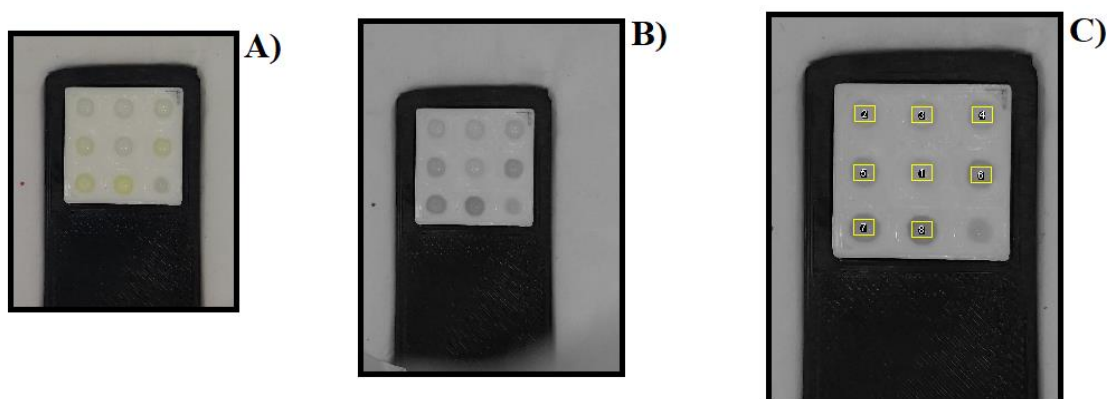


Figura 16 - (A) Spot-test contendo a curva analítica obtida para o formaldeído usando imagens digitais e extração por GDME na concentração de 0,500 a 10,0 mg kg⁻¹; (B) Seleção do canal B feito no software ImageJ para obtenção do sinal analítico; (C) Região de interesse (ROI) presente em cada poço do spot-test e usada para obtenção do sinal analítico

Fonte: Retirada de Lamarca et al. (2019).¹⁵

As figuras de mérito obtidas por ambos os métodos encontram-se resumidas na Tabela 2. Os maiores DPR % obtidos nas precisões intra e inter-dia pelo método usando as imagens digitais pode estar associado à variações do caminho óptico dentro dos poços do spot-test usado para a captura das imagens digitais, uma vez que as superfícies inferiores desses poços podem apresentar irregularidades pela própria limitação da impressora 3D, além disso pode ter ocorrido evaporação de parte da solução usada para as análises durante o tempo em que o spot-test esteve em contato com o ar atmosférico no momento da captação das imagens, já que os volumes dos poços do spot-test são

baixos (8,00 μL) fato que pode ter contribuído para a rápida evaporação. Além disso, deve-se levar em consideração a limitação da faixa dinâmica de 8 bits para cada canal RGB do filtro de Bayer presente nos smartphones que utilizam os sensores CMOS que limita o LD e favorecem a maiores erros no processo.

Deve-se ressaltar que os valores obtidos de LD e LQ, foram alcançados após a diluição em 1:20 (amostra/água), no entanto estes valores podem aumentar ou diminuir conforme as diluições usadas e amostras analisadas.

Tabela 2 - Dados obtidos referentes aos parâmetros das figuras de mérito do método

	Equação da regressão	LD (mg kg⁻¹)	LQ (mg kg⁻¹)	Inter-dia (DPR %)	Intra-dia (DPR %)
Espec.	$A = 8,03 \times 10^{-2}[\text{Form.}] + 1,60 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,998$	0,150	0,500	7,25	3,34
Smart.	$A = 1,05 \times 10^{-2} [\text{Form.}] - 3,10 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,997$	0,200	0,500	11,2	9,33

Fonte: Retirada de Lamarca et al. (2019).¹⁵

Foi avaliada a falta de ajuste por meio da ANOVA a 95 % de confiança, e para ambos os métodos na faixa de 0,500 – 10,0 mg kg⁻¹, não foi evidenciado falta de ajuste. Para o método desenvolvido por imagens digitais $F_{\text{cal}} (0,914) < F_{\text{tab } 95 \%} (2,86)$ e para o método adotado como referência $F_{\text{cal}} (0,00614) < F_{\text{tab } 95 \%} (2,86)$.¹⁶

No teste-t a 95 % de confiança, as imagens digitais adquiridas por diferentes smartphones, não apresentaram resultados diferentes, uma vez que $p\text{-valor} (0,560) > \alpha (0,0500)$, indicando equivalência entre os dados obtidos.^{12, 16}

E finalmente, o teste-t a 95 % de confiança, demonstrou que o envio de imagens por redes sociais apresentava diferenças significativas, como esperado. As imagens enviadas por WhatsApp tiveram $p\text{-valor} (0,005) < \alpha (0,05)$. Isto está associado a compressão da imagem para redução do tamanho e rapidez no envio. Já a imagem enviada por e-mail, não foi observada diferença significativa, já que o $p\text{-valor} > \alpha (0,05)$.

Sabe-se que a reação envolvendo formaldeído e acetilcetona em presença de excesso de sais de amônio é altamente seletiva, e envolve a formação do produto 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina.¹⁷⁻¹⁹ Este produto apresenta coloração amarela que é facilmente detectado a 412 nm.

Segundo a EPA, o acetaldeído é considerado um interferente nesse tipo de reação, quando o mesmo se encontra presente em concentrações acima de 50,0 mg kg⁻¹. Nas amostras analisadas, o formaldeído estava em concentrações abaixo desta determinação, o que possibilitou as análises.

A reação entre o formaldeído e acetilcetona, em presença de sais de amônio, apresentou estabilidade por no máximo 120 min, após este tempo foi verificado redução no sinal analítico. Esta reação é amplamente relatada na literatura desde 1950, por apresentar elevada seletividade. Uma proposta de reação encontra-se na Figura 17.

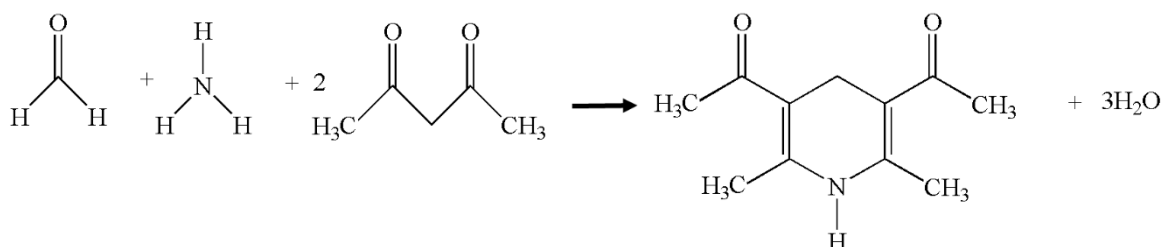


Figura 17 - Proposta de reação entre formaldeído e acetilcetona em presença de sais de amônio

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Conforme já era esperado, a curva analítica obtida por espectrofotometria apresentou maior sensibilidade quando comparada com a curva analítica obtida por imagens digitais (Figura 18), isto pode estar associado a configuração do espectrofotômetro em diferenciar pequenas modificações nas cores.

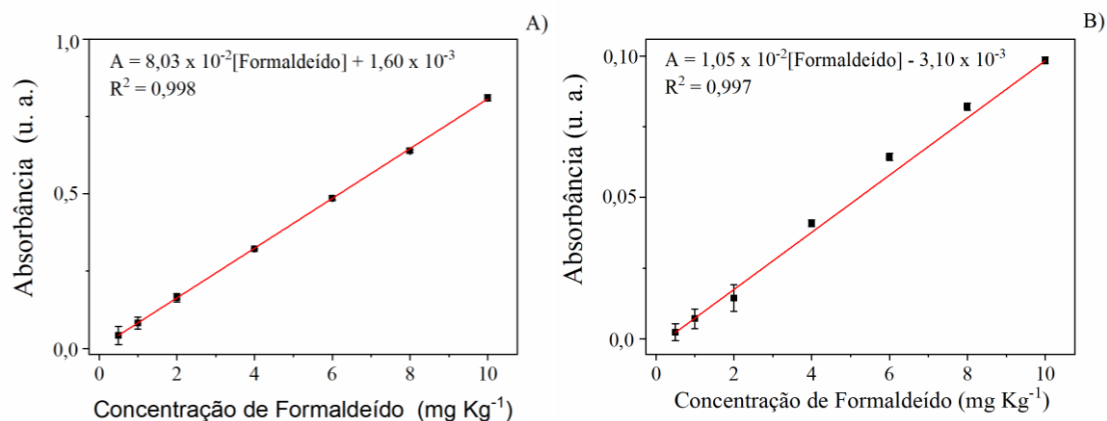


Figura 18 - Curvas analíticas obtidas para o formaldeído com detecção por: (A) Espectrofotometria; (B) Smartphone

Fonte: Retirada de Lamarca et al. (2019).¹⁵

Para avaliar se havia diferenças estatísticas entre os dados obtidos pelos diferentes métodos, o teste-t a 95 % de confiança foi realizado obtendo p -valor $(0,831) > \alpha (0,05)$, evidenciando não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos por espectrofotometria e imagens digitais.

2.4.3 Determinação de formaldeído nas amostras de produtos de cuidado pessoal

Para avaliar o efeito de matriz, o método de adição de padrão foi aplicado, e os resultados obtidos por este foram comparados aos resultados da curva analítica feita em água. Ambos os métodos apresentaram o mesmo valor, demonstrando o efeito mínimo de matriz.

No Quadro 6 são apresentados os resultados obtidos para as amostras analisadas em triplicata de PCPs e os respectivos DPR %. Observa-se elevados valores de DPR % em ambas as metodologias empregadas nas análises e isto pode estar relacionado a complexidade da matriz analisada, além disso, ressalta-se que estas amostras foram analisadas em triplicatas e possivelmente um número maior de análises poderia ter proporcionado menores valores de DPR %.

Quadro 6 - Determinação de formaldeído em amostras de PCPs

Amostras	Tipo de formulação	Conservante	Imagens digitais (mg kg⁻¹) ± DPR %	Espectrof. (mg kg⁻¹) ± DPR %
Gel fixador A	Gel	Diazolidinil ureia	3,11 ± 6,56	4,07 ± 5,95
Gel fixador B	Gel	Poliquartenium 10	< LQ	0,880 ± 8,02
Hidratante corporal	Loção	DMDM hidantoína	4,21 ± 7,44	4,02 ± 7,98
Creme para mãos	Creme	DMDM hidantoína	ND	ND
Condicionador	Gel	DMDM hidantoína	ND	ND
Shampoo	Gel	DMDM hidantoína	2,13 ± 6,72	1,65 ± 5,27
Gel de banho	Gel	DMDM hidantoína	ND	ND

Dado: ND = não detectado

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2019).¹⁵

Os dados obtidos pelo método desenvolvido, foram ainda comparados com diferentes artigos publicados previamente e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação de diferentes métodos aplicados na análise de formaldeído em PCPs

Técnica utilizada	LD	LQ	Amostra requerida para análise	Tempo de análise	Referência
HPLC-DAD-UV-Vis	5,10 µg L ⁻¹	1,70 µg L ⁻¹	0,100 g	0,50 min.	7
Espectrofotômetro	1,98 mg kg ⁻¹	6,60 mg kg ⁻¹	0,250 g	1,0 min.	3
Paper spray-MS	0,800 µg L ⁻¹	NR	12,0 µL	4,0 min.	20
Smartphone	0,200 mg kg ⁻¹	0,500 mg kg ⁻¹	1,00 g	16 seg.*	Método desenvolvido

Dados: NR = não reportado.

*Tempo de reação não considerado.

Fonte: Retirada de Lamarca et al. (2019).¹⁵

Conforme observado na Tabela 3, o método proposto nesta tese foi o que apresentou o menor tempo de análise, possibilitando maior número de análises em poucos minutos. Ressalta-se que a etapa prévia de preparo de amostra não foi levada em consideração, considerou-se apenas o tempo necessário para a realização das análises das amostras, ou seja, o tempo necessário para a captura das imagens digitais.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido para as análises usando imagens digitais, mostrou-se uma alternativa de baixo custo, ambientalmente amigável, com baixo consumo de reagentes, diminutos resíduos, além de não oferecer diferentes resultados quando comparados aos métodos clássicos de análises.

A reação de derivatização com acetilcetona aumentou a eficiência de extração, além de proporcionar seletividade ao processo de extração.

A GDME mostrou-se uma técnica viável para extração tanto de amostras sólidas, quanto líquidas, além de ser relativamente rápida e oferecer resultados repetíveis.

O volume de 8,00 μL utilizado para as análises, apresenta um significativo avanço nos moldes propostos pela química verde.

Os spot-tests confeccionados em impressora 3D, apresentaram custo final de aproximadamente R\$ 3,00, considerado extremamente baixo, além de poderem ser lavados e utilizados novamente para inúmeras análises. A caixa também confeccionada em impressora 3D, mostrou-se eficiente para o controle da iluminação e radiação externa, e os LED proporcionaram homogeneidade de iluminação, sem oferecer sombra ou excesso de brilho.

Referências

- 1 MARTÍNEZ-AQUINO, C.; COSTERO, A. M.; GIL, S.; GAVIÑA, P. Resorcinol functionalized gold nanoparticles for formaldehyde colorimetric detection. **Nanomaterials**, v. 9 (2), n. 302, 2019.

- 2 KIM, J.; CUI, T. "Formaldehyde gas sensor based on hybrid film: Graphene / enzyme," 2019 20ª Conferência Internacional sobre Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII), p. 2396 – 2399, 2019.

- 3 BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; RODRIGUES, J. A. GDME-based methodology for the determination of free formaldehyde in cosmetics and hygiene products containing formaldehyde releasers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 6873 – 6880, 2018.

- 4 LÓPEZ-SÁNCHEZ, L.; MIRALLES, P.; SALVADOR, A.; MERINO-SANJUÁN, M.; MERINO, V. In vitro skin penetration of bronidox, bronopol and formaldehyde from cosmetics, Regulatory Toxicology and Pharmacology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 122, n. 104888, 2021.

- 5 BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução da diretoria colegiada-RDC no 162, September 11, 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alisantes>. Acesso em: 03 nov. 2021.

- 6 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Facts About Formaldehyde. Disponível em: <https://www.epa.gov/formaldehyde/facts-about-formaldehyde>. Acesso em: 04 nov. 2021.

- 7 LV, C.; SUN, J.; CHENG, H. Determination of formaldehyde residue in cosmetics by short-column high performance liquid chromatography with mass spectrometric confirmation. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1630 – 1634, 2015.

- 8 DOI, T.; KAJIMURA, K.; TAGUCHI, S. Survey of formaldehyde (FA) concentration in cosmetics containing FA-donor preservatives. **Journal of Health Sciences**, v. 56, p. 116 – 122, 2010.

- 9 MIRALLES, P.; CHISVERT, A.; ALONSO, M. J.; HERNANDORENA, S.; SALVADOR, A. Determination of free formaldehyde in cosmetics containing

formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1543, p. 34 – 39, 2018.

10 TEMEL, N. K.; GÜRKAN, R. Combination of ultrasound assisted cloud-point extraction with spectrophotometry for extraction, preconcentration, and determination of low Levels of free formaldehyde from cosmetic products. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 101 (6), p.1763 – 1772, 2018.

11 BRANDÃO, P. F.; RAMOS, R. M.; VALENTE, I. V.; ALMEIDA, P. J.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; RODRIGUES, J. A. Gas diffusion microextraction coupled with spectrophotometry for the determination of formaldehyde in cork agglomerates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 2885 – 2892, 2017.

12 MILLER, J. N.; MILLER, J. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6 ed. Canada: Pearson Education Canada, 2010.

13 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical method validation** – Guidance for industry. Rockville, 2018.

14 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis** (IUPAC Technical Report), *Pure App. Chem.*, v. 74(5), p. 835 – 855, 2002.

15 LAMARCA, R. S; LUCHIARI, N. C.; BONJORNO, A. F.; PASSARETTI FILHO, J.; CARDOSO, A. A.; LIMA GOMES, P. C. F. Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. **Analytical Methods**, v. 11, p. 3697– 3705, 2019.

16 ALI, Z.; BHASKAR, S. B. Basic statistical tools in research and data analysis. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 60, p. 662 – 669, 2016.

17 NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 416 – 421, 1953.

18 BELMAN, S. The fluorimetric determination of formaldehyde. **Analytica Chimica Acta**, v. 29, p. 120 – 126, 1963.

19 SAWICKI, E.; CARNES, R. A. Spectrophotofluorimetric determination of aldehydes with dimedone and other reagents. **Microchimica Acta**, v. 56, n. 1, p. 14 – 159, 1968.

20 SONG, W.; WANG, Y.; HUANG, L.; CHENG, H.; WU, J.; PAN, Y. Reactive paper spray mass spectrometry for rapid analysis of formaldehyde in facial masks. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 33, p. 1091 – 1096, 2019.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, CIPROFLOXACINA E NORFLOXACINA EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS

3 CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE CARBAMAZEPINA, CIPROFLOXACINA E NORFLOXACINA EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS

3.1 INTRODUÇÃO

Desde sua síntese, em 1953 por Walter Schindler, a CBZ, tem sido amplamente administrada para o tratamento da epilepsia e neuralgia do trigêmeo, além de ser utilizada como medicamento de segunda linha para o transtorno bipolar.¹

Após a administração a CBZ é metabolizada quase completamente pelo corpo humano, e já foram documentados pelos menos 30 metabólitos diferentes desse fármaco.¹ A excreção ocorre pelas fezes e pela urina, em porcentagens de 28 % e 72 %, respectivamente.² Na urina, cerca de 1 % é excretada na forma do metabólito ativo, carbamazepina-10,11- epóxido.

Segundo dados do “*Global Burden of Disease*”, em 2016, a epilepsia afetou cerca de 46 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo essa uma grande responsável pela incapacidade e mortalidade de grande parte da população.³

Os pacientes epiléticos, são profundamente afetados pela concentração da carbamazepina no sangue, já que necessitam do uso diário e crônico, para evitar convulsões recorrentes, que podem levar a perda da saúde, tal como a mortalidade prematura, além de complicações de natureza biológica, social e psicológica.⁴ Desta forma, é de extrema importância o monitoramento de CBZ nas formulações farmacêuticas, como forma de manter uma qualidade de vida para os portadores da epilepsia.

O uso dos antibióticos se popularizou nas últimas décadas, por oferecem mínimos efeitos colaterais e alta eficácia no combate de infecções de diversas origens. Estima-se que até o ano de 2030 o consumo mundial anual de antibióticos ultrapasse 200.000 toneladas.⁵

A CIP, é um desses antibióticos, usada desde 1987, apresenta amplo espectro, inibindo tanto bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, e apresentando um efeito antibacteriano notável.⁶ No entanto, a CIP tende a apresentar um tempo de meia-vida curto, necessitando o uso repetido, a fim de manter as dosagens apropriadas no local-alvo.⁷ A CIP é excretada, principalmente, nas fezes e urina, 72 % é excretada na sua forma não-metabolizada, e 20 % é excretada pelas fezes e urina, em quatro metabólitos majoritários.⁵

A NOR, assim como a CIP, é uma fluoroquinolona da segunda geração, também amplamente prescrito para o tratamento de diversas infecções. A NOR, apresenta uma meia-vida de aproximadamente de 3 a 4 h no soro e no plasma, com biodisponibilidade oral de 30 – 40 % em uma única dose de 200 a 400 mg.^{8,9}

A excreção da NOR, ocorre principalmente pela urina e fezes, sendo na urina, a excreção em forma de NOR de 26 – 32 %, 30 % são excretadas nas fezes, além de 5 – 8 % excretadas na forma de seis metabólitos de menor atividade antimicrobiana.¹⁰

As análises de formulações farmacêuticas, geralmente envolvem técnicas cromatográficas, ou mesmo, o uso de técnicas espectrofotométricas ou espectrofluorimétricas. Todas estas consomem elevada quantidade de reagentes químicos, e conseqüentemente, geram grandes volumes de resíduos químicos, sendo essencial a busca por novos métodos com desempenho similar às técnicas citadas e que tenham baixo custo, gerando reduzido volume de resíduos químicos.

3.2 OBJETIVOS

Desenvolver um método baseado em imagens captadas por smartphone para determinação de carbamazepina, ciprofloxacina e norfloxacina em amostras farmacêuticas.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Instrumentação

Para a captação das imagens digitais, foi utilizado um smartphone modelo Moto G5 Plus XT 1683 (com abertura da lente de $f/1.7$), equipado com câmera traseira de 12 Mpx e sistema operacional Android. Nesse smartphone, foi instalado o aplicativo OpenCamera, para captação das imagens; com esse aplicativo é possível monitorar os elementos responsáveis pelas correções das imagens, tais como foco automático, alto alcance dinâmico (HDR), flash, exposição automática (*automatic exposure*) e macros.

Os demais parâmetros, foram seguidos igualmente ao descrito no Capítulo 2.

3.3.2 Reagentes e soluções

O hidrogênio ftalato de potássio, ácido clorânico (37 % m/m) e ácido fórmico foram obtidos pela Synth.

CIP ($\geq 98\%$), NOR ($\geq 98\%$), alaranjado de metila, etanol e cloreto férrico anidro foram adquiridas da Sigma-Aldrich. A CBZ ($\geq 99\%$) foi adquirida da Toronto Research Chemicals. O metanol foi obtido da J. T. Baker.

Para o preparo de todas as soluções diluídas, utilizou-se água ultrapura.

3.3.3 Aplicação do método desenvolvido nas formulações farmacêuticas

Em uma farmácia da cidade de Araraquara-SP foram adquiridas duas caixas das formulações farmacêuticas de CBZ (200 mg), CIP (500 mg) e NOR (400 mg), totalizando 20 comprimidos cada.

3.3.4 Reações colorimétricas aplicadas na determinação dos fármacos CBZ, CIP e NOR em formulações farmacêuticas

Para determinar CBZ, foi adaptado o método desenvolvido por Prabhakar, Patel e Giridhar (1999)¹¹. Para isto, inicialmente uma solução etanólica de alaranjado de metila (0,10 % m/v) foi preparada, em seguida foi diluída em água ultrapura na razão 1:50. Esta última solução, foi misturada a uma solução tampão de biftalato de potássio 0,200 mol L⁻¹ pH 4,0 na proporção de 5:2 (v/v), respectivamente. Para a curva analítica, foram usadas alíquotas de CBZ, preparadas previamente em metanol, obtendo a concentração de 1.000 mg L⁻¹, e pequenas alíquotas desta solução estoque foram adicionadas em balões volumétricos de 5,00 mL, que já continham a mistura alaranjado de metila diluído (1:50) e tampão biftalato de potássio. A curva analítica foi construída na faixa de concentração de 5,00 a 60,0 mg L⁻¹ (em triplicata). À medida que maiores alíquotas de CBZ foram adicionadas, observou um decaimento da coloração laranja da solução. As soluções foram inseridas no spot-test, e as imagens foram captadas pelo smartphone, e os dados obtidos foram comparados usando um método espectrofotométrico adotado como referência. O branco foi preparado da mesma forma, exceto pela adição da solução estoque de CBZ.

Para a determinação da CIP, foi adaptado o método desenvolvido por Sultan e Suliman (1992)¹², usando uma solução aquosa de cloreto férrico 1,0 % (m/m), e alíquotas fixas de 350 µL desta solução foram transferidas para balões volumétrico de 5,00 mL, reagindo com a CIP (preparada previamente em metanol, com adição de 50,0 µL de ácido fórmico e concentração final de 1.000 mg L⁻¹). A curva analítica foi construída na faixa de concentração de 3,00 – 35,0 mg L⁻¹ (em triplicata). Inicialmente, foi observado uma coloração amarela, que se acentuou com o aumento da concentração de CIP. O branco, seguiu o mesmo procedimento, exceto pela adição da CIP. O método foi captado por imagens digitais e os dados obtidos foram comparados usando a espectrofotometria como método de referência.

Já para a NOR, foi adaptado o trabalho desenvolvido por Liming, Qingqin e Jianmei (2003)¹³. Previamente, foi preparado uma solução aquosa de ácido clorânico a 1,0 % (m/m) e 1,00 mL desta solução foi transferida para balões de 5,00 mL, em conjunto com alíquotas de NOR (preparada previamente em metanol com adição de 50,0 µL de ácido fórmico e concentração final de 1.000 mg L⁻¹), tendo o volume do balão completado

com água ultrapura. A curva analítica foi construída na faixa de concentração de 3,00 – 40,0 mg L⁻¹ (em triplicata). O branco seguiu o mesmo modo de preparo, exceto pela adição de NOR. As imagens foram captadas por smartphone e os dados obtidos foram comparados com método espectrofotométrico adotado como referência.

3.3.5 Aplicações dos métodos colorimétricos

Em todas as formulações analisadas, seguiu-se as diretrizes descritas pela farmacopeia Brasileira, a respeito do procedimento para o doseamento dos fármacos.¹⁴

A massa individual de cada comprimido de cada formulação farmacêutica foi mensurada em balança analítica, em seguida fez-se o cálculo do peso médio dos comprimidos. Um total de 20 comprimidos foram então macerados e estocados em dessecador até o momento da análise.

Para o doseamento da CBZ, pesou-se cerca de 50,0 mg dos comprimidos macerados, e os transferiu para balão de 100,0 mL, contendo 70,0 mL de metanol, deixando no ultrassom durante 30 min. Após este tempo, o volume foi completado com metanol e filtrado em filtro de papel quantitativo de 0,20 mm. Foi adicionado 50,0 µL do filtrado, em balões de 5,00 mL, seguido da adição da solução de alaranjado de metila/tampão biftalato de potássio 0,200 mol L⁻¹ pH 4,0 (realizados em triplicata). As soluções obtidas foram transferidas para o spot-test, as imagens foram captadas usando smartphone, os dados comparados com método espectrofotométrico adotado como referência monitorando o comprimento de onda de 472 nm.¹⁴

Para a CIP, uma massa de 1,25 g dos comprimidos foi transferida para um balão de 500,0 mL, contendo 400,0 mL de água ultrapura, sendo colocado em agitação ultrassônica durante 30 min até a solubilização total. Em seguida, foi filtrado a solução em filtro de papel quantitativo de 0,20 mm, e 40,0 µL do filtrado foi reagido 350 µL de cloreto férrico 1,0 % em balão de 5,00 mL. O volume foi então completado com água ultrapura. A solução foi transferida para o spot-test para obter as imagens digitais, e os dados obtidos foram comparados com método espectrofotométrico monitorando o comprimento de onda de 445 nm.¹⁴ Isto foi feito em triplicata (n = 3).

E finalmente para a NOR, 50,0 mg dos comprimidos triturados foram transferidos para balão de 100,0 mL contendo 50,0 mL de ácido clorídrico 0,100 mol L⁻¹. A solução foi levado ao ultrassom por 15 min, em seguida, filtrada em papel de filtro quantitativo 0,20 mm. Foi transferido para balão de 5,00 mL, 100 µL do filtrado e 1,00 mL de ácido cloranílico 1,0 %, o volume do balão foi completado com água ultrapura.¹⁵ Após esta etapa, a solução foi transferida para o spot-test para obter as imagens digitais, e os dados obtidos foram comparados com método espectrofotométrico monitorando o comprimento de onda de 530 nm. Isto foi feito em triplicata (n = 3).

Para todos os cálculos envolvendo as reações colorimétricas, foi utilizada a Equação (2).

3.3.6 Figuras de mérito do método desenvolvido

A repetibilidade do método (precisão intra-dia) e precisão inter-dia, ambos expressos em percentual do desvio padrão relativo (DPR %), além de análise de variância (ANOVA) e teste-t a 95 % de confiança na comparação dos dados obtidos foram aplicados. Para a precisão intra-dia, foram realizadas três repetições (n = 3) das curvas analíticas no mesmo dia, na faixa de 5,00 - 60,0 mg L⁻¹ para a CBZ; 3,00 - 35,0 mg L⁻¹ para CIP e 3,00 - 40,0 mg L⁻¹ para NOR. Já para precisão inter-dia, preparou-se três diferentes níveis de concentração das curvas analíticas em diferentes dias, sendo estas concentrações baixa, média e alta, as concentrações estudadas foram: CBZ 5,00; 20,0; 60,0 mg L⁻¹, CIP 5,00; 20,0 e 35,0 mg L⁻¹ e para a NOR 5,00, 15,0 e 40,0 mg L⁻¹.

O LQ e LD do método foram avaliados, segundo US – FDA^{16, 17}. O LD foi determinado a partir da razão do LQ por um fator de três. Neste caso, adotou-se como critério, para o LQ, a menor concentração do analito quantificável com precisão e exatidão que forneceram desvio padrão relativo inferior a 15 %, sendo neste caso o primeiro ponto da curva analítica. Enquanto o LD foi o menor valor detectável do analito com precisão, tendo desvio padrão relativo inferior a 20 %.

Como forma de avaliar se havia diferenças significativas entre as imagens captadas por diferentes modelos de smartphones, foram utilizados dois equipamentos, o

Motorola Moto-G5 Plus e Samsung Galaxy J5 (com abertura da lente de f/1.7). Foi feita a curva analítica da CBZ na faixa de 5,00 - 60,0 mg L⁻¹, em triplicata (n = 3) em ambos os aparelhos, e os dados comparados usando um teste-t a 95 % de confiança. Além disso, foi avaliado se as imagens captadas iriam apresentar distorções e perda de resolução ao enviar as imagens obtidas por e-mail da plataforma do Gmail e pelos aplicativos do WhatsApp e Facebook, usando o aparelho Motorola.

Foram realizados ainda, estudo de interferentes para cada reação colorimétrica desenvolvida. Os ensaios envolveram os excipientes comumente encontrados nas formulações analisadas, sendo estes, celulose microcristalina, dióxido de titânio, sacarose e amido. Os ensaios aconteceram individualmente, na proporção (1:1 v/v), interferentes/solução.^{8,18}

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Reações colorimétricas aplicadas

O produto de reação entre a CBZ e o alaranjado de metila era de coloração laranja que descoloriu à medida que maiores concentrações de CBZ foram adicionadas. O software ImageJ foi usado na obtenção do sinal analítico, e fez-se a seleção do canal que apresentou maior sinal analítico, e este estava relacionado com a cor complementar da reação colorimétrica empregada, neste caso, sendo selecionado o canal verde (G). O controle do pH através do uso de uma solução tampão objetivou manter a protonação do produto de reação formado entre a forma aniônica do alaranjado de metila e a CBZ.

Para a reação envolvendo a CIP e íons Fe³⁺, ocorre um processo de transferência de carga gerando um produto de coloração amarela que se intensifica à medida que a concentração de CIP também aumenta. Forma-se um complexo quando Fe³⁺ entra em contato com o ácido carboxílico adjacente ao grupo ceto na posição 3 e 4, formando um anel de 6 membros. Também foi usado o software ImageJ, selecionando o canal possuindo o maior sinal analítico, e complementar a cor observada, neste caso foi selecionado o canal azul (B).

Já para a reação da NOR com o ácido cloranílico, também ocorre um processo de transferência de carga, gerando um produto de reação de coloração roxa. A cor desse produto se intensifica com o aumento da concentração de NOR, ocasionado pela formação de um complexo $n \rightarrow \pi$. O canal que ofereceu maior sinal analítico e estava relacionado com a cor complementar, foi o canal vermelho (R).

Todas as reações mostraram-se estáveis para uso por até 60 min, após este tempo houve diminuição do sinal analítico.

Os valores dos respectivos canais do sistema RGB foram extraídos utilizando o programa ImageJ, e em seguida aplicou-se a Lei de Lambert-Beer, sendo I o sinal obtido no canal selecionado anteriormente, e I_0 o sinal do branco. Isso foi feito de forma individual para cada reação desenvolvida.

A fim de avaliar a interferência nas reações selecionadas para os fármacos das famílias das fluoroquinolonas, fez-se um teste reagindo a NOR e CIP com cloreto férrico e ácido cloranílico, conforme apresentado na Figura 19. De acordo com a Figura 19 B), o ácido cloranílico oferece maior sinal quando reage com a NOR, contudo a CIP também reage com ácido cloranílico, e produz um intenso sinal analítico sendo um interferente nessa reação. Já a CIP ao reagir com os íons Fe^{3+} proporcionaram uma resposta analítica maior comparada a NOR que interfere nessa reação com intensidade menor do que a interferência observada na reação anterior a Figura 19 A).

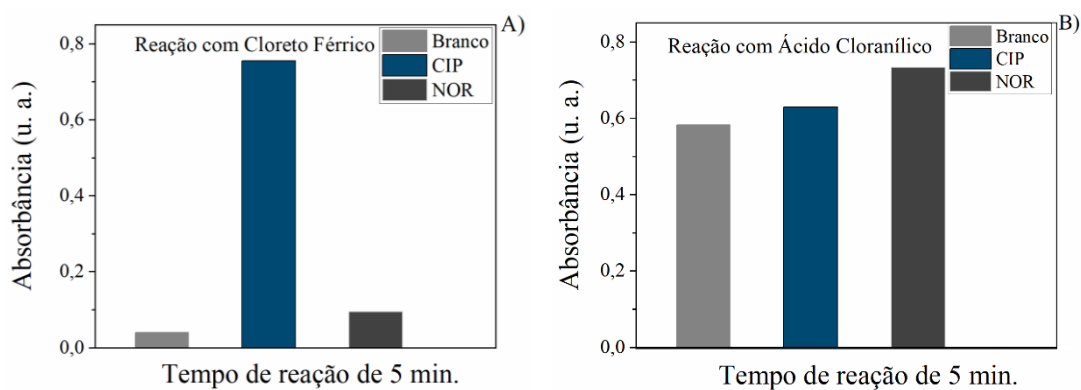


Figura 19 - Teste de interferência envolvendo as reações com cloreto férrico (A) e Ácido cloranílico (B), com a NOR e a CIP

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A Figura 20, mostra a variação de coloração obtida para as reações colorimétricas usadas para o doseamento dos fármacos, bem como a região de interesse (ROI), selecionada no aplicativo ImageJ para a extração dos canais. Na Figura 21 é apresentada uma proposta de reação para cada fármaco estudado.

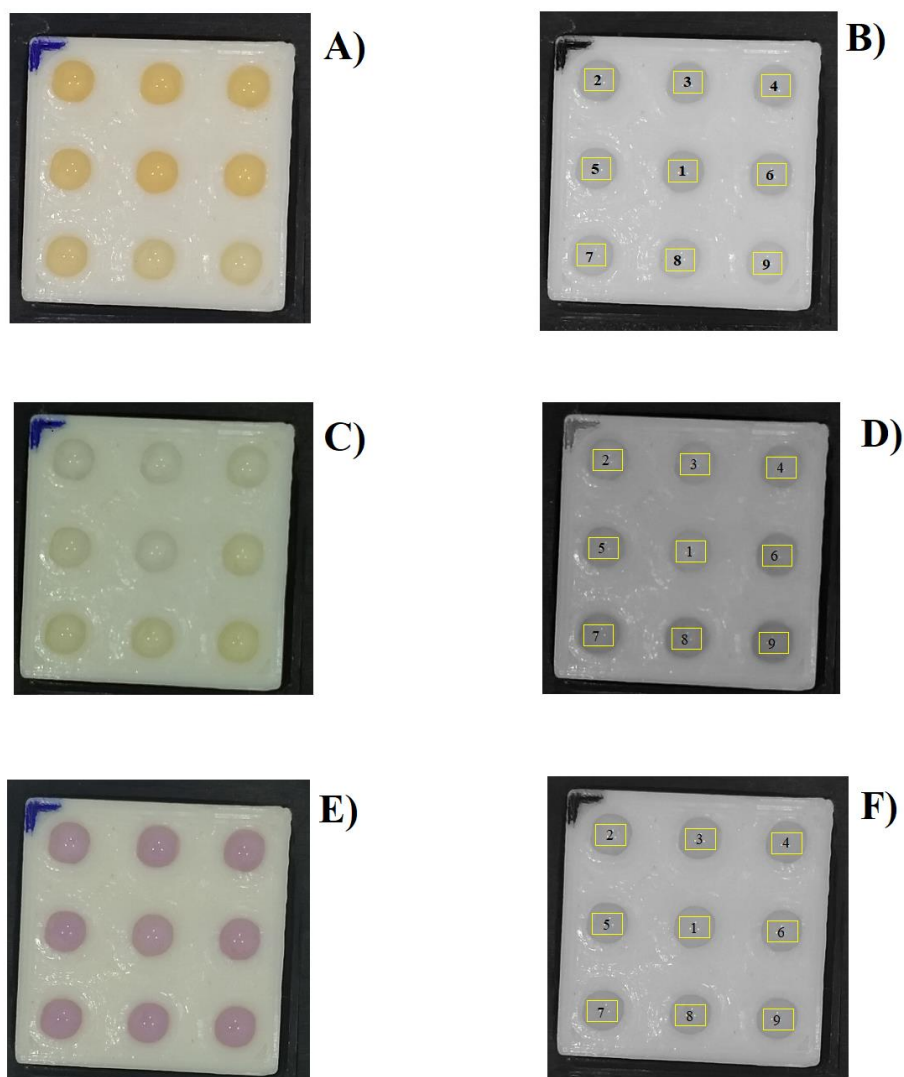


Figura 20 - A, C, E) Imagens capturadas pelo smartphone referentes a CBZ, CIP e NOR, respectivamente. O poço central (número do ponto 1) refere-se ao branco e o número do ponto 2 a 9 refere-se à curva analítica (CBZ 5,00 a 60,0 mg L⁻¹; CIP 3,00 a 35,0 mg L⁻¹; e NOR 3,00 a 40,0 mg L⁻¹); B, D, F) Região de interesse (ROI), selecionada para extrair os valores dos canais RGB usados como sinal analítico

Fonte: Retirada de Lamarca e Lima Gomes (2020).¹⁹

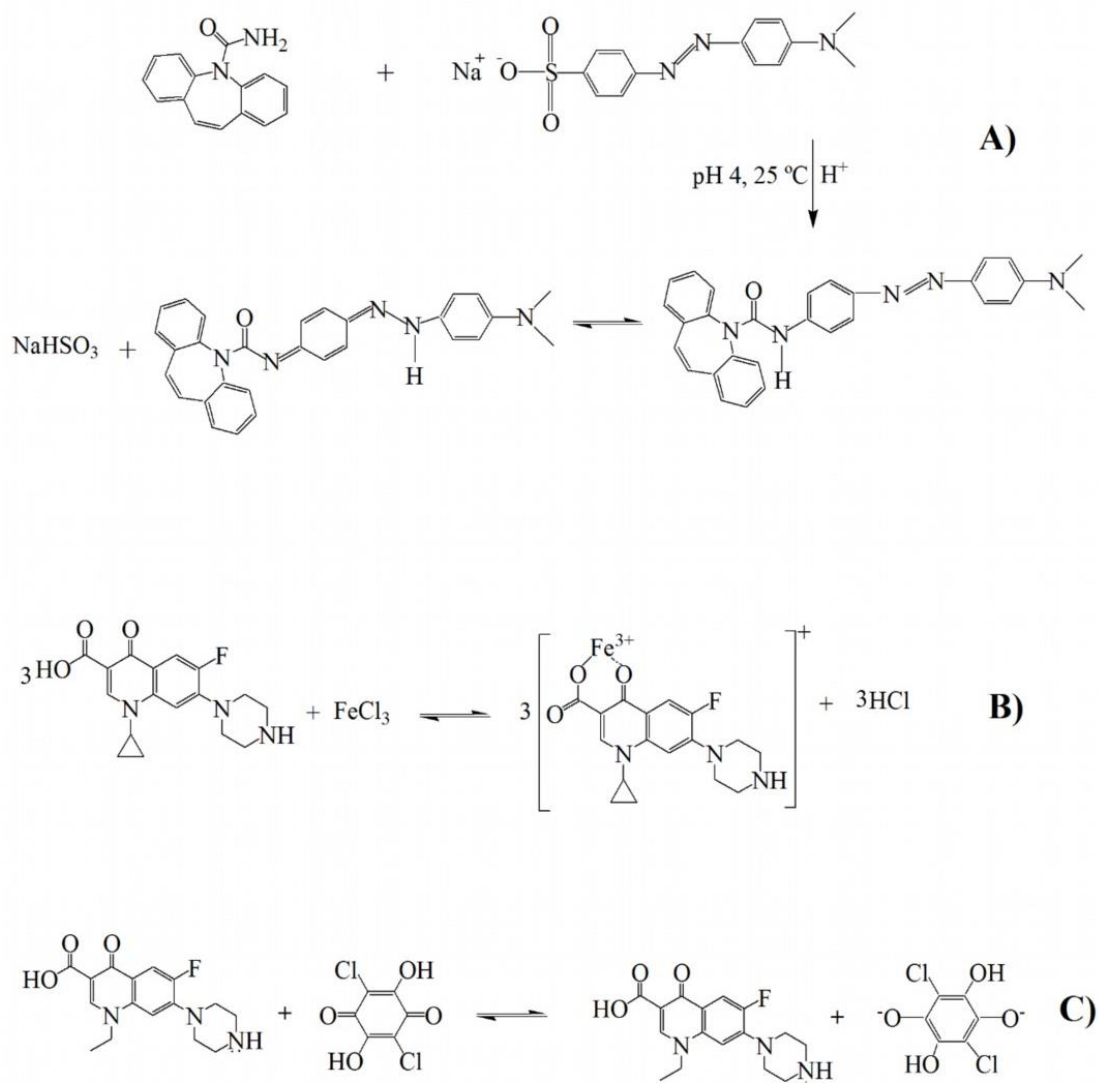


Figura 21 - Proposta de reação para cada fármaco estudado: (A) Reação entre CBZ e alaranjado de metila em tampão biftalato de potássio; (B) Reação entre CIP e cloreto férrico; (C) Reação entre NOR e ácido cloranílico

Fonte: Retirada de Lamarca e Lima Gomes (2020).¹⁹

Para todos os métodos desenvolvidos, foi observado que o coeficiente de determinação foi superior a 0,977, indicando possível ajuste dos pontos na faixa de concentração estudada. Realizou-se a ANOVA, em ambos os métodos na faixa de concentração estabelecida, não havendo falta de ajuste para o método desenvolvido por imagens digitais e para o método adotado como referência. Uma tabela resumida com os dados relativos a ANOVA está demonstrado na Tabela 4. Na Tabela 5 encontra-se os

demais dados obtidos durante a avaliação das figuras de mérito do método, sendo apresentado as equações da regressão, precisão intra-dia, inter-dia, e desvio padrão relativo (DPR %), todos estes em concordância com as recomendações internacionais.²⁰

Tabela 4 - Dados obtidos pela análise de variância (ANOVA) para os métodos utilizando imagens digitais e espectrofotometria

Fármaco	$F_{\text{tabelado 95 \%}}$	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{calculado}}$
		Smartphone	Espectrofotômetro
CBZ	2,86	2,33	1,56
CIP		1,38	0,558
NOR		0,208	0,149

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Tabela 5 - Dados obtidos referentes aos parâmetros das figuras de mérito do método

	Equação da regressão	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Inter-dia (DPR%)	Intra-dia (DPR%)
Espec.	$A=1,90 \times 10^{-3}[\text{CBZ}]+8,40 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,998$	1,70	5,00	6,02	1,05
Smart.	$A=3,00 \times 10^{-3}[\text{CBZ}] - 1,70 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,992$	3,00	5,00	8,46	5,63
Espec.	$A=8,90 \times 10^{-3}[\text{CIP}] + 2,20 \times 10^{-2}$ $R^2 = 0,999$	1,00	3,00	5,58	2,82
Smart.	$A=2,70 \times 10^{-3}[\text{CIP}] - 1,60 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,988$	1,00	3,00	18,2	7,11
Espec.	$A=3,20 \times 10^{-3}[\text{NOR}] + 6,10 \times 10^{-1}$ $R^2 = 0,984$	0,500	3,00	0,890	2,11
Smart.	$A=5,00 \times 10^{-4}[\text{NOR}] + 8,60 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,977$	1,00	3,00	15,5	13,1

Dado: A = absorvância

Fonte: Retirada de Lamarca e Lima Gomes (2020).¹⁹

Conforme observado na Tabela 5, os maiores valores de DPR % foram observados no método desenvolvido por imagens digitais, fato que pode estar associado à variações do caminho óptico dentro dos poços do spot-test usado para a captura das imagens digitais, uma vez que as superfícies inferiores desses poços podem apresentar irregularidades pela própria limitação da impressora 3D, além disso pode ter ocorrido evaporação de parte da solução usada para as análises durante o tempo em que o spot-test esteve em contato com o ar atmosférico no momento da captação das imagens, já que os volumes dos poços do spot-test são baixos (8,00 μ L) fato que pode ter contribuído para a rápida evaporação. Além disso, deve-se levar em consideração a limitação da faixa dinâmica de 8 bits para cada canal RGB do filtro de Bayer presente nos smartphones que utilizam os sensores CMOS que limita o LD e favorecem a maiores erros no processo.

Como modo de verificar se havia diferenças significativas entre os métodos adotados como referência e o método desenvolvido, realizou-se um teste-t a 95 % de confiança, e não foram verificadas diferenças significativas entre os métodos.

Os testes envolvendo o uso de diferentes smartphones para captar as imagens digitais, evidenciaram por meio do teste-t a 95 % de confiança, não haver diferenças significativas nas imagens captadas pelos aparelhos do modelo Motorola e Samsung, já que p -valor obtido foi $(0,54) > \alpha (0,050)$, demonstrando que ambos os aparelhos forneciam resultados equivalentes. Já o teste envolvendo o envio das imagens pelas redes sociais, WhatsApp e Facebook, demonstrou que havia diferenças significativas quando comparadas com as imagens obtidas diretamente do smartphone, já que p -valor $(0,0010) < \alpha (0,050)$. Provavelmente estas diferenças encontradas entre as imagens podem estar centradas na compressão de pixels verificada pelo ImageJ. Nas imagens enviadas pelo WhatsApp e Facebook foram verificadas a redução do número de pixels de 4032×3024 para 960×720 , enquanto nas imagens enviadas pela plataforma Gmail a diminuição dos pixels não foi observada. Um teste-t a 95 % de confiança, de fato não demonstrou diferenças entre as imagens extraídas do smartphone e das imagens enviadas pelo Gmail, conforme p -valor $(0,81) > \alpha (0,050)$.

3.4.2 Determinação da CBZ, CIP e NOR nas formulações farmacêuticas

Antes da aplicação do método desenvolvido, foram avaliados os pesos individuais dos comprimidos, e para os comprimidos com massa inferior a 0,300 g, as variações entre as pesagens individuais não foram superiores a 7,5 %, conforme estabelece a Farmacopeia Brasileira.¹⁴ Para os comprimidos de NOR e CIP, que possuem massas acima de 0,300 g, as variações entre as pesagens individuais para os comprimidos não estiveram acima de 5,0 %, conforme estabelece a Farmacopeia Brasileira.¹⁴

Os pesos médios finais obtidos foram de 0,289 g para CBZ, 0,815 g para CIP e 0,926 g para NOR.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos pelos métodos usando imagens digitais e espectrofotometria (método referência), além das porcentagens admitidas pelas Farmacopeias Brasileira, Americana e Britânica.^{14,21,22}

Para a CBZ, as Farmacopeias Brasileira¹⁴ e Americana²¹, aceitam variações da quantidade declarada entre 92,0 -108 %, enquanto para a farmacopeia Britânica²² esta variação encontra-se na faixa de 95,0 – 105 %. Ambas os métodos estão na faixa estabelecida por essas diretivas.

Para a CIP, segundo a Farmacopeia Brasileira¹⁴ e Americana²¹, são aceitas variações da quantidade declarada de 90,0 – 110 %, e para a Farmacopeia Britânica²² 95,0 -105 %, e os resultados obtidos estão em concordância com as exigências apresentadas.

Finalmente para a NOR, de acordo com as Farmacopeias Brasileiras¹⁵ e Americanas²¹, são consideradas aceitas, variações da quantidade declarada entre 90,0 – 110 %, e para a Farmacopeia Britânica²² de 85,0 – 115 %, ambos os métodos atendem esses requisitos.

Ressalta-se que foram analisadas poucas amostras, o que pode ter contribuído para a ocorrência de maiores erros nas concentrações determinadas pelo método de captura utilizando imagens digitais.

Tabela 6 - Aplicações dos métodos na determinação de CBZ, CIP e NOR presentes nas formulações farmacêuticas

Fármaco	Conc. declarada na embalagem (mg)	Conc. obtida por espectrof. (mg)	Conc. obtida por imagens digitais (mg)	Variações aceitas pelas Farmac. Americana e Brasileira (%)	Variações aceitas pela Farmac. Britânica (%)
CBZ	200	190,0 ± 0,2	212,0 ± 0,1	92,0 – 108	95,0 – 105
CIP	500	500,0 ± 0,1	518 ± 1	90,0 – 110	95,0 – 105
NOR	400	430,0 ± 0,8	438,0 ± 0,9	90,0 – 110	85,0 – 115

Fonte: Retirada de Lamarca e Lima Gomes (2020).¹⁹

Os testes individuais com os excipientes celulose microcristalina, dióxido de titânio, sacarose e amido foram feitos de forma individual, na proporção de 1:1 (v/v) do excipiente/reação colorimétrica. A cor observada nestes testes foi equivalente ao branco de cada método desenvolvido, demonstrando que esses excipientes não interferem nas reações aplicadas. Estudos anteriormente publicados demonstram que esses excipientes podem ser considerados possíveis interferentes, mas isso não foi evidenciado nesse estudo.^{8,18,23}

Na Tabela 7 é apresentada uma comparação do método desenvolvido com outros métodos previamente publicados. O método proposto apresenta menor geração de resíduos químicos, além de menor tempo de análise. Na comparação feita, foram avaliados outros artigos que descreviam o uso de imagens digitais para análise de compostos farmacêuticos, como, o captopril (agente anti-hipertensivo), e a bumetanida (diurético), e o método desenvolvido apresentou o menor volume de reagente, além de obter o resultado mais rápido do que os demais. Ressalta-se que a avaliação do tempo de análise para o método proposto envolveu o tempo necessário para a captura das imagens digitais, não sendo considerado o tempo de extração das amostras.

Tabela 7 - Comparação dos dados obtidos com dados previamente publicados

Fármaco	LD	LQ	Precisão intra-dia (DPR%)	Tempo de análise	Volume de reagente empregado	Referência
CBZ	$6,00 \times 10^{-2}$ mg L ⁻¹	0,190 mg L ⁻¹	0,310	18 min.	10,0 mL	23
	3,00 mg L ⁻¹	5,00 mg L ⁻¹	5,63	16 seg.*	8,00 µL	Método desenvolvido
CIP	$6,00 \times 10^{-2}$ mg L ⁻¹	0,100 mg L ⁻¹	0,700 – 1,20	20 min.	10,0 mL	13
	1,00 mg L ⁻¹	3,00 mg L ⁻¹	7,11	16 seg.*	8,00 µL	Método desenvolvido
NOR	$2,00 \times 10^{-2}$ mg L ⁻¹	$8,00 \times 10^{-2}$ mg L ⁻¹	1,30 – 1,60	30 min.	10,0 mL	13
	0,390 mg L ⁻¹	1,08 mg L ⁻¹	^a NR	9,9 min.	8,90 mL	24
	1,00 mg L ⁻¹	3,00 mg L ⁻¹	13,1	16 seg.*	8,00 µL	Método desenvolvido
CAP	$8,06 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$2,69 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	^a NR	^a NR	800 µL	25
BUM	$3,60 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	$1,09 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	2,21 - 1,38	^a NR	30,0 µL	26

Dado: ^aNR = não reportado;

CAP = Captopril

BUM = Bumetanida

* Tempo de reação não considerado.

Fonte: Retirada de Lamarca e Lima Gomes (2020).¹⁹

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido apresenta menor uso de reagentes químicos, menor tempo de análise, além de apresentarem baixo custo, com valor aproximado do spot-test de R\$ 3,00 (desconsiderando o preço do smartphone, que já é um equipamento incorporado no

cotidiano das pessoas), sendo uma ótima alternativa para laboratórios de análises que possuem de recursos financeiros reduzidos.

O método se mostrou eficiente para análises dos fármacos, além de demonstrarem não haver diferenças significativas quando comparados com os métodos clássicos, usados para tais finalidades.

Referências

- 1 LEE, J. E.; MIN, K. R.; KIM, S. H.; KIM, A. H.; KM, S. T. Analysis of adverse drug reactions with carbamazepine and oxcarbazepine at a tertiary care hospital. **Yonsei Medical Journal**, v. 61, n. 10, p. 875 – 879, 2020.

- 2 ZHU, S.; DONG, B.; WU, Y.; BU, L.; ZHOU, S. Degradation of carbamazepine by vacuum-UV oxidation process: Kinetics modeling and energy efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 178 – 185, 2019.

- 3 BEGHI, E.; et al. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990 – 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The lancet Neurology**, v. 18, n. 4, p. 357 – 375, 2019.

- 4 BEGHI, E. Addressing the burden of epilepsy: Many unmet needs. **Pharmacological Research**, v. 107, p.79 – 84, 2016.

- 5 BHAGAT, C; KUMAR, M.; TYAGI, V. K.; MOHAPATRA, P. K. Proclivities for prevalence and treatment of antibiotics in the ambient water: a review. **npj Clean Water**, v. 3 (42), 2020.

- 6 REHMAN, A.; PATRICK, W.M.; LAMONT, I. L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 1 – 10, 2019.

- 7 HONG, H.- J.; KIM, J.; KIM, D. -Y.; KNG, I.; KANG, H. K.; RYU, B. G. Synthesis of carboxymethylated nanocellulose fabricated ciprofloxacin – Montmorillonite composite for sustained delivery of antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, n. 118502, 2019.

- 8 OLIVEIRA, P. R.; MENDES, C.; KLEIN, L.; SANGOI, M. S.; BERNARDI, L. S.; SILVA, M. A. S. Formulation development and stability studies of norfloxacin extended-release matrix tablets. **BioMed Research International**, v. 213, n. 716736, 2013.

- 9 DAVE, V.; YADAV, R. B.; KUSHWAHA, K.; YADAV, S.; SHARMA, S.; AGRAWAL, U. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Development & statistical optimization of norfloxacin for topical drug delivery system. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 269 – 280, 2017.

10 Tablets Norfloxacin. Disponível em:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/019384s045lbl.pdf.

Acessado em: 04 fev. 2021.

11 PRABHAKAR, A. H.; PATEL, V. B.; GIRIDHAR, R. Spectrophotometric determination of fluoxetine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 427 – 432, 1999.

12 SULTAN, S. M.; SULIMAN, F. E. O. Flow injection spectrophotometric determination of the antibiotic ciprofloxacin in drug formulations. **Analyst**, v. 117, p. 1523 – 1526, 1992.

13 LIMING, D.; QINGQIN, X.; JIANMEI, Y. Fluorescence spectroscopy determinations of fluoroquinolones by charge-transfer reaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 693 – 698, 2003.

14 BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2.

15 BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002. Parte II.

16 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical method validation** – Guidance for industry. Rockville, 2018.

17 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis** (IUPAC Technical Report), *Pure App. Chem.*, v. 74(5), p. 835 – 855, 2002.

18 LI, X.; ZHI, F.; HU, Y. Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 177 – 182, 2007.

19 LAMARCA, R. S.; LIMA GOMES, P. C. F. A low cost method for carbamazepine, ciprofloxacin and norfloxacin determination in pharmaceutical formulations based on spot-test and smartphone images. **Microchemical Journal**, v. 152, n. 104297, 2020.

20 MILLER, J. N.; MILLER, J. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6 ed. Canada: Pearson Education Canada, 2010.

21 THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2012) National Formulary 35, United States Pharmacopeia CONVENTION Inc., 30th ed.

22 BRITISH PHARMACOPEIA COMMISSION, Powder Flow, British Pharmacopoeia Commission, London, 2007.

23 WALASH, M. I.; EL-ENANY, N.; ASKAR, H. Validated spectrofluorimetric method for the determination of carbamazepine in pharmaceutical dosage forms after reaction with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). **Luminescence**, v. 30, p. 1119 – 1124, 2015.

24 GHANTE, M. R.; PANNU, H. K.; LONI, A.; SHIVSHARAN, T. Development and validation of a RP- HPLC method for simultaneous estimation of metronidazole and norfloxacin in bulk and tablet dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 4, p. 241 – 245, 2012.

25 RAVAZZI, C. G.; FRANCO, M. O. K.; VIEIRA, M. C. R.; SUAREZ, W. T. Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging. **Talanta**, v. 189, p. 339 – 344, 2018.

26 LUIZ, V. H. M.; LIMA, L. S.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 43 – 48, 2019.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO LABEL-FREE PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

4 CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO LABEL-FREE PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

4.1 INTRODUÇÃO

Com o aumento populacional, aumentou-se também o consumo de medicamentos, dentre eles os antibióticos, como forma de preservar a saúde e o bem-estar da população. A problemática, concentra-se no fato, de que hoje, os antibióticos são usados por uma grande parcela da população para tratar diversas doenças causadas por vírus, bactérias ou fungos e após a utilização, eles serão excretados nas fezes e na urina, compondo as águas residuárias, que chegarão até as ETEs.¹ Nestas, esses compostos, não são totalmente eliminados pelos atuais métodos utilizados no tratamento de esgoto, e acabam contaminando as matrizes aquáticas. Um exemplo de antibiótico rotineiramente encontrados nas ETEs é a ciprofloxacina.²

A ciprofloxacina é um antibiótico da família das fluoroquinolonas e apresenta grande eficácia para o tratamento de doenças causadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativo.³ Atualmente para a determinação desse antibiótico em matrizes aquáticas, técnicas de elevado custo e com alta geração de resíduos químicos, como as técnicas cromatográficas, são usadas para tal finalidade.^{4,5,6}

Neste contexto, uma alternativa que oferece resposta rápida, seletiva e sensível para a determinação de ciprofloxacina é o desenvolvimento de imunossensor impedimétrico.⁷

Os imunossensores utilizam de anticorpos ou antígenos como elemento de reconhecimento biológico, e apresentam alta seletividade de ligação com a respectiva molécula alvo. A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, tem sido largamente aplicada no desenvolvimento de imunossensores, como forma de avaliar as propriedades interfaciais dos eletrodos modificados.⁸

Neste contexto, imobilizou-se anticorpos anti-ciprofloxacina na superfície de um eletrodo e avaliou-se a resposta analítica das ligações entre os anticorpos e as moléculas alvo.

4.2 OBJETIVOS

Desenvolver um imunossensor impedimétrico label-free para determinação de ciprofloxacina em amostras de águas residuárias.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Instrumentação

As análises de EIE foram realizadas no potenciostato Princeton Applied Research VersaSTAT 3 integrado ao software VersaStudio.

A faixa de frequência utilizada foi de 10.000 a 0,1 Hz, sob um potencial de amplitude de 10 mV, e usando inicialmente um tempo de 600s para estabilização prévia do PCA.

As superfícies dos eletrodos impressos de carbono (SPCE), foram estudadas antes e após as modificações por meio de voltametria cíclica (VC) no potencial de -0,7 a 0,8 V *versus* Ag/AgCl, sob taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. As análises foram realizadas usando uma solução aquosa de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 a 1,00 x 10⁻² mol L⁻¹; KCl a 0,100 mol L⁻¹ (usado como eletrólito suporte) e ferricianeto/ferrocianeto de potássio a 5,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ (usado como par redox). Na Figura 22 encontra-se a imagem da célula eletroquímica usada nas análises.

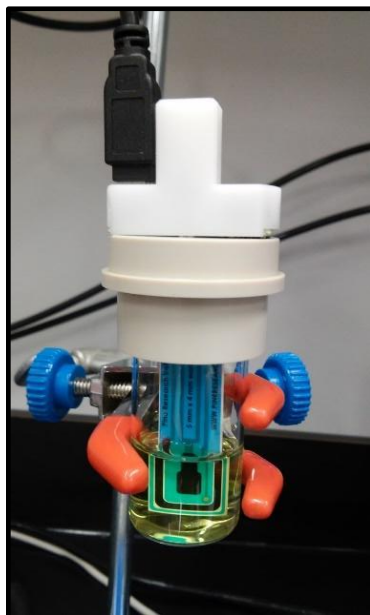


Figura 22 - Fotografia da célula eletroquímica usada para as análises por EIE

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

4.3.2 Reagentes e soluções

O hexacianoferrato de potássio (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$), hexacianoferrato de potássio (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$), etanolamina ($\geq 98\%$), N-hidroxissuccinimida (NHS) (98 %), ácido sulfúrico ($\geq 98\%$), pastilhas de tampão fosfato salino (PBS), CIP ($\geq 98\%$), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) ($\geq 98\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

O cloreto de potássio foi obtido na Fisher Scientific. O anticorpo monoclonal anti-ciprofloxacina (IgG) ($1,00\text{ mg mL}^{-1}$) foi adquirido na Creative Diagnostics.

Uma solução estoque de CIP ($1,00\text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada em metanol com adição de $50,0\text{ }\mu\text{L}$ de ácido fórmico. As pastilhas de PBS foram diluídas em água conforme a descrição contida na embalagem. As sucessivas diluições de CIP foram realizadas em tampão PBS (pH 7,4). Os anticorpos IgG foram também diluídos em tampão PBS de forma a obter a concentração final de $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o preparo de todas as soluções utilizou-se água ultrapura.

4.3.3 Funcionalização do eletrodo SPCE

Os eletrodos utilizados em todas as análises, foram obtidos da Pine Research Instrumentation, tendo um eletrodo de referência de Ag/AgCl, um eletrodo de trabalho de carbono e um eletrodo auxiliar de carbono em substrato polimérico. Uma fotografia do eletrodo usado durante uma das etapas de funcionalização, encontra-se na Figura 23.



Figura 23 - Eletrodo SPCE utilizado nas análises por EIE

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Inicialmente os eletrodos foram eletro-oxidados a +1,5 V *versus* Ag/AgCl por 60 s em solução de H_2SO_4 $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a fim de gerar grupos carboxílicos na superfície do eletrodo. Após a oxidação da superfície do eletrodo, este foi lavado em água ultrapura, seco sob fluxo de N_2 , e em seguida, incubado em uma solução aquosa de EDC/NHS a $5,00 \times 10^{-3}$ e $8,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, durante uma hora, em temperatura ambiente.

Após este tempo, o SPCE foi lavado, seco em N_2 , e sobre o eletrodo de trabalho foram adicionados 30,0 μL de uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo monoclonal (IgG) anti-ciprofloxacina, durante 60 min. Transcorrido este tempo, lavou-se o eletrodo em tampão PBS e adicionou-se 30,0 μL de uma solução de etanolamina, a

$100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi importante para bloquear possíveis ligações inespecíficas ao imunossensor.

Cabe ressaltar que a solução de EDC/NHS foi preparada semanalmente, e usada pelo período de sete dias. Um esquema resumido da funcionalização do eletrodo encontra-se na Figura 24.⁹

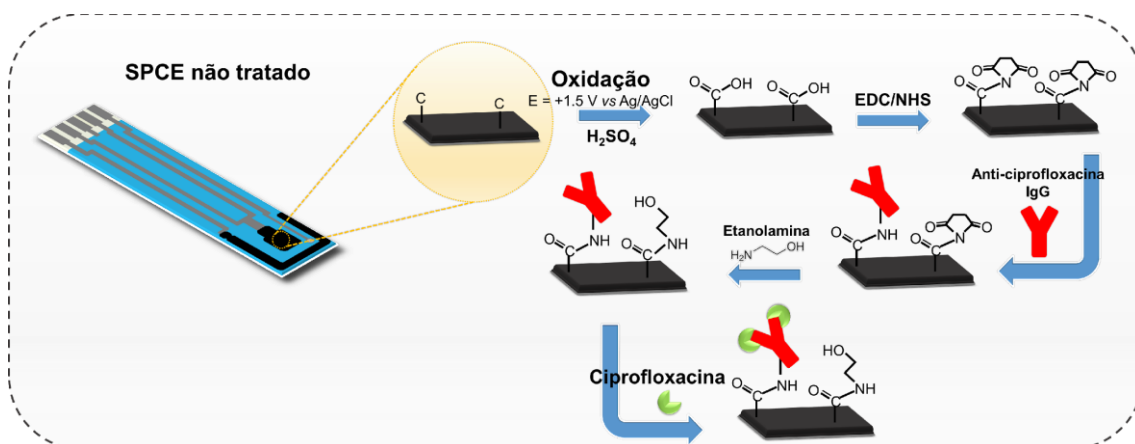


Figura 24 - Esquema resumido das etapas de funcionalização do eletrodo

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.3.4 Caracterização morfológica e espectroscópica do imunossensor

A avaliação espectroscópica do imunossensor foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier usando o modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR), no número de onda de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, utilizando o espectrômetro Frontier Infrared equipado com o software PerkinElmer Spectrum versão 10.03.05. As imagens topográficas foram obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) utilizando o equipamento Veeco Nanoscope V, as imagens foram coletadas no modo “tapping” a 300 kHz. O processamento do fator de rugosidade foi avaliado pelo software Gwyddion 2.3.

4.3.5 Análises por EIE

As análises por EIE foram realizadas na frequência de 10.000 a 0,1 Hz, e amplitude de 10 mV, em torno do PCA estabilizado previamente, sendo usado nos testes iniciais 600s. A realização de todas as medidas foram feitas em uma solução contendo tampão PBS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), KCl $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ utilizado como sonda redox. Os dados obtidos pela EIE foram modelados no software Zview para determinação do circuito equivalente.

As análises por EIE foram realizadas no imunossensor, antes e após este ser exposto ao esgoto sintético produzido em laboratório (lab-made) diluído em tampão PBS (pH 7,4), fortificando CIP na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. A seletividade do imunossensor foi avaliada expondo-o a outros contaminantes emergentes amplamente encontrados em águas residuárias, como a norfloxacin (NOR) que pertence à mesma família das fluoroquinolonas, carbamazepina (CBZ), e a venlafaxina (VLF).

4.3.6 Figuras de mérito do método

A linearidade do método foi avaliada em esgoto lab-made (pH 8,0 com demanda química de oxigênio de $550 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)¹⁰, cuja composição encontra-se detalhada na Tabela 8. Esse esgoto foi filtrado e diluído em tampão PBS e em seguida foram adicionadas alíquotas de uma solução estoque de CIP de concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, de forma a obter uma curva analítica na faixa de $1,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 6$). A repetibilidade (precisão intra-dia) do método foi avaliada pelo preparo de diferentes réplicas ($n = 3$) da curva analítica na faixa de $1,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas no mesmo dia e expressas pelo desvio-padrão relativo (DPR %). A precisão inter-dia foi avaliada, pela triplicata ($n = 3$) das curvas analíticas na faixa de $1,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparados em cinco dias alterados e expressas pelo DPR %.¹¹

O LQ e o LD do método foram avaliados, segundo US FDA.^{12,13} O LD foi determinado a partir da razão do LQ por um fator de três. Neste caso, adotou-se como

critério para o LQ, a menor concentração do analito quantificável com precisão e exatidão que forneceu desvio padrão relativo inferior a 15 %, sendo neste caso o primeiro ponto da curva analítica. Enquanto o LD foi o menor valor detectável do analito com precisão e exatidão e com desvio padrão relativo inferior a 20 %.

Tabela 8 - Componentes presentes na solução de esgoto lab-made

Componente	Concentração (mg L⁻¹)
Celulose	47,0
Sacarose	98,0
Amido	149
Extrato de carne	262
Bicarbonato de sódio	370
NaCl	250
MgCl ₂	4,50
CaCl ₂	7,00
LAS (tensoativo)	1,00
Óleo de soja	79,0

Dado:

LAS - alquil benzeno linear sulfonato de sódio

Fonte: Adaptada de Martins et al. (2017).¹⁰

4.3.7 Aplicação do método desenvolvido na determinação de CIP em águas residuárias

As amostras de águas residuárias foram coletadas na estação experimental de tratamento de esgoto da Université Laval, durante o verão de 2019.

Para a coleta, foi utilizado um frasco de polipropileno de 500 mL, limpo e seco. Foram coletadas aproximadamente 400 mL de água residuária, e esta foi estocada em refrigerador a 5 °C por um dia até a realização da análise.

Como forma de minimizar o efeito de matriz, as amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão.¹⁴ Antes das análises, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo (Unifil, diâmetro 110 mm, espessura de 0,20 mm), e após isto foram diluídas em 1:5 em tampão PBS (para manutenção do pH 7,4 necessário para não desnaturar o anticorpo imobilizado), e avolumado para 25,0 mL. Volumes fixos de 0, 250, 500, 750 e 1000 μL de uma solução CIP $1,00 \times 10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Comportamento eletroquímico

O uso dos reagentes EDC/NHS já são bastantes explorados como reagentes de acoplamento/ união para modificações seletivas de carboxilatos e grupos amino presentes em proteínas (incluindo os anticorpos). Sabe-se que esses reagentes levam a formação de uma amida estável proveniente da reação do carboxilato ativo (presentes na superfície do eletrodo após a oxidação em presença de H_2SO_4) com a amina da cadeia lateral do anticorpo anti-CIP formando uma ligação amida estável.¹⁵

Sabendo-se que a EIE é uma técnica interfacial e bem estabelecida, e esta foi utilizada para avaliar as modificações ocorridas na interface eletrodo-solução. Inicialmente, avaliou-se por VC e EIE, as modificações ocorridas na superfície do SPCE modificado, expondo o mesmo em uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl; $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ tampão PBS e $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Essa técnica voltamétrica é amplamente usada para análise de estudos eletroquímicos, uma vez que ela fornece informações da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, de reações químicas envolvendo processos adsorptivos, além da termodinâmica do processo.¹⁶ A VC consiste na aplicação de um potencial em valores negativos, ou seja, região catódica, na qual os compostos são reduzidos no eletrodo de trabalho, e observa-se a formação de um pico com intensidade proporcional à sua concentração. O potencial então é varrido no sentido inverso, na região anódica,

proporcionando a oxidação dos produtos anteriormente reduzidos na interface eletrodo-solução, formando o pico anódico.¹⁷

Os voltamogramas cíclicos, representados na Figura 25 A), apresentam um pico de oxidação em 0,3 V *versus* Ag/AgCl, e um pico catódico em 0,0 V *versus* Ag/AgCl no sentido inverso, devido ao comportamento eletroquímico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (eletrodo não-modificado está representado pelo voltamograma cíclico em linha vermelha). Após a funcionalização do eletrodo SPCE com EDC/NHS, representado pela linha cinza, observa-se que a corrente diminuiu, fato associado ao caráter predominantemente isolante dessas moléculas, o que dificultou a transferência de elétrons entre substrato e par redox na interface eletrolítica.

Após a fixação do anticorpo anti-ciprofloxacina (anti-CIP), representado pela linha verde, verificou-se outra diminuição da intensidade da corrente do pico, sugerindo uma diminuição da atividade eletroquímica, devido ao efeito isolante dessas proteínas.

E, por fim, após a adição de etanolamina (agente bloqueante de ligações inespecíficas), representada pela linha preta, observou-se que o sinal voltamétrico manteve-se estável, sugerindo que a etanolamina não foi capaz de proporcionar um impedimento estérico considerável, já que a diminuição da corrente elétrica não foi expressiva. A presença de grupos OH^- no modificador, pode ter causado a repulsão eletrostática em relação aos ânions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como analito. Além disso, o aumento de separação pico a pico (300 mV) em relação ao 59 mV, como era esperado pela Equação de Nernst para um sistema reversível com transferência de um elétron, também foi capaz de confirmar o efeito isolante das moléculas de funcionalização do eletrodo, o que promoveu a redução da taxa de transferência de elétrons.⁹

Já o Diagrama de Nyquist, Figura 25 B), mostra um aumento no diâmetro do arco capacitivo após cada etapa de funcionalização, demonstrando ocorrer uma resistência à transferência de cargas. Nesse diagrama é possível observar que a porção do semi-círculo das frequências altas para intermediárias, referem-se ao processo de transferência de carga cinética, enquanto as linhas retilíneas observadas nas frequências mais baixas surgem da barreira difusional em relação à transferência de massa do par redox.¹⁸ Desta forma, o aumento do diâmetro do semi-círculo, observado no diagrama de Nyquist, pode ser atribuído ao comportamento estérico e resistivo das moléculas aderidas ao eletrodo, confirmando o desempenho anteriormente observado pela VC.

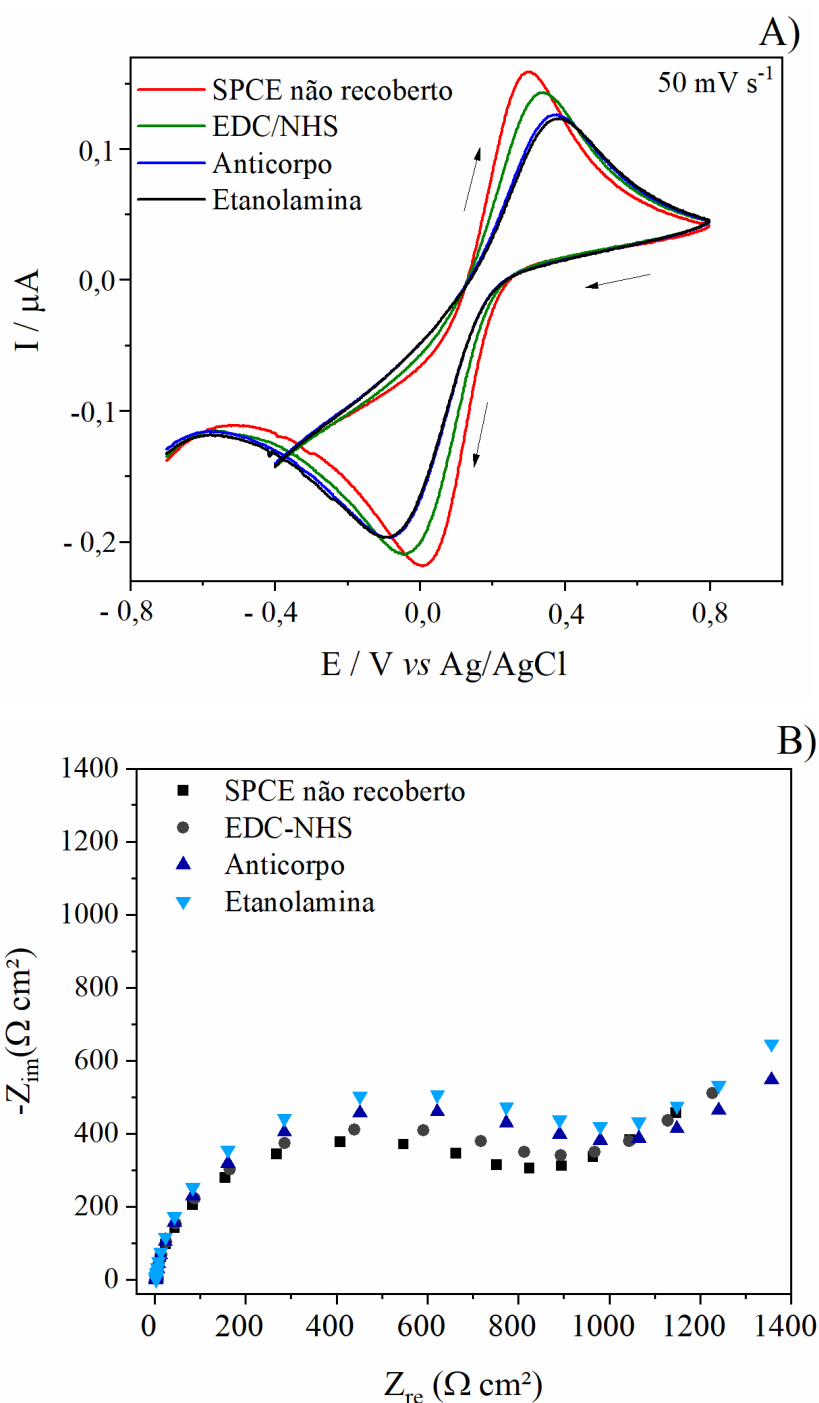


Figura 25 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE não recoberto (linha vermelha); modificado por EDC/NHS, representado pela linha cinza; EDC/NHS/ anti-CIP, representado pela linha verde; EDC/NHS/anti-CIP/etanolamina, representado pela linha preta, em solução de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4). A velocidade de varredura utilizada foi de 50 mV s^{-1} na faixa de -0,7 a +0,8 V *versus* Ag/AgCl; **B)** Diagramas de Nyquist na faixa de frequência de 10.000 a 0,1 Hz e amplitude de 10 mV

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.4.2 Caracterização morfológica e espectroscópica do imunossensor

Para a caracterização morfológica foi avaliada a superfície do imunossensor por AFM e ATR-FTIR antes e após a etapa de funcionalização do eletrodo.

A Figura 26 A) representa o espectro do eletrodo sem funcionalização, ou seja, não recoberto com o anticorpo anti-CIP e o imunossensor com o anticorpo anti-CIP. Observa-se na Figura 26 A), que o SPCE não recoberto apresentou uma banda de baixa intensidade em 1072 cm^{-1} , relativa à vibração C-C.¹⁹

O espectro FTIR do anticorpo anti-CIP, preparado em tampão PBS a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, apresenta três principais bandas: uma em 3303 cm^{-1} relativa ao alongamento do grupo O-H da água; em 1641 cm^{-1} encontra-se uma banda, atribuída à vibração de flexão do grupo das quinolonas ($\delta\text{ N-H}$), e por fim, uma banda larga em 680 cm^{-1} atribuída ao composto aromático ($\delta\text{ Ar-H}$).²⁰⁻²² Já o imunossensor, após a etapa final, envolvendo a adição do anticorpo e etanolamina, apresentou quatro principais bandas: uma banda em 1711 cm^{-1} da vibração de alongamento do grupo C=O do ácido carboxílico ($\delta\text{ C=O}$) da amida formada; uma banda intensa em 1241 cm^{-1} atribuída a vibração de flexão de um grupo hidroxila ($\delta\text{ O-H}$); uma banda em 1041 cm^{-1} do modo de alongamento da ligação C-F e por fim uma banda em 720 cm^{-1} da vibração de flexão ($\delta\text{ Ar-H}$).²⁰⁻²²

Já para a avaliação das imagens morfológicas, utilizou-se de imagens de AFM, observando que o eletrodo não recoberto, Figura 26 B), apresenta uma superfície irregular, com exposição das lâminas de carbono. Após a imobilização por EDC/NHS/anticorpo anti-CIP preparado em tampão PBS a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ /etanolamina, a superfície apresentou maior homogeneidade e simetria (Figura 26 C)). Observa-se também, que a altura média dos depósitos aumentou de $1,18\text{ }\mu\text{m}$ (eletrodo não recoberto) para $1,31\text{ }\mu\text{m}$ (eletrodo recoberto), demonstrando uma topografia mais uniformizada, e lisa, indicando que o anticorpo encontrava-se distribuído de forma uniforme. Além disso, observou-se que as lâminas de carbono estavam mais recobertas após a imobilização dos anticorpos. Foi ainda, calculado os valores da raiz quadrada média (RMS), obtidos no eletrodo não recoberto e após o recobrimento, e foram obtidos os valores $170,3\text{ nm}$, e $210,5\text{ nm}$, respectivamente. O aumento na rugosidade sobre a área analisada indica que houve uma distribuição uniforme dos anticorpos sobre o eletrodo SPCE.

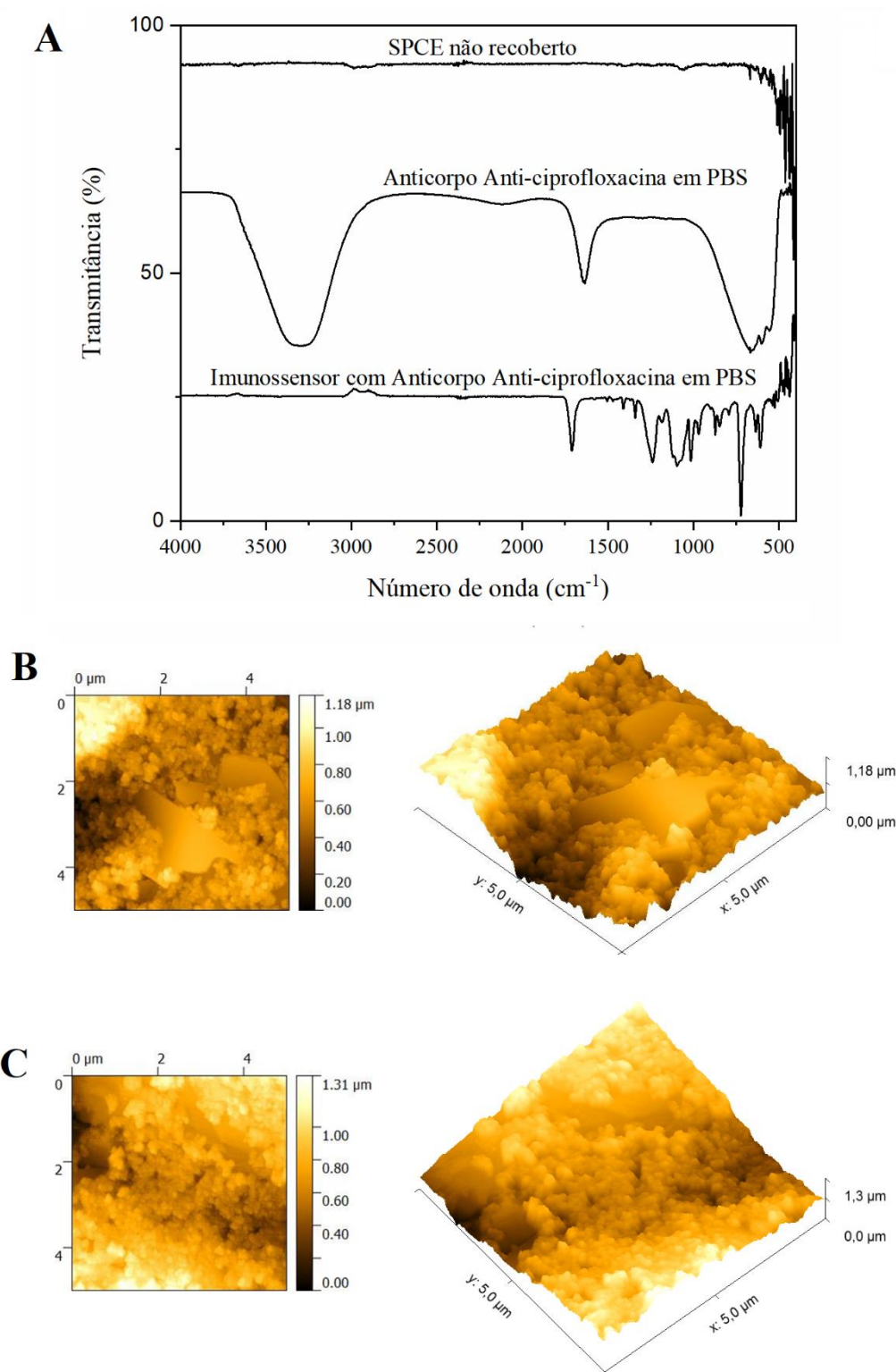


Figura 26 - (A) Espectro FTIR para o eletrodo não recoberto, anticorpo anti-CIP em solução de $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4), e eletrodo após a imobilização com (EDC/NHS/IgG em tampão PBS/Etanolamina). Imagens de AFM; (B) Eletrodo não recoberto; e (C) Eletrodo após a imobilização

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.4.3 Validação da EIE

Os testes iniciais envolviam o uso de 600s para estabilização do PCA, mas analisando o PCA em função do tempo (Figura 27), percebe-se que a partir de 300s esse já se encontrava estabilizado e, portanto, pronto para as medições de EIE, sendo desta forma utilizado para as demais análises.

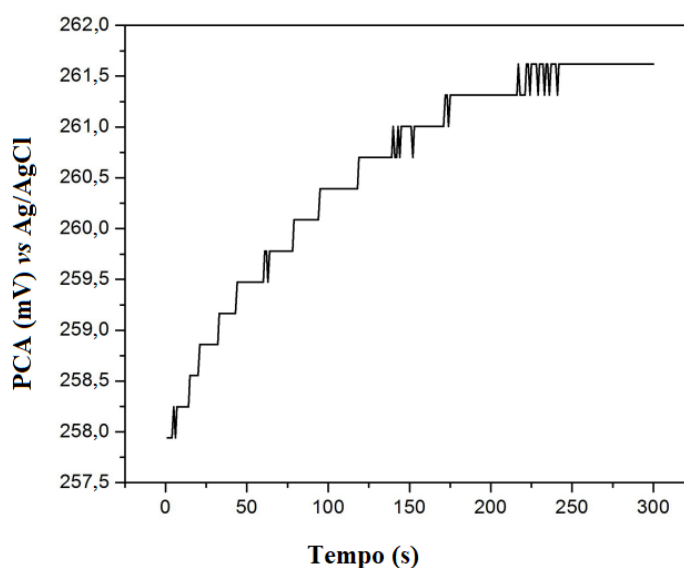


Figura 27 -Variação do potencial de circuito aberto em função do tempo com o respectivo imunossensor imerso em KCl e par redox, ambos preparados em tampão PBS

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

A EIE é representada pelos gráficos de Bode e Diagrama de Nyquist. Os dados obtidos pela EIE são ajustados em um circuito elétrico equivalente, o qual possui elementos elétricos tais como, resistores, capacitores e indutores. Um dos grandes problemas encontrados quando se utiliza a EIE envolve a validação dos dados experimentais de forma que eles possam ser interpretados em termos de modelos lineares baseados em análogos elétricos. Como forma de assegurar a validade dos dados, utiliza-se a transformada de Kramers–Kronig (K-K), que avalia as características de linearidade, causalidade e estabilidade, baseando-se na Teoria de Sistemas Lineares (TSL), como

forma de obter a impedância teórica.^{17,23} Pela transformada K-K, calcula-se a componente teórica da impedância a partir da impedância experimental e vice-versa. As curvas obtidas por Z' e Z'' da transformada de K-K são então sobrepostas, para comparar a impedância teórica e experimental no domínio da frequência.

A Figura 28 compara os valores obtidos para a impedância teórica e experimental, e pela sobreposição dos gráficos é possível verificar que a impedância experimental encontra-se em concordância com a impedância teórica, indicando que a resposta eletroquímica obtida pelo sistema é causal, linear e estável. Essas características indicam que a impedância presente no sistema, correspondem exclusivamente a pequenas perturbações da corrente alternada (CA), e a resposta não se altera em função do tempo, uma vez interrompida a CA do sistema, esta volta ao estado original.^{23,24}

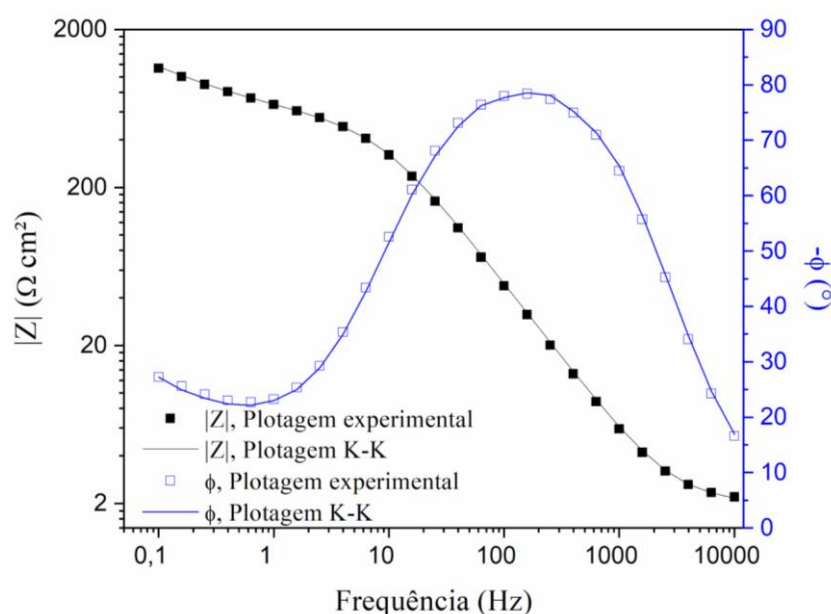


Figura 28 - Curvas obtidas pela Transformada de K-K e pela medição experimental de EIE representada em Diagramas de Bode para o ângulo de fase utilizando eletrodo sem imobilização e o imunossensor em presença de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.4.4 Avaliação da detecção de CIP

Para avaliar o desempenho do imunossensor desenvolvido foram realizados experimentos de EIE usando o imunossensor na ausência do analito (CIP), e também na presença CIP na faixa de concentração, $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em esgoto lab-made diluído previamente em tampão PBS.

Na Figura 29, é demonstrado o Diagrama de Nyquist, sendo possível visualizar a porção do semi-círculo na frequência alta a intermediária, relacionando à cinética de transferência de carga $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na interface eletrodo-solução. Já as partes retilíneas representam o processo de difusão da sonda redox. Todos os dados obtidos foram então simulados em um circuito elétrico equivalente, apresentado na inserção realizada no Diagrama. A adequabilidade da simulação do modelo elétrico em relação ao sistema eletroquímico sob estudo foi confirmada pelo baixo valor do parâmetro estatístico qui-quadrado (χ^2), cujos resultados obtidos em todas as análises foram próximos a 10^{-5} , limite apresentado na literatura como suficientemente baixo para apontar a qualidade da simulação.²³

O circuito obtido consistiu de uma resistência do eletrólito (R_e), conectada em série com um elemento de fase constante (CPE), em paralelo a uma resistência de transferência de carga (R_{tc}) e uma impedância de Warburg (W).

A R_e é influenciada principalmente pela condutividade das soluções de tampão PBS e KCl, e como já era esperado, quase não houve variações já que a composição da solução usada em todos os testes foi a mesma. O CPE é empregado geralmente ao invés de um capacitor puro, porque esse leva em consideração a dispersão de frequência que surge na superfície do eletrodo, devido à porosidade do material, heterogeneidade de sua composição química ao longo da superfície, além de outros fatores.²⁵

O CPE compreende o número imaginário $j(= \sqrt{-1})$, a frequência angular (ω), uma constante T que independe da frequência, além de um expoente p que é associado ao desvio CPE do capacitor ideal. Quando $p = 1$, pressupõe-se que esse seja um capacitor puro.²⁶ A Equação (14) resume todas essas variáveis.

$$CPE = \frac{1}{(j\omega)^p T} \quad (14)$$

Dessa forma, testou-se o imunossensor nas diferentes soluções de CIP, e obteve-se o valor de $p = 0,949 \pm 0,002$, ou seja, p foi próximo de 1, indicando haver homogeneidade da superfície do eletrodo imobilizado, e distribuição regular da capacitância na superfície do sensor desenvolvido.²⁶

A impedância de Warburg, verificada como uma linha oblíqua sob um ângulo próximo a 45°, visualizada no Diagrama de Nyquist em baixas frequências, está relacionada ao processo de transferência de massa.^{16,27} Já o valor de R_{tc} , estimada pelo diâmetro do semi-círculo, representa a cinética das reações redox envolvendo os íons $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, usado pelo eletrodo como fonte de elétrons. Como observado na Figura 29, o diâmetro do semi-círculo aumentou à medida que o imunossensor foi exposto a maiores concentrações de soluções de CIP, pelo consequente incremento dos valores de R_{tc} . Esse fato, demonstra que a CIP aderiu ao anticorpo, presente na superfície do eletrodo, promovendo uma diminuição da transferência de cargas para a sonda redox presente na interface eletrodo/solução.

Resultados anteriormente publicados indicam que a CIP possui um único pico em um potencial alto de oxidação (1,1 V *versus* Ag/AgCl) do 1-ciclopropil-5-fluoro-6-(piperazin-1-il)indolina-2,3-diona.^{28,29} Portanto, observa-se que a CIP somente é eletroativa sob certas condições particulares de pH e tampão.^{30,31}

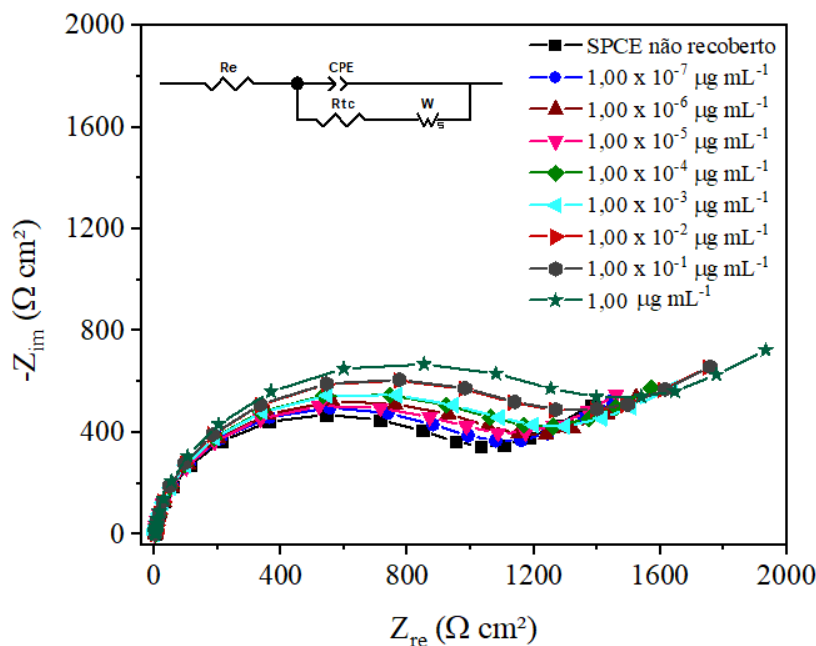


Figura 29 - Diagramas de Nyquist para as medidas de impedância de CIP na faixa de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. O circuito elétrico equivalente encontra-se inserido na figura

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.4.5 Figuras de mérito do método desenvolvido

A linearidade do imunossensor desenvolvido foi avaliada pela fortificação de CIP em esgoto lab-made na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. A variação de ΔR_{tc} , foi calculada a partir da diferença do imunossensor antes e após a exposição de CIP na faixa anteriormente descrita. Observou-se um aumento de ΔR_{tc} à medida que houve um aumento na escala logarítmica de concentração de CIP, conforme observado na Figura 30.

Nas concentrações de $1,00 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1} \leq [\text{CIP}] < 1,00 \times 10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$, o imunossensor foi capaz de detectar, mas não quantificar o analito, haja visto que nesta faixa foi verificado um $\text{DPR} > 15 \%$.

Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para o método, atenderam as prerrogativas da FDA^{12,33}, sendo recomendado para o LQ apresentar a capacidade de

quantificar a menor concentração com precisão inferior a 15 %, sendo neste caso o valor obtido de $1,00 \times 10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$, adotado o primeiro ponto da curva analítica. O limite de detecção, o menor valor detectável do analito com precisão inferior a 20 % obtido foi de $1,00 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foram avaliadas ainda em triplicata ($n = 3$), a precisão intra-dia e inter-dia, calculadas pelo DPR % de três medições, realizadas no mesmo dia, e em dias alternados, tendo sido verificados DPR % de 7,85 % e 10,1 %, respectivamente.

A recuperação foi calculada em triplicata ($n = 3$), pelo método de adição de padrão de CIP nas amostras de águas residuárias de forma a obter a concentração final de $1,00 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor médio obtido foi de $9,70 \times 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$, o equivalente a 97 % de recuperação.

As análises das amostras de águas residuárias foram realizadas por adição de padrão, em triplicata ($n = 3$), tendo sido obtida a curva $y = 1,57 \times 10^5 [\text{CIP}] + 9,20$; $R^2 = 0,998$. Considerando-se a diluição realizada anteriormente, a concentração de CIP na amostra foi de $2,90 \times 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$.

Dessa forma, o imunossensor desenvolvido apresentou alta capacidade de detectar CIP, mesmo em baixas concentrações, sem nenhum tratamento prévio de preparo de amostras, ou uso de biomarcadores, demonstrando ser uma técnica atraente e em concordância com os preceitos da química verde.

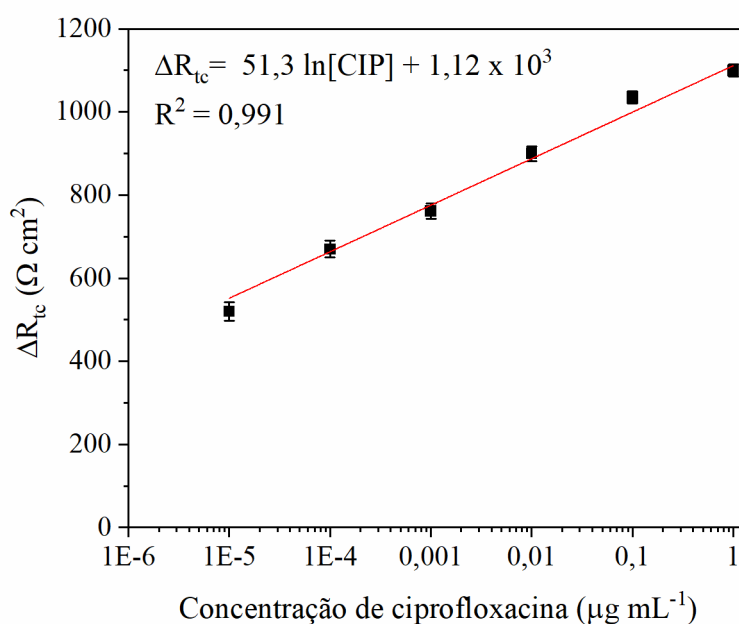


Figura 30 - Curva analítica obtida pela fortificação de CIP em esgoto lab-made na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-5} - 1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.4.6 Estudo da seletividade do imunossensor

Para verificar a resposta do imunossensor em presença de outros contaminantes, este foi exposto em presença de fármacos comumente encontrados em águas residuárias, sendo estes VLF, NOR e CBZ.³³⁻³⁵ Para tal estudo, preparou-se soluções individuais de cada fármaco a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em esgoto lab-made (previamente filtrado e diluído em tampão PBS), e em seguida este foi exposto ao imunossensor, por 20 min, em duplicata, seguida das análises por EIE. O resultado é apresentado na Figura 31. O sinal obtido para cada fármaco foi comparado com o sinal obtido pela CIP, considerando sua resposta como 100 %. Os sinais obtidos foram então: CBZ -1,84 %; NOR -8,61 % e VLF -3,14 %. O sinal negativo observado na resposta do imunossensor na presença dos interferentes, sugere um aumento da condutividade elétrica. Sabe-se que uma relação inversa é estabelecida entre impedância eletroquímica e a condutividade elétrica, ou seja, quando são observadas diminuições nas medidas de impedância, um aumento de condutividade

elétrica é verificada.³⁶ Além disso o imunossensor desenvolvido, mesmo exposto a um fármaco de estrutura similar (NOR) não foi capaz de apresentar sinal significativo que demonstrasse a interferência de outro fármaco no presente método. Assim, fica evidenciado que o anticorpo anti-CIP, apresentou elevada seletividade, mesmo em uma amostra tão complexa como o esgoto lab-made.

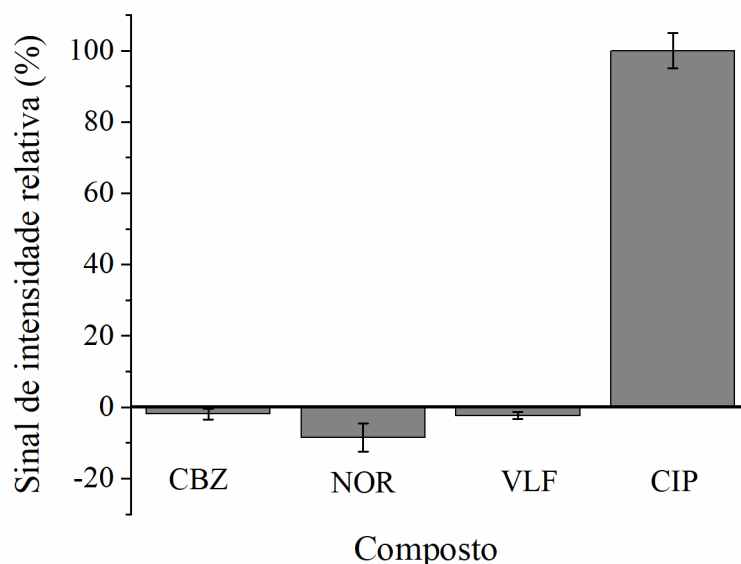


Figura 31- Resposta do imunossensor na presença de possíveis interferentes como CBZ, NOR e VLF

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

Como forma de verificar se os dados obtidos neste estudo encontravam-se em concordância com outros dados publicados previamente, realizou-se uma busca acerca das técnicas empregadas para análise de CIP em diferentes matrizes. Conforme observado no Quadro 7, a técnica utilizada nesta tese, foi a que apresentou a maior sensibilidade e menor limite de detecção, além de não sofrer envenenamento após testes consecutivos.

Quadro 7 - Principais técnicas utilizadas para análise de CIP em diferentes tipos de amostras

Sonda	Transdutor	Técnica de detecção	Sensibilidade	LOD [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Amostra	Referência
Anti-ciprofloxacina IgG	SPCE	EIE	$51,3 \Omega \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1} \text{ mL}$	$3,00 \times 10^{-7}$	Amostra de água residuária	Método desenvolvido
Polímero de impressão molecular (MIP)	Nanotubos magnéticos de carbono	Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial	$2,28 \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$1,70 \times 10^{-3}$	Sérum e urina humana e comprimidos	37
MIP	Cantilever micromecânico	Sensor óptico dinâmico	$2,60 \text{ Hz pg}^{-1}$	0,800	Amostras de água	38
Nanopartículas de ouro e quitosana	SPCE	Voltametria cíclica	-	$1,00 \times 10^{-3}$	Amostras biológicas	39
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas	Carbono vítreo	Voltametria cíclica	$0,257 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$5,00 \times 10^{-2}$	Amostras de água	40
Sensor baseado em DNA	Grafeno/SPCE	Voltametria de onda quadrada	$0,136 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	0,100	Sérum e urina humana	41
Nanopartículas de $\text{Ba}_{0,5}\text{Co}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}$	Carbono vítreo	Voltametria cíclica	$1,02 \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$5,80 \times 10^{-3}$	Formulações farmacêuticas	42

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).⁹

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um método fácil, rápido, de baixo custo, usando volume diminuto de amostra (30,0 μL), e ambientalmente amigável foi desenvolvido e aplicado em amostras de águas residuárias para determinação de CIP.

O imunossensor impedimétrico label-free desenvolvido foi eficiente, para análise de amostras complexas como de águas residuárias, determinando a CIP em concentrações extremamente baixas e com recuperação de 97 %. Não houve necessidade de etapa prévia de preparo de amostras, requerendo somente filtração e diluição da amostra em tampão PBS, para manter o pH da solução constante e evitar a desnaturação do anticorpo imobilizado no SPCE.

Referências

- 1 BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; BOIX, C.; RINCÓN, R. J.; CASTILLO, N.; ARIAS-MARÍN, L. P.; MANRIQUE-LOSADA, L.; TORRES-PALMA, R.; MONCAYO-LASSO, A.; HERNÁNDEZ, F. 'An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater'. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 842 – 853, 2018.
- 2 LIU, C.; NANABOINA, V.; KORSHIN, G. V.; JIANG, W. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. **Water Research**, v. 46, p. 5235 – 5246, 2012.
- 3 MUTHUMARIAPPAN, S. Synthesis and characterization of ciprofloxacin–zinc (II) complex and assay studies in pharmaceutical drugs. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, p. 437 – 441, 2013.
- 4 MARTINS, A. F.; VASCONCELOS, T. G.; HENRIQUES, D. M.; FRANK, C. S.; KÖNIG, A.; KÜMMERER, K. Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 36, n. 3, p. 264 – 269, 2008.
- 5 RODRIGUES-SILVA, C.; PORTO, R. S.; DOS SANTOS, S. G.; SCHNEIDER, J.; RATH, S. Fluoroquinolones in hospital wastewater: analytical method, occurrence, treatment with ozone and residual antimicrobial activity evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1447 – 1457, 2019.
- 6 BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil. **Environmental Technology**, v. 42, n. 15, p. 2292 – 2303, 2021.
- 7 SINGH, P. K.; JAIRATH, G.; AHLWAT, S. S.; PATHERA, A.; SINGH, P. Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1759 – 1765, 2016.
- 8 MA, Y.; YANG, X. One saccharide sensor based on the complex of the boronic acid and the monosaccharide using electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 580, p. 348 – 352, 2005.

- 9 LAMARCA, R. S.; DE FARIA, R. A. D.; ZANONI, M. V. B.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor. **RSC Advances**, v. 10, p. 1838 –1847, 2020.
- 10 MARTINS, G. S.; LUCHIARI, N. C.; LAMARCA, R. S.; SILVA, B. F.; LIMA GOMES, P. C. F. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253 – 264, 2017.
- 11 MILLER, J. N.; MILLER, J. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6 ed. Canada: Pearson Education Canada, 2010.
- 12 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical method validation – Guidance for industry**. Rockville, 2018.
- 13 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis** (IUPAC Technical Report), *Pure App. Chem.*, v. 74(5), p. 835–855, 2002.
- 14 SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de química analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.
- 15 ROCHA, C. G.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Label-free impedimetric immunosensor for detection of the textile azo dye Disperse Red 1 in treated water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 236, p. 52 – 59, 2016.
- 16 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica- princípios, métodos e aplicações**. Oxford University Press. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.
- 17 DE FARIA, R. A. D. **Estudo para o desenvolvimento de biossensor impedimétrico não marcado para a detecção de veneno ofídico**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Geias, Belo Horizonte, 2017.
- 18 DE FARIA R. A. D.; MATENCIO, T.; MESSADDEQ, Y. Faradaic and non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy as transduction techniques for sensing applications. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 5, n. 1, p. 29 – 31, 2019.

- 19 TUCUREANU, V.; MATEI, A.; AVRAM, AM. M. FTIR Spectroscopy for carbon family study. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, p. 502 – 520, 2016.
- 20 SAHOO, S.; CHAKRABORTI, C. K.; MISHRA, S. C.; NANDA, U. N.; NAIK, S. FTIR and XRD investigations of some fluoroquinolones. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 165 – 170, 2011.
- 21 SAHOO, S.; CHAKRABORTI, C. K.; NAIK, S.; MISHRA, S. C.; NANDA, U. N. Structural analysis of ciprofloxacin-carbopol polymeric composites by X-Ray diffraction and Fourier Transform Infra-Red spectroscopy. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 273 – 280, 2011.
- 22 DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. - H.; ADIBKIA, K. Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*. **Artificial Cell, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 535 – 543, 2016.
- 23 RIBEIRO, J. Espectroscopia de impedância eletroquímica: uma ferramenta nas investigações eletroquímicas. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 2020.
- 24 CRUZ-MANZO, S.; CHEN, R.; GREENWOOD, P. Evaluate the validity of electrochemical impedance measurements of polymer electrolyte fuel cells using a computational algorithm based on fast Fourier Transform. **Insights in Analytical Electrochemistry**, v. 1, n. 1(3), p. 1 – 12, 2015.
- 25 BHAND, S.; BACHER, G. Impedimetric Sensors in Environmental Analysis: An Overview. Environmental. **Chemical and Medical Sensors**, p. 67 – 85, 2017.
- 26 ALEXANDER, C. L.; TRIBOLLET, B.; ORAZEM, M. E. Contribution of surface distributions to constantphase-element (CPE) behavior: 1. Influence of roughness. **Electrochimica Acta**, v. 173, p. 416 – 424, 2015.
- 27 PIMENTA, T. C.; SANTOS, C. C.; R THOMASINI, R. L.; FERREIRA, L. F. Impedimetric immunosensor for dengue diagnosis using graphite screen-printed electrodes coated with poly(4-aminophenylacetic acid). **Biomedical Microdevices**, v. 20 (78), p. 1 – 9, 2018.
- 28 RAHMANI, A. R. ; NEMATOLLAHI, D.; SAMARGHANDI, M. R.; SAMADI, M. T.; AZARIAN, G. A combined advanced oxidation process: Electrooxidation-ozonation

for antibiotic ciprofloxacin removal from aqueous solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 808, p. 82 – 89, 2018.

29 FOTOUHI, L.; ALAHYARI, M. Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 110 – 114, 2010.

30 KINGSLEY, M. P.; KALAMBATE, P. K.; SRIVASTAVA, A. K. Simultaneous determination of ciprofloxacin and paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using copper zinc ferrite nanoparticles modified carbon paste electrode. **RSC Advances**, v. 6, p. 15101 – 15111, 2016.

31 GARBELLINI, G. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of ciprofloxacin in urine samples and its interaction with dsDNA on a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, p. 3411– 3418, 2015.

32 U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Validation Guidelines. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/process-validation-general-principles-and-practices>. Acesso em: 11 dez. 2021.

33 AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 36 – 46, 2016.

34 FEKADU, S.; ALEMAYEHU, E.; DEWIL, R.; VAN DER BRUGGEN, B. pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 324 – 337, 2019.

35 SERNA-GALVIS, E. A.; BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; MONCAYO-LASSO, A.; IBÁÑEZ, M.; HERNÁNDEZ, F.; TORRES-PALMA, R. A. Degradation of seventeen contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents by sonochemical advanced oxidation processes. **Water Research**, v. 154, p. 349 – 360, 2019.

36 GOUAL, L.; ABUDU, A. Predicting the adsorption of asphaltenes from their electrical conductivity. **Energy Fuels**, v. 24, p. 469 – 474, 2010.

37 BAGHERI, H.; KHOSHSAFAR, H.; AMIDI, S.; HOSSEINZADEH ARDAKANI, Y. Fabrication of an electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon

nanotubes for the determination of ciprofloxacin. **Analytical Methods**, v. 8, n. 16, p. 3383 – 3390, 2016.

38 OKAN, M.; SARI, E.; DUMAN, M. Molecularly imprinted polymer based micromechanical cantilever sensor system for the selective determination of ciprofloxacin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 258 – 264, 2017.

39 REDDY, K. R.; BRAHMAN, P. K.; SURESH, L. Fabrication of high performance disposable screen printed electrochemical sensor for ciprofloxacin sensing in biological samples. **Measurement**, v. 127, p. 175 – 186, 2018.

40 GARRIDO, M. P. J.; MELLE-FRANCO, M.; STRUTYŃSKI, K.; BORGES, F.; BRETT, C. M. A.; GARRIDO, E. M. P. J. β -Cyclodextrin carbon nanotube-enhanced sensor for ciprofloxacin detection. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 0, p. 1 – 7, 2016.

41 LIM, S. A.; AHMED, M. U. A simple DNA-based electrochemical biosensor for highly sensitive detection of ciprofloxacin using disposable graphene. **Analytical Sciences**, v. 32, p. 687 – 693, 2016.

42 OSMAN, N. S. E.; THAPLIYAL, N.; ALWAN, W. S.; KARPOORMATH, R.; MOYO, T. Synthesis and characterization of Ba_{0.5}Co_{0.5}Fe₂O₄ nanoparticle ferrites: application as electrochemical sensor for ciprofloxacin. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 26, n. 7, p. 5097 – 5105, 2015.

CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR LABEL-FREE BASEADO EM FIBRAS ÓPTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

5 CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR LABEL-FREE BASEADO EM FIBRAS ÓPTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

5.1 INTRODUÇÃO

Com o aumento populacional, aumentaram-se também o volume de águas residuárias provenientes das atividades antrópicas. Sabe-se que o saneamento básico não é ofertado a uma grande parcela da população mundial, fazendo com que as pessoas sejam expostas a agentes etiológicos diversos. Segundo dados de 2016 da Organização Mundial da Saúde, 1,9 milhões de mortes poderiam ter sido evitadas, se toda a população mundial tivesse acesso à água potável e saneamento básico.¹

Muitas cidades não possuem ETEs, e as que possuem, o tratamento é ineficiente ou falho para a completa remoção de uma gama de compostos químicos, como por exemplos, os antibióticos. Estes são usados para tratar diversos tipos de doenças, tanto em humanos, como animais, e após o consumo, estes acabam sendo descartados no esgoto doméstico que chega até as ETEs. E como o tratamento ofertado nas estações é ineficiente, eles acabam contaminando as matrizes aquáticas e o solo.² Um exemplo deste contaminante, é a ciprofloxacina.^{3,4}

A CIP, é um antibiótico largamente utilizado e comumente encontrado em esgotos e efluentes tratados. Este antibiótico integra a terceira maior classe de antibióticos administrado em todo o mundo.^{2,5} Desta forma, alternativas ambientalmente amigáveis e com baixa geração de resíduos químicos devem ser desenvolvidas para análise de tal elemento, uma vez que hoje, as técnicas mais utilizadas para estas análises são as técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial.⁶⁻⁸

Uma alternativa, seria o desenvolvimento de biossensores, que oferecem respostas analíticas sensíveis, seletivas e utilizam baixos volumes de reagentes.⁹ Ao utilizar anticorpos no biossensor, há um aumento na seletividade, dando origem aos chamados imunossensores.¹⁰

Estes podem ser funcionalizados em uma infinidade de materiais, como por exemplo, sobre os materiais vítreos, como a fibra óptica de sílica. Estas apresentam características únicas, como boa janela de transparência para radiação eletromagnética, rapidez na velocidade de transmissão de sinal, além de baixo custo.¹¹

Quando dobra-se as fibras em formato “U”, observa-se um aumento na sensibilidade do sensor em até 10 vezes.¹² A ausência de materiais de marcação fluorescente para identificação das biomoléculas alvos fazem com que estes imunossensores sejam chamados de label free, já que estas são detectadas na sua forma natural.¹³

5.2 OBJETIVOS

Desenvolver um imunossensor label-free baseado em fibras ópticas para determinação de ciprofloxacina em águas residuárias.

5.3 PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1 Instrumentação

Sobre uma mesa óptica foi montado um setup para as medidas das ondas evanescentes utilizando o imunossensor (Figura 32). As absorbâncias foram obtidas usando um espectrômetro de fibra óptica da Ocean Optics (USB 4000), equipado com o detector CCD (3648-element linear silicon), faixa de trabalho de 200 a 1100 nm e software SpectraSuit. O tempo de integração foi de 140 milisegundos e com 15 scans.

Um LED verde foi utilizado com fonte emissora de radiação, e este foi conectado a uma fonte de energia de 4 V (E3634A, Agilent). Para focalizar a luz do LED à fibra, utilizou-se uma lente objetiva de 40 x da Thorlabs. A distância entre a lente focalizadora e

a fibra óptica (input) era de 1,5 cm e esta foi mantida constante durante todas as medidas, já a saída da fibra óptica (output) estava conectada ao espectrômetro de fibra óptica.

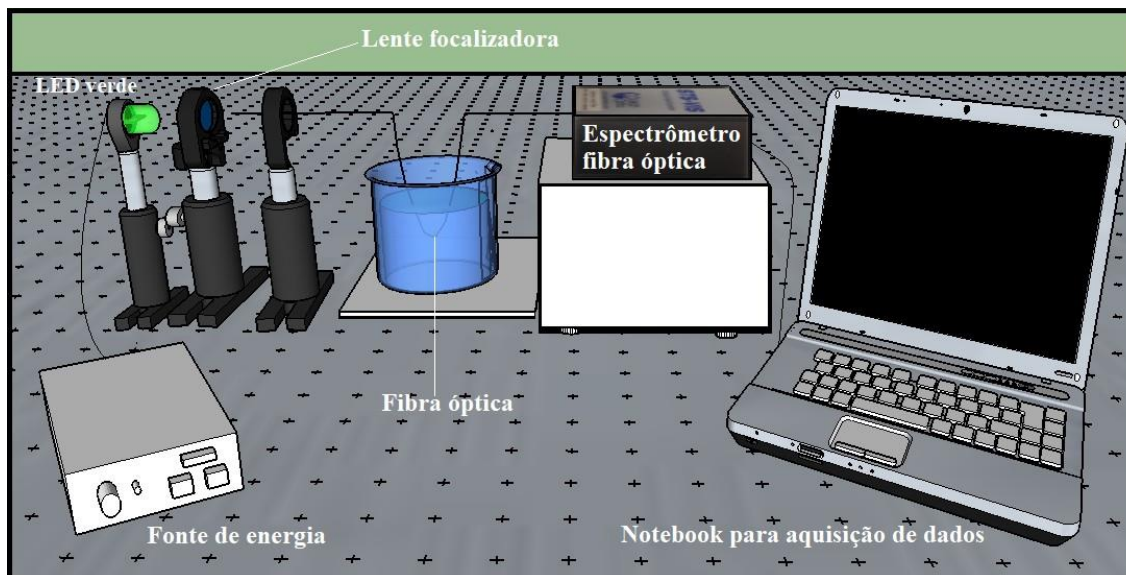


Figura 32 - Representação do sistema utilizado para captura das ondas evanescentes

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

5.3.2 Reagentes e soluções

A anilina ($\geq 99,5\%$), as pastilhas de tampão fosfato salino (PBS), ácido clorídrico (37%), CIP ($\geq 98\%$), acetona, persulfato de amônio ($\geq 98\%$) e glutaraldeído (25%) foram adquiridos da Sigma – Aldrich.

A caseína de alta pureza foi obtida da Amresco. O anticorpo monoclonal (IgG) foi obtida da Creative Diagnostics. As diluições de todas as soluções foram feitas em tampão PBS, preparado pela solubilização das pastilhas em água ultrapura.

Uma solução estoque de CIP ($1,00\text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada em metanol com adição de $50,0\text{ }\mu\text{L}$ de ácido fórmico. As sucessivas diluições de CIP foram realizadas em tampão PBS ($\text{pH } 7,4$). Os anticorpos IgG foram também diluídos em tampão PBS de forma a obter a concentração final de $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Nesta concentração a solução contendo os anticorpos

foram imobilizadas nas fibras ópticas. As demais soluções foram preparadas em água ultrapura.

5.3.3 Preparo dos imunossensores

Um total de 40 fibras ópticas foram funcionalizadas e preparadas para avaliar a repetibilidade do método, além de verificar se ocorreria alguma perda de sinal analítico após o uso em amostras complexas. Uma fibra de sílica de 200 μm de diâmetro, sem núcleo e revestida com polímero de baixo índice de refração foi confeccionada no Centre d'Optique, photonique et laser da Université Laval, e foi usada no desenvolvimento dos imunossensores. Um pedaço de 30 cm desta fibra foi cortada, polida nas extremidades e dobrada em formato “U”, com diâmetro de 12,70 mm (Figura 33). O polímero foi removido do centro, com auxílio de acetona, numa área aproximada de 10,00 mm.

A opção pela fibra óptica de sílica usada neste trabalho, embasou-se na alta janela de transparência desta fibra, além de baixas perdas ópticas e elevada pureza.



Figura 33 - Imagem da fibra dobrada em “U” evidenciando o raio de curvatura

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Na área sem o polímero, oxidou-se anilina, em presença de persulfato de amônio (1:1; v/v), ambos preparados em HCl e concentração de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, sendo o volume depositado sobre a área de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Após 5 min, observou-se a mudança de coloração na área, esta tornou-se verde escura conforme mostra a Figura 34, evidenciando a forma protonada e mais condutora da polianilina, que é o sal de esmeraldina.

Após a deposição na superfície da fibra, esta foi lavada, seca sob fluxo de N_2 e foi adicionado sobre a área, glutaraldeído 2 % (v/v) por 1 h. Após este tempo, lavou-se a fibra e esta foi seca sob fluxo de N_2 , e em seguida adicionou-se sobre o local, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de anticorpo anti-ciprofloxacina a $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ preparado em tampão PBS (pH 7,4), permanecendo por 2 h. Após este período, lavou-se a fibra com tampão PBS, secou-se sob fluxo de N_2 , e adicionou sobre o local $100 \text{ }\mu\text{L}$ de caseína por 1 h. Após este tempo, o imunossensor estava pronto para as análises. Uma imagem do imunossensor finalizado encontra-se na Figura 35.

A PANI foi usada como um substrato para a imobilização, e desta forma, era desejado que o grupamento amina, presente nas extremidades da PANI, reagisse com o aldeído (glutaraldeído) formando ligações imina. Além disso, as aminas presentes no IgG devem interagir com os grupos aldeído presentes na extremidade livre das moléculas formando uma ligação imina estável.

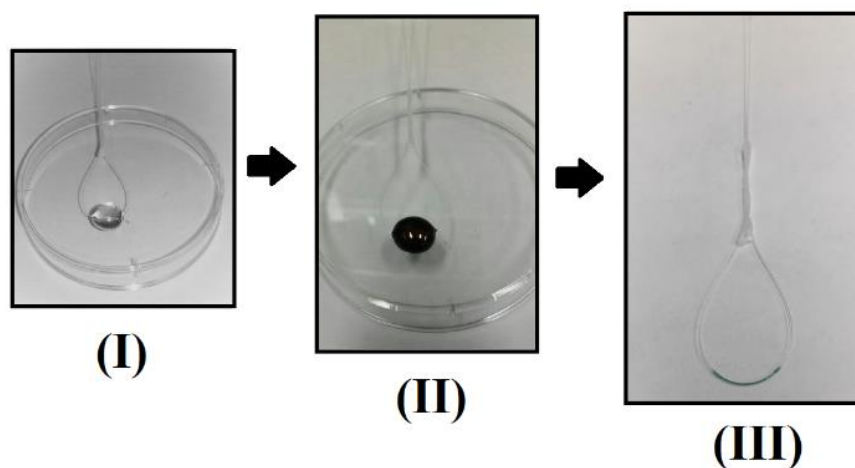


Figura 34 - Etapas de funcionalização da fibra óptica. (I) Adição da solução de persulfato de amônio e anilina (1:1, preparados em solução de HCl 0,100 mol L⁻¹) sobre a área com polímero removido; (II) oxidação da anilina a polianilina após 5 min; e (III) formação da fase condutora sal de esmeraldina

Fonte: Adaptado e retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴



Figura 35 - Foto do imunossensor após todas as etapas de funcionalização, com destaque para a área funcionalizada

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Como controle, foi funcionalizada uma fibra óptica com PANI, glutaraldeído e caseína, porém, sem adição de anticorpos anti-CIP, e uma solução contendo CIP a $10,0 \text{ ng L}^{-1}$ foi permeada por essa fibra para verificar se haveria ligações. Antes de cada análise, foram realizados estudos do tempo de estabilização do LED, deixando-o ligado de 0 a 70 min, e avaliando a partir de qual tempo ele encontrava-se estabilizado. Além disso, foi realizado estudo do tempo de exposição do imunossensor a solução de CIP, durante o tempo de 0 a 50 min.

5.3.4 Caracterização do imunossensor

O imunossensor foi caracterizado usando imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas com um microscópio Quanta 3D FEG. Os espectros Raman foram adquiridos com um espectrômetro Renishaw inVia acoplado a um microscópio Leica DM2700. Utilizou-se a geometria de retroespalhamento, com faixa de frequência de 50 a 3500 cm^{-1} . A luz de excitação era um laser polarizado horizontalmente operando 14 a 785 nm e a potência usada para as medições variaram de 3,4 a 6,8 mW. O feixe de laser foi focado usando uma lente objetiva L50x (NA 0,50), gerando um ponto de laser de 1 μm (diâmetro aproximado). A incerteza de deslocamento de Raman foi estimada em $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Os espectros de Raman foram obtidos após as principais etapas de funcionalização, a fim de observar as alterações químicas do imunossensor.

5.3.5 Figuras de mérito do método desenvolvido

Inicialmente foram estudados os tempos de estabilização do LED verde, onde este foi ligado a fonte de energia e teve os espectros monitorado durante 70 min como forma de avaliar em qual tempo a intensidade do sinal iria estabilizar. Além disso, acompanhou-se por 50 min os espectros de absorbância do imunossensor quando este foi colocado em presença de uma solução de CIP a 10 ng L^{-1} . Este teste objetivou avaliar qual seria o melhor tempo de incubação para proporcionar melhores valores de absorbância da ligação anticorpo-analito.

O método desenvolvido foi avaliado em termos de linearidade, seletividade, precisão intra-dia e inter-dia.¹⁵ O LD e LQ foram determinados conforme as diretrizes adotadas nos Capítulos anteriores.

Para avaliação de tais parâmetros foi utilizado um esgoto sintético preparado em laboratório (lab-made), cuja composição encontra-se descrita no Capítulo 4. Essa matriz foi usada por mimetizar a composição da fração solúvel do esgoto doméstico.

A linearidade do método foi avaliada pela curva analítica preparada em esgoto lab-made (previamente filtrado e diluído em tampão PBS) em 7 níveis de concentração na faixa de $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4$ ng L⁻¹, em triplicata (n = 3). A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada pelo DPR % das curvas analíticas, preparadas em triplicata no mesmo dia e usando sempre um novo imunossensor.

A precisão inter-dia foi avaliada pelo preparo em três dias alternados, da curva analítica, em triplicata e também expressos em termos de DPR %. Em todos os testes (precisão intra-dia e inter-dia), os procedimentos de regeneração do imunossensor não foram realizados. O cuidado de sempre utilizar um novo imunossensor para curva analítica, testes de precisão e análises de amostras foi adotado para evitar a saturação do anticorpo anti-ciprofloxacino. O imunossensor apresentou uma vida útil de 10 análises em amostras complexas sem perda de resposta analítica.

A recuperação do método, foi calculada por meio da Equação (13), sendo realizada pelo método de adição de padrão de CIP nas amostras de água residuárias (filtradas e diluídas em tampão PBS), em triplicata, de forma a obter a concentração final de $1,00 \times 10^4$ ng L⁻¹, seguida pela análise usando o método desenvolvido.

Foram avaliadas ainda, a seletividade do método desenvolvido, expondo o imunossensor a outros analitos comumente encontrados em águas residuárias, nas concentrações alta e baixa da curva analítica ($1,00 \times 10^4$ e $1,00 \times 10^{-2}$ ng L⁻¹, respectivamente) em triplicata (n = 3), sendo selecionado novamente CBZ, VLF, FLX e NOR.¹⁶⁻¹⁹

Como forma de avaliar a veracidade dos dados obtidos neste trabalho, realizaram-se as comparações dos dados obtidos por fibras ópticas com os dados obtidos por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (método adotado como referência e discutido detalhadamente no Capítulo 4).

5.3.6 Aplicação do método desenvolvido nas análises de águas residuárias

Na Université Laval foram coletadas 400 mL de duas diferentes amostras de águas residuárias da estação experimental de tratamento de esgoto da universidade durante o

verão e outono de 2019, e estas foram analisadas em triplicatas ($n = 3$). O armazenamento das amostras foi realizado em frascos limpos e secos de polipropileno de 500 mL, e estocadas por 24 h a 5 °C em refrigerador (Figura 36).

Antes das análises, as amostras foram filtradas em filtro de papel quantitativo (Unifil, diâmetro 110 mm, espessura 0,20 mm), seguidas da diluição em 1:5 em tampão PBS necessária para manutenção do pH 7,4 como forma de evitar a desnaturação do anticorpo imobilizado sobre a fibra óptica.

Como forma de minimizar o efeito de matriz, optou-se por realizar as análises por adição de padrão, foram adicionados volumes fixos de 0, 250, 500, 750, e 1000 μL da solução de CIP a $1,00 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$, e o volume dos balões de 25,0 mL foi completado com solução tampão PBS. Este processo foi realizado em triplicata ($n = 3$).

Antes das análises, as amostras de águas residuárias foram expostas ao imunossensor por diferentes tempos que variaram de 0 a 50 min, como forma de monitorar o melhor tempo que promoveria uma maior absorbância proveniente da ligação anticorpo-analito.



Figura 36 - Foto das amostras coletadas na estação de tratamento experimental da Université Laval

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 Avaliação dos parâmetros do imunossensor

Sabe-se que as aminas presentes nas extremidades da PANI reagem com os grupos aldeídos terminais do glutaraldeído formando ligações iminas. Na etapa seguinte, quando são adicionados os anticorpos anti-CIP, os aldeídos terminais do glutaraldeído irão se ligar aos grupos amina das moléculas de IgG, e assim a imobilização da molécula de anticorpo sobre a fibra óptica ocorrerá.¹¹

Conforme observado na Figura 34 (III), após a oxidação da anilina sobre a fibra óptica, a superfície desta tornou-se verde, evidenciando a formação da forma mais condutiva da PANI, conhecida como sal de esmeraldina. Esta apresentou um pico máximo de absorbância de 508 nm. Após a finalização de todas as etapas de funcionalização, observou-se uma pequena mudança no espectro de absorbância, ocasionado pelas moléculas de anticorpo anti-CIP, o pico máximo de absorção sofreu uma ligeira mudança para o comprimento de onda de 530 nm (deslocamento batocrômico), sendo este comprimento de onda utilizado para determinar CIP nas amostras de águas residuárias.

Quando o imunossensor sem adição de anticorpo anti-CIP, foi exposto a uma solução de esgoto lab-made enriquecida com CIP a $10,0 \text{ ng L}^{-1}$, não foram verificadas modificações no espectro de absorbância do sistema.

Na Figura 37 observa-se que em torno de 30 min a intensidade de radiação do LED já se encontrava estabilizada, sendo desta forma usada para as medidas. A escolha pelo LED verde, fundamentou-se em monitorar um único comprimento de onda, e avaliar as modificações ocorridas neste comprimento de onda após interação com a CIP.

Na Figura 38 observa-se que o tempo de 30 min foi o necessário para estabilizar a ligação anticorpo-analito, sendo desta forma utilizado em todas as análises.

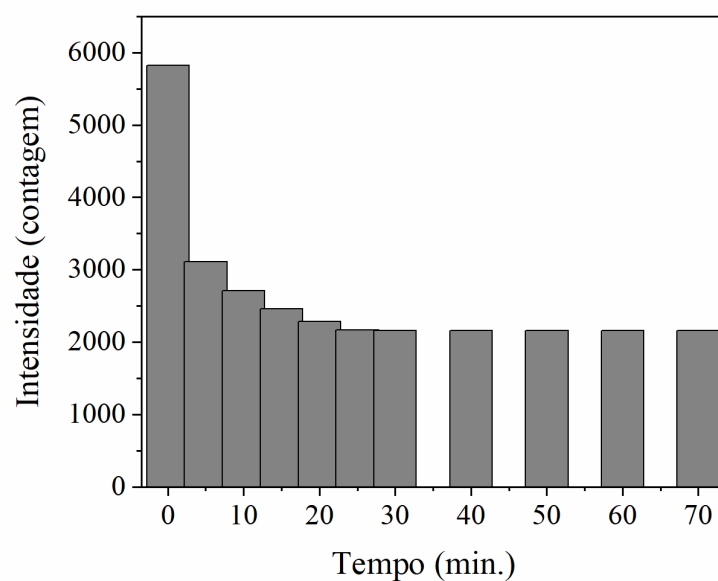


Figura 37 - Intensidade de sinal necessária para estabilizar o sinal do LED

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

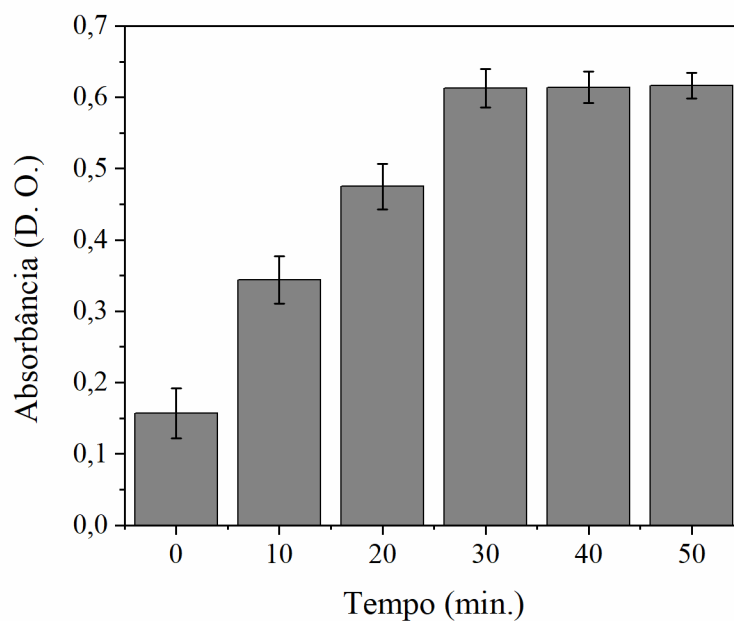


Figura 38 - Tempo de incubação necessário para proporcionar a melhor absorbância

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

5.4.2 Caracterização do imunossensor

Inicialmente, como forma de avaliar a funcionalização dos reagentes sobre a superfície da fibra óptica, realizou-se a MEV no imunossensor desenvolvido (Figura 39), verificando a distribuição homogênea na porção analisada.

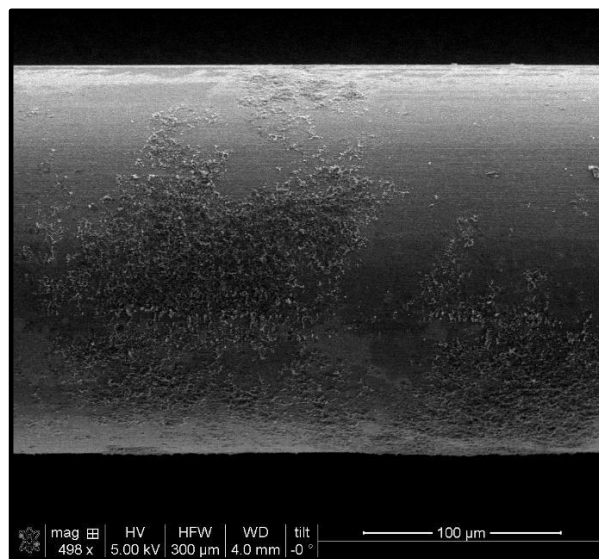


Figura 39 - Imagem obtida por MEV de uma porção do imunossensor desenvolvido (mag. 498 x)

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

Na Figura 40 parte (A) é possível observar a superfície da fibra não-funcionalizada e sem o polímero de recobrimento; Figura 40 parte (B) é mostrada a superfície da fibra após a oxidação da anilina a PANI em presença de persulfato de amônio; Figura 40 parte (C) a espessura do filme de PANI formado foi medida, sendo esta de aproximadamente 180 nm. Além disso, verificou-se que a PANI é similar a pequenas partículas de tamanho aproximado de 50-100 nm. Figura 40 parte (D) é mostrada a superfície após a adição do anticorpo IgG; Figura 40 parte (E) após a adição da caseína, e por fim na Figura 40 parte (F) o imunossensor após o contato com esgoto lab-made enriquecido com CIP a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$

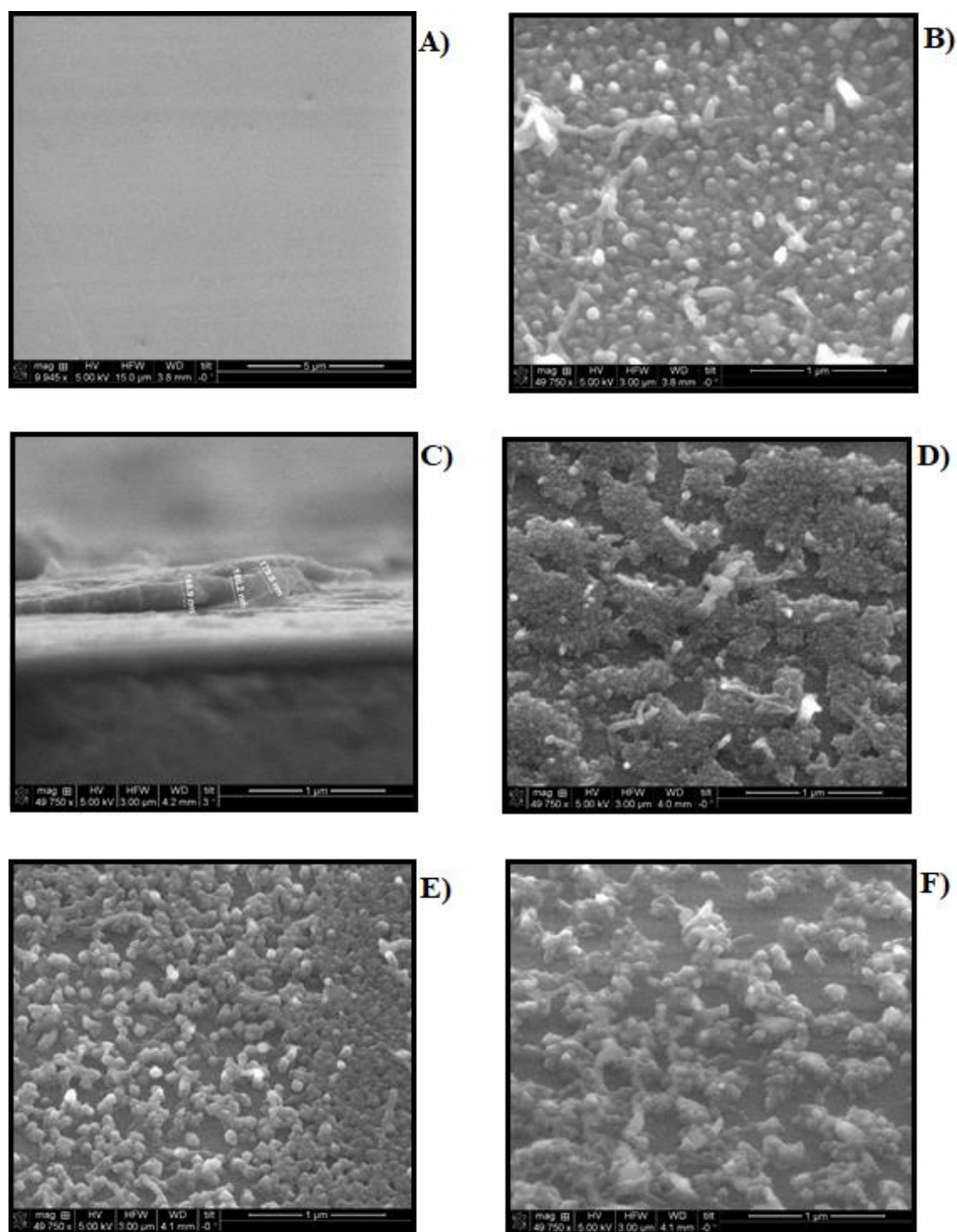


Figura 40 - MEV das etapas de funcionalização da fibra: (A) Fibra óptica sem o revestimento (mag. 9.945 x); (B) PANI depositada na fibra (mag. 49.750 x); (C) Espessura do filme de PANI depositada sobre a fibra (mag. 49.750 x); (D) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (mag. 49.750 x); (E) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + caseína (mag. 49.750 x); (F) PANI + glutaraldeído + IgG $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + caseína + analito (mag. 49.750 x)

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

Para complementar a caracterização do imunossensor desenvolvido, foram realizadas análises por espectroscopia Raman, para avaliar os modos vibracionais presentes após cada etapa da fibra modificada. Na Figura 41, são mostrados os espectros das principais etapas de funcionalização, sendo estes, a linha preta referente a CIP sólida a 98 %; linha verde a fibra não-funcionalizada; linha vermelha PANI funcionalizada sobre a fibra e por fim, a linha azul representando o imunossensor após a imersão em esgoto lab-made fortificado contendo $10,0 \text{ ng L}^{-1}$ de CIP. Vale ressaltar, que o principal objetivo da espectroscopia Raman foi detectar os modos vibracionais da CIP na fibra funcionalizada.

O espectro Raman de fibra óptica de sílica não funcionalizada apresenta as principais características das bandas de sílica vítrea a 431 cm^{-1} referentes à ligação Si-O-Si e deformação do tetraedro SiO_4 ; 604 e 804 cm^{-1} correspondem às vibrações simétricas de flexão de oxigênio em ponte aos anéis de siloxano de 3 e 4 membros, respectivamente; 793 cm^{-1} para o modo de estiramento simétrico de Si-O e estiramento assimétrico de Si-O-Si a 1385 cm^{-1} .^{20,21} O espectro Raman da fibra de sílica funcionalizada com PANI apresenta banda a 521 cm^{-1} referentes à deformação no plano da amina; 576 cm^{-1} referentes à deformação do anel quinoide; 1187 e 1591 cm^{-1} para a deformação por flexão C-H e vibração de alongamento C=C referente ao anel quinoide.^{22,23} O espectro Raman do imunossensor após a imersão em esgoto lab-made contendo CIP na concentração de $10,0 \text{ ng L}^{-1}$, demonstra os modos vibracionais da CIP, dando mais evidências da interação e ação seletiva entre o anticorpo (IgG) e o analito (CIP). Na região de baixa frequência, abaixo de 700 cm^{-1} , dominada pelos modos vibracionais atribuídos às deformações Ar-H, C-H e =C-H da CIP, nesse experimento foi possível destacar a definição da região e o aumento da intensidade dessas bandas, respectivamente.²⁴ Além disso, a ligação da CIP com o imunossensor pode ser confirmada pela presença de modos vibracionais, como a deformação no plano do ciclopropano no anel naftaleno a 745 cm^{-1} ; a 1221 cm^{-1} para a vibração do anel naftaleno e a vibração simétrica de estiramento do grupo -COO- a 1377 cm^{-1} , respectivamente.^{24,25} Embora a banda centralizada em 1592 cm^{-1} apresente a sobreposição de modos vibracionais do PANI, o fato é que a presença de CIP tornou essa banda mais intensa, pela presença de vibrações de alongamento simétricas e assimétricas em 1592 e 1616 cm^{-1} atribuído ao anel da quinolona e C=C do anel aromático, como pode ser visto no espectro Raman da CIP no estado sólido a 98 %.²⁴

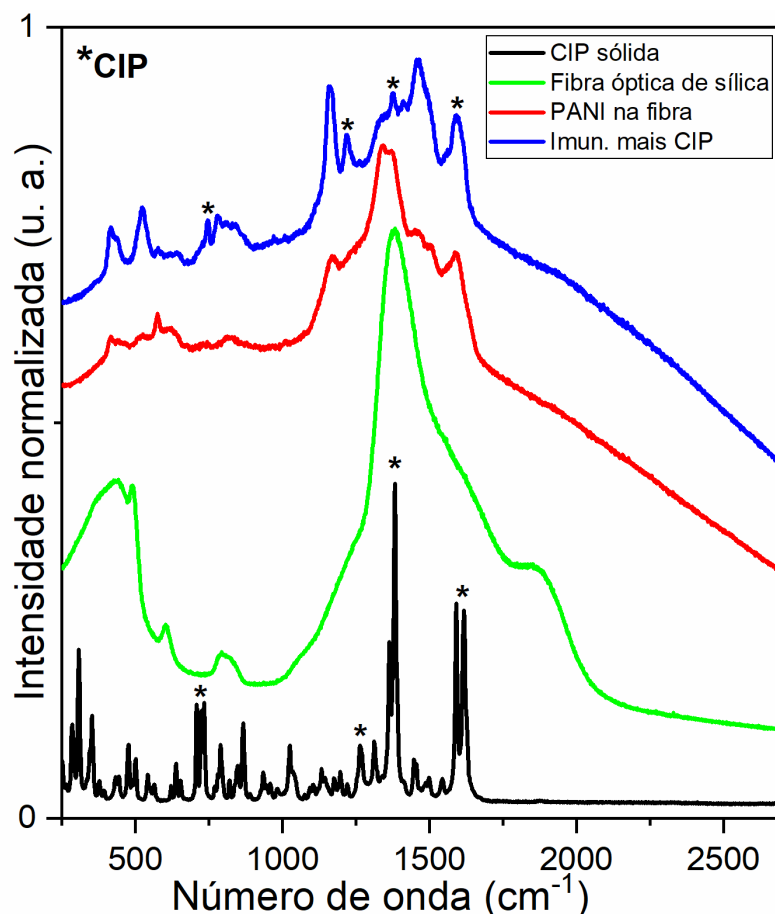


Figura 41 - Espectros Raman normalizados de ciprofloxacina (CIP) sólida ($\geq 98\%$) (linha preta); fibra óptica de sílica não-funcionalizada (linha verde); fibra óptica de sílica funcionalizada com polianilina (PANI) (linha vermelha) e imunossensor aplicado na análise de solução contendo CIP a $10,0 \text{ ng L}^{-1}$ em esgoto lab-made (linha azul) utilizando o laser 785 nm

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

5.4.3 Figuras de mérito do método desenvolvido

A linearidade do método foi avaliada pela construção de uma curva analítica na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$ (em triplicata). A ANOVA a 95 % de confiança foi aplicada para verificar se o modelo linear não apresentava falta de ajuste, obtendo $F_{\text{cal}} (0,710) < F_{(\text{tab. 95 \%})} (2,86)$, o que demonstra não haver falta de ajuste no modelo linear, considerando o logaritmo da concentração. O espectro de absorção da CIP na faixa

de 400 a 700 nm é mostrado na Figura 42, parte A), a curva obtida para este método foi $y = 3,80 \times 10^{-3} \ln [\text{CIP}] + 6,43 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0,999$, conforme mostrado na Figura 42, parte B). A ampla faixa linear utilizada neste estudo, pode ser atribuída a maior concentração de anti-CIP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) usada durante a etapa de funcionalização. Esse fato permitiu maiores interações entre anticorpo e o analito, aliado a isto, o espesso filme de PANI depositado, ofereceu alta capacidade de transmissão da radiação, gerando os resultados obtidos. Faixas lineares similares a obtida nesse estudo são relatadas em artigos anteriormente publicados, como observado por Ha, Chung e Bae (2016)²⁶, detectaram CIP em amostras alimentares usando também anticorpo anti-CIP, e obteve faixa linear de 0,100 a $1,00 \times 10^3 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Tsekenis et al., (2008)²⁷, desenvolveu um imunossensor para análise de CIP em leite, com faixa linear de 0,100 a $1,00 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$. De Faria et al., (2018)²⁸ apresentou um imunossensor impedimétrico para avaliação de adulterantes em carnes com faixa linear de $1,00 \times 10^{-12} - 1,00 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

A recuperação do método proposto foi de 91 %, demonstrando ser adequado para ser utilizado até mesmo em amostras complexas, como as águas residuárias.

O custo estimado de cada imunossensor desenvolvido foi de CAD \$1,0 (dólar canadense), equivalente a R\$ 4,46 (cotação realizada no dia 07/12/2021), com tempo de vida médio de uso de 10 amostras de águas residuárias.

A Tabela 9 resume as figuras de mérito do método proposto e também do método adotado como referência.

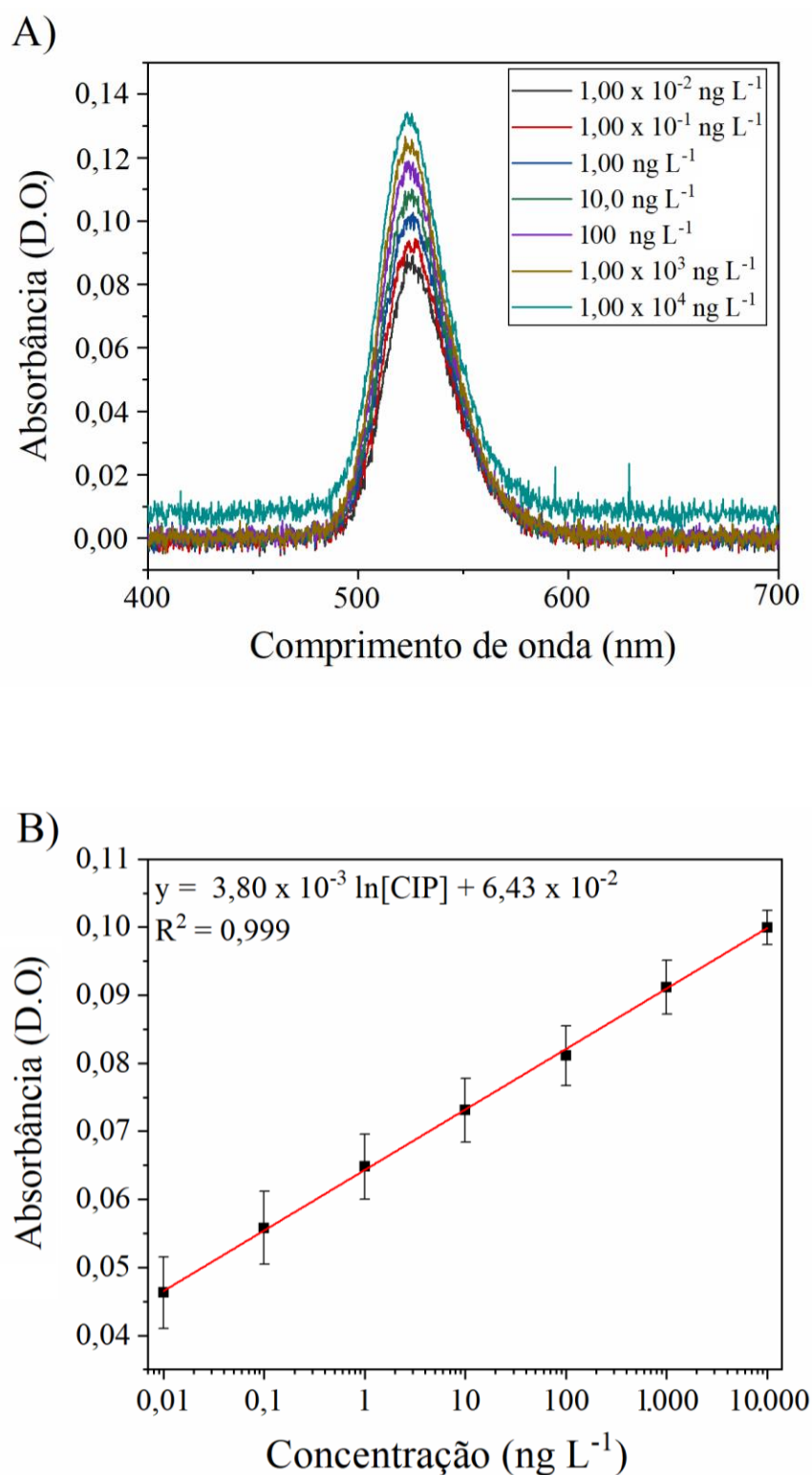


Figura 42 - (A) Espectros de absorção da CIP na faixa de 400 a 700 nm obtidos na faixa linear de $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4$ ng L^{-1} ; (B) Curva analítica obtida para CIP na faixa $1,00 \times 10^{-2}$ a $1,00 \times 10^4$ ng L^{-1} preparada em esgoto lab-made

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

Tabela 9 - Figuras de mérito obtidas para análises das amostras de águas residuárias usando imunossensor e o método adotado como referência (EIE)

Parâmetros	Fibras Ópticas	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)
LD (ng L ⁻¹)	3,30 x 10 ⁻³	0,100
LQ (ng L ⁻¹)	1,00 x 10 ⁻²	10,0
Precisão inter-dia (DPR %)	11,9	10,1
Precisão intra-dia (DPR %)	5,82	4,51
Equação da regressão	$A = 3,80 \times 10^{-3} \ln [\text{CIP}] + 6,43 \times 10^{-2}$ $R^2 = 0,999$	$\Delta R_{tc} = 51,3 \ln [\text{CIP}] + 1,12 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0,991$
Curva por adição padrão (concentração determinada)	$y = 5,25 \times 10^{-4} [\text{CIP}] + 5,77 \times 10^{-2}$ (549 ng L ⁻¹ - Amostra 1) $y = 6,0 \times 10^{-5} [\text{CIP}] + 3,2 \times 10^{-3}$ (267 ng L ⁻¹ - Amostra 2)	$y = 0,393 [\text{CIP}] + 46,0$ (585 ng L ⁻¹ - Amostra 1) $y = 0,157 [\text{CIP}] + 9,20$ (292 ng L ⁻¹ - Amostra 2)

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O método desenvolvido foi ainda comparado com outros métodos descritos na literatura científica, com relação aos parâmetros de LD, LQ, e uso de etapa de preparo de amostras, conforme apresentado no Quadro 8. É possível destacar que o presente método descrito nesta tese, não apresentou etapas de preparo de amostras (bastando somente uma filtração e diluição em tampão PBS), evitando contaminação cruzada, erros advindos da etapa de preparo da amostra, além de menor exposição do analista a estes elementos.

Quadro 8 - Comparação do método desenvolvido com outros métodos previamente publicados

Descrição da matriz	Método	Concentração de CIP (ng L⁻¹)	LD (ng L⁻¹)	Preparo de amostra	Referência
Águas residuárias- Canadá	Fibra óptica	267, 549	$3,30 \times 10^{-3}$	Não (Somente filtração e diluição em tampão PBS)	Método proposto
Águas residuárias de fazenda - Argentina	UHPLC-MS	$1,14 \times 10^3$	NR	Sim (adição de solução de Y ³⁺)	5
Águas residuárias - Paquistão	HPLC-UV	58,0	NR	Sim (complexação com Na ₂ -EDTA)	29
Águas residuárias de indústria farmacêutica	HPLC-DAD-UV	$3,00 \times 10^6 - 5,25 \times 10^6$	50,0	Sim (Extração em fase sólida e diluição em metanol)	30
Amostras águas residuárias - Durban	SPE/LC-MS/MS	708	0,330	Sim (centrifugação, filtração e uso de padrão interno)	31
Água de efluente da estação de tratamento- Shenyang	UHPLC-MS/MS	$1,36 \times 10^3$	8,00	Sim (diluição em metanol/uso de acetonitrila e diclorometano)	32

Dados: NR- não reportado.

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

5.4.4 Seletividade do imunossensor

Foram realizados estudo de seletividade do imunossensor, expondo a solução contendo individualmente CBZ, NOR, FLX e VLF, nas concentrações de $1,00 \times 10^{-2}$ e $1,00 \times 10^4$ ng L⁻¹ preparadas em esgoto lab-made (Figura 43). Não foram evidenciadas respostas com a mesma intensidade de sinal analítico igual ou superior a do analito, mesmo para a NOR que é da mesma família de antibióticos (fluoroquinolonas), tendo similaridade estrutural elevada, diferenciada apenas pela presença de um grupo metil. Assim, o método apresenta elevada seletividade para o analito nas condições avaliadas.

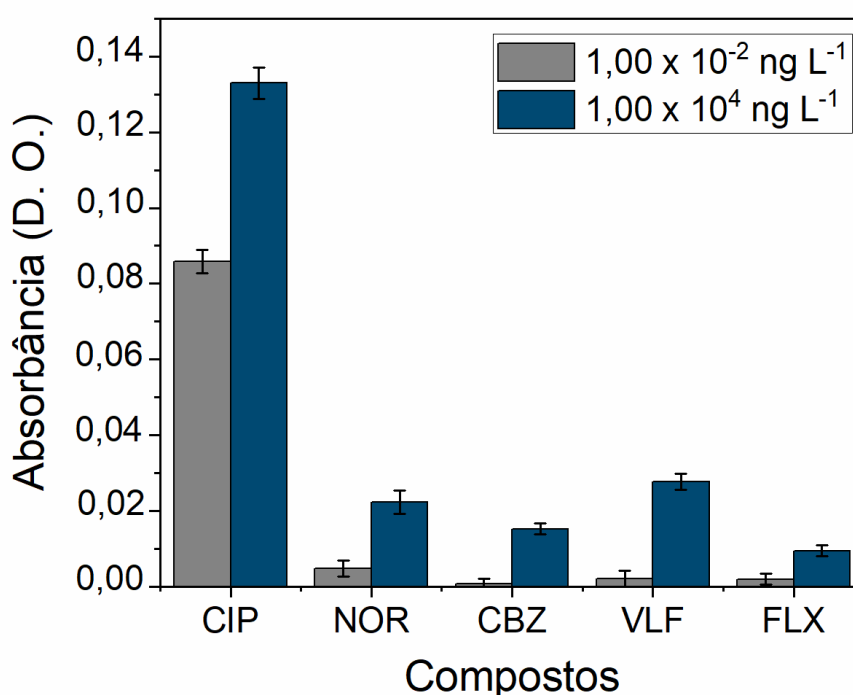


Figura 43 - Resposta do imunossensor em esgoto lab-made para os fármacos CIP, NOR, CBZ, VLF e FLX na concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ e $1,00 \times 10^4$ ng L⁻¹

Fonte: Retirado de Lamarca et al. (2020).¹⁴

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O imunossensor desenvolvido a partir de fibra óptica de sílica, tendo formato em “U”, apresentou a elevada seletividade, LQ de $10,0 \text{ pg L}^{-1}$, mesmo ao ser aplicado em amostras complexas. O imunossensor apresenta uma grande inovação na utilização de fibra óptica de sílica, podendo serem realizadas outras modificações em sua superfície de acordo com a aplicação planejada. Este sensor desenvolvido apresentou elevada seletividade, além de ter exigido apenas 25,0 mL de amostra diluída em tampão para as análises, além disso, não exigiu nenhuma etapa de preparo de amostras.

O método desenvolvido apresentou alta recuperação (91 %), reduzido tempo total de análise (30 min), enquanto a captura do sinal ocorreu em apenas 20s. O imunossensor mostrou ser uma ferramenta precisa para análises CIP em amostras de elevada complexidade, como as amostras de águas residuárias, sendo um avanço no uso de fibras ópticas de sílica aplicadas para análises ambientais.

Referências

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Water, Sanitization and Health. Disponível em: <https://www.who.int/phe/en/>. Acesso em: 09 de nov. 2021.

- 2 LEN, L.; WEI, L.; XIONG, Q.; XU, S.; LI, W.; LV, S.; LU, Q.; WAN, L.; WEN, Z.; ZHOU, W. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 238, n. 124680, 2020.

- 3 CHRISTOFILOPOULOS, S.; KALIAKATSOS, A.; TRIANTAFYLLOU, K.; GOUNAK, I. I.; VENIERI, D.; KALOGERAKIS, N. Evaluation of a constructed wetland for wastewater treatment: Addressing emerging organic contaminants and antibiotic resistant bacteria. **New Biotechnology**, v. 52, p. 94 – 103, 2019.

- 4 OLVERA-NÉSTOR, C. G.; MORALES-AVILA, E.; GÓMEZ-OLIVAN, L. M.; GALÁR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; NERI-CRUZ, N. Biomarkers of cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects in *Cyprinus carpio* exposed to complex mixture of contaminants from hospital effluents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, p. 326 – 332, 2016.

- 5 TEGLIA, C. M.; PEREZ, F. A.; MICHLIG, N.; REPETTI, M. R.; GOICOECHEA, H. C.; CULZONI, M. J. Occurrence, distribution, and ecological risk of fluoroquinolones in rivers and wastewaters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, p. 2305 – 2313, 2019.

- 6 LINDBERG, R.; JARNHEIMER, P.-Å.; OLSEN, B.; JOHANSSON, M.; TYSKLIND, M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. **Chemosphere**, v. 57, p. 1479 – 1488, 2004.

- 7 FEITOSA-FELIZZOLA, J.; CHIRON, S. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). **Journal of Hydrology**, v. 364, p. 50 – 57, 2009.

- 8 WANG, R.; FENG, F.; CHAI, Y.; MENG, X.; SUI, Q.; CHEN, M.; WEI, Y.; QI, K. Screening and quantitation of residual antibiotics in two different swine wastewater treatment systems during warm and cold season. **Science of the Total Environment**, v. 660, p. 1542 – 1554, 2019.

- 9 SINGH, P. K.; JAIRATH, G.; AHLAWAT, S. S.; PATHERA, A.; SINGH, P. Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1759 – 1765, 2016.

- 10 MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, p. 153 – 159, 2016.

- 11 CHANDRA, S.; BHARADWAJ, R.; MUKHERJI, S. Label free ultrasensitive optical sensor decorated with polyaniline nanofibers: Characterization and immunosensing application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 443 – 450, 2017.

- 12 SAI, V. V. R.; KUNDU, T.; MUKHERJI, S. Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2804 – 2809, 2009.

- 13 ADDANKI, S.; AMIRI, I. S.; YUPAPIN, P. Review of optical fibers-introduction and applications in fiber lasers. **Results in Physics**, v.10, p. 743 – 750, 2018.

- 14 LAMARCA, R. S.; FRANCO, D. F.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F.; MESSADDEQ, Y. Label-Free ultrasensitive and environment-friendly immunosensor based on a silica optical fiber for the determination of ciprofloxacin in wastewater samples. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 21, p. 14415 – 14422, 2020.

- 15 MILLER, J. N.; MILLER, J. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6 ed. Canada: Pearson Education Canada, 2010.

- 16 BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; BOIX, C.; RINCÓN, R. J.; CASTILLO, N.; ARIAS-MARÍN, L. P.; MANRIQUE-LOSADA, L.; TORRES-PALMA, R.; MONCAYO-LASSO, A.; HERNÁNDEZ, F. ‘An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater’. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 842 – 853, 2018.

- 17 ERARPT, S.; CAĞLAK, A.; BODUR, S.; CHORMEY, S. D.; ENGIN, Ö, G.; BAKIRDERE, S. Simultaneous determination of fluoxetine, estrone, pesticides, and endocrine disruptors in wastewater by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) following switchable solvent–liquid phase microextraction (SS–LPME). **Analytical Letters**, v. 52, n. 5, p. 869 – 878, 2019.

- 18 FEKADU, S.; ALEMAYEHU, E.; DEWIL, R.; DER BRUGGEN, B. V. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 324 – 337, 2019.
- 19 SERNA-GALVIS, E. A.; BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; MONCAYO-LASSO, A.; IBÁÑEZ, M.; HERNÁNDEZ, F.; TORRES-PALMA, R. A. Degradation of seventeen contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents by sonochemical advanced oxidation processes. **Water Research**, v. 154, p. 349 – 360, 2019.
- 20 YADAV, A. K.; SINGH, P. A review of structure of oxide glasses by Raman spectroscopy. **RSC Advances**, v. 5, p. 67583 – 67609, 2015.
- 21 ANDO, M. F.; BENZINE, O.; PAN, Z.; GARDEN, J. -L.; WONDRACZEK, K.; GRIMM, S.; SCHUSTER, K.; WONDRACZEK, L. Boson peak, heterogeneity and intermediate-range order in binary $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ glasses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5394, p. 1– 14, 2018
- 22 TRCHOVÁ, M.; MORÁVKOVÁ, Z.; ŠEDĚNKOVÁ, I.; STEJSKAL, J. Spectroscopy of thin polyaniline films deposited during chemical oxidation of aniline. **Chemical Papers**, v. 66, p. 415 – 445, 2012.
- 23 MORÁVKOVÁ, Z.; BOBER, P. Writing in a polyaniline film with laser beam and stability of the record: A Raman spectroscopy study. **Hindawi International Journal of Polymer Science**, p. 1 – 8, 2018.
- 24 YANG, L.; QIN, X.; JIANG, X.; GONG, M.; YIN, D.; ZHANG, Y.; ZHAO, B. SERS investigation of ciprofloxacin drug molecules on TiO_2 nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 27, p. 17809 – 17815, 2015.
- 25 ESPINOSA, J. C. M.; FRAGA, T. C.; MOLINA, L. M.; RAYAS, A. H.; BARAJAS, M. S. Qualitative evaluation of ciprofloxacin using Raman spectroscopy technique: preliminary results. **Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VIII**, L. Lilge, ed., v. 10417 of SPIE Proceedings (*Optical Society of America*, 2017, paper 104170).
- 26 HA, M.-S.; CHUNG, M.-S.; BAE, D.-H. Surface modification techniques and competitive immunoassay to detect residual ciprofloxacin in foods. **Food and Agricultural Immunology**, v. 27, p. 886 – 896, 2016,

27 TSEKENIS, G.; GARIFALLOU, G. -Z.; DAVIS, F.; MILLNER, P.; PINACHO, D.; SANCHEZ-BAEZA, F.; MARCO, M. -P.; GIBSON, T. D.; HIGSON, S. P. J. Detection of fluoroquinolone antibiotics in milk via a labelless immunoassay based upon an alternating current impedance protocol. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9233 – 9239, 2008.

28 DE FARIA, R. A. D.; IDEN, H.; BHARUCHA, E.; LINS V. F. C.; MESSADDEQ, Y.; MATENCIO, T.; HENEINE, L. G. D. A new tool for the detection of horsemeat adulteration in raw meat. **Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 9, n. 4, p. 1 – 7, 2018.

29 RIAZ, L.; MAHMOOD, T.; KAMAL, A.; SHAFQAT, M.; RASHID, A. Industrial release of fluoroquinolones (FQs) in the wastewater bodies with their associated ecological risk in Pakistan. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 14 – 20, 2017

30 HUSSAIN, S.; NAEEM, M.; CHAUDHRY, M. N. Estimation of residual antibiotics in pharmaceutical effluents and their fate in affected areas. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 2, p. 607 – 614, 2016.

31 FALEYE, A. C. ; ADEGOKE, A. A.; RAMLUKAN, K.; FICK, J.; BUX F.; STENSTRÖM, T. A. Concentration and reduction of antibiotic residues in selected wastewater treatment plants and receiving waterbodies in Durban, South Africa. **Science of The Total Environment**, v. 678, p. 10 – 20, 2019.

32 GUAN, J.; WANG, Y.; GUO, Y.; HUANG, P.; ZHAO, L. Simultaneous determination of 12 pharmaceuticals in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 28, p. 8099 – 8109, 2016.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

6 CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conforme descrito ao longo desta tese foram desenvolvidos métodos analíticos buscando usar materiais de baixo custo, com baixa geração de resíduos químicos, obtendo resultados rápidos e quando possível com mínimo preparo de amostras. Para atingir esses quesitos foram usadas imagens digitais obtidas por smartphone seja na determinação de fármacos em amostras farmacêuticas ou mesmo formaldeído em produtos de cuidado pessoal.

Além disso, foram desenvolvidos e aplicados em amostras de águas residuárias dois diferentes tipos de imunossensores labels-free, sendo um, usando eletrodo SPCE modificado e detecção por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, e o outro utilizando fibras ópticas ambos para a determinação de ciprofloxacina.

Como etapas futuras, a imobilização de outros materiais sobre as fibras ópticas, com a finalidade de determinar outros fármacos em águas residuárias, já que não houve tempo hábil para isto, em função da pandemia do novo SARS-CoV-2. Além disso, a imobilização de outros tipos de anticorpos, e até diferentes moléculas biológicas, que proporcionem menores tempos de incubação.

Desenvolvimento de solventes verdes para uso na etapa de preparo de amostras, visando a remoção de contaminantes emergentes em diferentes amostras.

E por fim, combinar a derivatização e imagens digitais como técnica de preparo de amostra para serem utilizadas na determinação de outros analitos.

APÊNDICES DAS AUTORIZAÇÕES PARA USO DE FIGURAS E TABELAS

A)

The screenshot shows the RSC article page. The article title is "Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader". The authors listed are Rafaela Silva Lamarca, Natalia da Costa Luchiani, Andressa Francielli Bonjorno, Juliano Passaretti Filho, Arnaldo Alves Cardoso, and Paulo Clairmont Feltosa de Lima Gomes. The abstract states: "The use of digital image-based methods in analytical determinations has been reported in several areas of science such as clinical, food and pharmaceutical analysis. These determinations have the advantages of low cost, reduced reagent and sample consumption, fast analysis, automation, and portability. Formaldehyde has been suggested as a probable human carcinogen. Formaldehyde and formaldehyde-releasers are commonly used as preservatives in cosmetics and other pharmaceuticals. Thus, this study aims to determine formaldehyde in cosmetics and personal care products using digital images of gas-diffusion microextraction captured using a smartphone. Seven samples of". On the right side, there is a sidebar with tabs: "About", "Cited by", and "Related". The "About" tab is selected, showing the article title, authors, and a "Check for updates" button. Below the authors, there is a section for "Author affiliations". At the bottom of the sidebar, there is a "Copyright Clearance Center request page" link and a "how to correctly acknowledge RSC content" link.

B)

The screenshot shows the CCC RightsLink page. The article title is "A low cost method for carbamazepine, ciprofloxacin and norfloxacin determination in pharmaceutical formulations based on spot-test and smartphone images". The author is Rafaela Silva Lamarca, Paulo Clairmont Feltosa de Lima Gomes. The publication is Microchemical Journal, Elsevier, January 2020. The page includes a "Journal Author Rights" section with the following text: "Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>". At the bottom, there are "BACK" and "CLOSE WINDOW" buttons.

C)

Issue 4, 2020, Issue In Progress Previous Article Next Article

RSC Advances

From the journal:
RSC Advances

Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor†

Check for updates

Rafaela Silva Lamarca, ^{a,b} Ricardo Adriano Dorado de Faria, ^{a,c} Maria Valnice Boldrin Zanoni, ^b Marcelo Nalin, ^d Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, ^b and Younés Messaddeq ^{a,d}

Author affiliations

Abstract

In this study an impedimetric immunosensor was developed in order to determine ciprofloxacin (CIP) in wastewater samples, an emergent contaminant widely found in wastewater. To achieve this, an anti-ciprofloxacin antibody was immobilized on the surface of a printed carbon electrode. Then, the developed immunosensor was applied in wastewater samples from Université Laval residences (Québec, Canada) through the load transfer resistance (R_{ct}) using $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ as a redox probe, and the average CIP concentration was found to be $2.90 \times 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$. The observed R_{ct} changes presented a linear relationship from CIP concentrations of 10^{-6} to $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, with detection and quantification limits of 2.50×10^{-6} and $7.90 \times 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The immunosensor presented high selectivity and repeatability, as well as a good recovery rate in wastewater samples (97%). Significant interference with other compounds was not observed. The proposed method requires only 30 μL of sample without the use of organic solvents or preceding sample preparation and/or extraction techniques. Moreover, the method is fast: only 20 min of incubation followed by 2 min of analysis time was sufficient to obtain the CIP concentration. The method's estimated cost is US 2.00 per sample.

Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor

R. S. Lamarca, R. A. D. D. Faria, M. V. B. Zanoni, M. Nalin, P. C. F. D. Lima Gomes and Y. Messaddeq, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 1838 DOI: 10.1039/C9RA09083E

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence](#). You can use material from this article in other publications, without requesting further permission from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given and it is not used for commercial purposes.

To request permission to reproduce material from this article in a commercial publication, please go to the [Copyright Clearance Center request page](#).

If you are an author contributing to an RSC publication, you do not need to request permission provided correct acknowledgement is given.

If you are the author of this article, you do not need to request permission to reproduce figures and diagrams provided correct acknowledgement is given. If you want to reproduce the whole article in a third-party commercial publication (excluding your thesis/dissertation for which permission is not required) please go to the [Copyright Clearance Center request page](#).

Read more about [how to correctly acknowledge RSC content](#).

D)

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Label-Free Ultrasensitive and Environment-Friendly Immunosensor Based on a Silica Optical Fiber for the Determination of Ciprofloxacin in Wastewater Samples

Author: Rafaela Silva Lamarca, Douglas Faza Franco, Marcelo Nalin, et al

Publication: Analytical Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Nov 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW