

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**CAROLINA MARIA FIORAMONTI CALIXTO**

**Utilização de eletrodos compósitos na análise voltamétrica de  
tetraciclinas em amostras biológicas e ambientais**

**SÃO CARLOS**

**2012**

## **Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em acervo  
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**CAROLINA MARIA FIORAMONTI CALIXTO**

**Utilização de eletrodos compósitos na análise voltamétrica de tetraciclinas em amostras biológicas e ambientais**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

**SÃO CARLOS**

**2012**

*“De tanto ver triunfar as nulidades,  
De tanto ver prosperar a desonra,  
De tanto ver crescer a injustiça,  
De tanto ver agigantarem-se os  
poderes nas mãos dos maus,  
O homem chega a desanimar da  
virtude,  
A rir-se da honra,  
A ter vergonha de ser honesto.”*

Rui Barbosa

*Aos meus pais, João e Rosana, pelo apoio e  
confiança.*

*Aos meus irmãos, Giovana e João Gabriel.*

*Aos meus queridos avós, Vilma e Israel, e à tia  
Railda, pelo carinho.*

*Ao Fábio, pelo amor, paciência e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus por me conceder saúde e paz para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro pela oportunidade, confiança e orientação durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gilberto Chierice pela disponibilidade do laboratório e pelos ensinamentos.

À Dr<sup>a</sup>. Priscila Cervini, pela amizade e pela ajuda indispensável em grande parte do trabalho.

A todos os amigos do LATEQS e GQATP, espero não esquecer ninguém. Aos atuais:

Sidney, Rita, Bia, Thalita, Luis Carlos, Abigail, Onias, Eliene, Fernanda, Renata, Manoel, Arley, Pedro, Mônia, Glauco, Diego, Fellipy, Amanda, Ana Paula, Salvador, Marli e Toninho. Aos antigos: Roberta, Fernando, Gilbert, Lucinéia, Ivana, Milena, Adriana, Felipe, Royal, Toni, Luiz, Rafael, Andressa, Tácia, Glimaldo, Juliana, Graziela.

Aos professores do IQSC/USP pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Marco Aurélio Carneiro Meira Bergamaschi, pesquisador da EMBRAPA Pecuária Sudeste, pelas amostras de urina bovina.

À enfermeira Annie J. Correa, responsável pelo Banco de Leite da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, pelas amostras de leite materno.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Aos meus sogros, Luiza e Paulo.

Em especial, ao meu marido Fábio por todo amor e apoio, em todos os momentos.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Neste trabalho, um eletrodo compósito à base de grafite e poliuretana (EGPU) 60% (grafite, *m/m*) foi avaliado quanto ao seu potencial para determinação dos antibióticos da família das tetraciclinas em amostras de água natural, de urina bovina e humana, e em amostras de leite bovino e humano. Visando desenvolver métodos simples, de baixo custo e com baixa geração de resíduos, o eletrodo foi usado sem modificação, para atender a estes propósitos e considerando os níveis de concentração das tetraciclinas nas amostras biológicas. A otimização dos parâmetros em voltametria de pulso diferencial (DPV) foi realizada para a determinação dos antibióticos tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clortetraciclina (CTC) em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 2,3, permitindo atingir limites de detecção de 2,6 µmol L<sup>-1</sup>, 1,7 µmol L<sup>-1</sup> e 0,82 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, sem a necessidade de renovação da superfície, entre as medidas sucessivas. Durante as determinações de TC e OTC em amostras de água natural e purificada, foram observadas recuperações entre 92,6% e 100%, após etapa de pré-concentração. As amostras de urina foram acidificadas, em seguida centrifugadas para a remoção de partículas sólidas e proteínas. A TC e OTC foram determinadas diretamente, na amostra de urina tratada e diluída em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 2,3. Durante a determinação de TC e OTC nas amostras de urina, após o preparo da amostra, foram obtidas recuperações entre 96% e 100%. As amostras de leite bovino e humano foram intencionalmente contaminadas com TC. Após preparo das amostras, estas foram submetidas à extração, usando cartucho para extração em fase sólida (SPE). Após eluição e retomada do analito retido no cartucho, a quantidade de TC presente nas amostras foi determinada pelo método de adição de padrão, usando DPV, com EGPU 60% (grafite, *m/m*). Foram obtidas recuperações entre 76% e 103% para as amostras de leite bovino e recuperações entre 91% e 100 % para as amostras de leite humano, que mostram que o eletrodo proposto pode ser usado neste tipo de determinação com as características postuladas acima.

## ABSTRACT

A bare graphite-polyurethane composite electrode 60% (graphite, *m/m*) (GPUE) was evaluated in the determination of tetracycline (TC) class antibiotics in natural water as well as, in human and bovine urine and in milk samples. Thus, a DPV procedure was optimized for the determination of tetracycline, oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC) antibiotics in phosphate buffer 0.10 mol L<sup>-1</sup> pH 2.3, resulting in LOD of 2.6 μmol L<sup>-1</sup>, 1.7 μmol L<sup>-1</sup> and 0.82 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. During the determination of TC and OTC in the water samples, recoveries between 92.6 and 100% were found, after pre-concentration stage. The urine samples were submitted to acidification followed by centrifugation to remove solids and proteins. During the determination of TC and OTC in urine samples, after pre-treatment of urine, recoveries between 96 and 100% were found. The composite electrode was also evaluated in the determination of TC in the bovine and human milk samples. During the determination of TC in milk, recoveries between 76 and 103% were found for bovine milk and recoveries between 91 and 100% were found for human milk after pre-concentration stage, showing the feasibility of the procedure.



## GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**a** – Amplitude de Pulso

**b** – Coeficiente angular da reta

**C** – Concentração

**CTC** – Clortetraciclina

**DC** - Doxiciclina

**DPV** – Voltametria de Pulso Diferencial

**E** – Potencial

**E<sub>p</sub>** – Potencial de Pico

**ECS** – Eletrodo de Calomelano Saturado

**EGM** – Eletrodo Gotejante de Mercúrio

**I** – Corrente

**I<sub>p</sub>** – Corrente de Pico

**LOD** – Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**OTC** - Oxitetraciclina

**PU** - Poliuretana

**R** – Coeficiente de Correlação

**SPE** – Extração em Fase Sólida (do inglês “Solid Phase Extraction”)

**S<sub>b</sub>** – Desvio-padrão do Branco

**SD** – Desvio-Padrão

**TC** – Tetraciclina

**t<sub>pré-conc</sub>** – Tempo de pré-concentração

**U.H.T.** – Ultra High Temperature

**Φ** – Diâmetro da Superfície do Eletrodo

**v** - Velocidade de Varredura

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da prensa manual utilizada na preparação dos eletrodos compósitos grafite-PU (grafite,  $m/m$ ).
- Figura 2 - Esquema de preparação do EGPU (grafite,  $m/m$ ).
- Figura 3 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) na ausência (---) e na presença (—) de solução de TC e OTC, ambas  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e CTC  $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3, 2,3 e 4,0, respectivamente, com  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura 4 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) utilizando solução de TC  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 2,3.
- Figura 5 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) utilizando soluções de TC, OTC, ambas  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e CTC  $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , nos diferentes valores de pH (pH 2,3-7,3), com  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura 6 - Relação entre o potencial de pico em voltametria de pulso diferencial e pH, em solução tampão fosfato, em diferentes valores de pH, contendo TC  $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 7 - Relação entre o potencial de pico em voltametria de pulso diferencial e pH, em solução tampão fosfato, em diferentes valores de pH, contendo CTC  $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 8 - Voltamogramas em pulso diferencial em diferentes concentrações de TC, OTC e CTC, respectivamente, utilizando o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ). No detalhe as curvas analíticas descritas.
- Figura 9 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em água natural.
- Figura 10 - Demonstração do uso do método gráfico na estimativa do valor da corrente de pico do voltamograma de pulso diferencial obtido para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) para a determinação de TC, em água natural: (a) curva estimada para a linha base e (c) resposta voltamétrica na presença do TC.
- Figura 11 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para OTC no EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em urina bovina.

- Figura 12 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de OTC em urina bovina.
- Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de TC em urina humana.
- Figura 14 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de OTC em urina humana.
- Figura 15 - Voltamograma de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.
- Figura 16 - Voltamograma de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.
- Figura 17 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino. Teste 1.
- Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino. Teste 2.
- Figura 19 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.
- Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite humano.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fórmulas estruturais das principais tetraciclinas

Tabela 2 - Resumo dos resultados descritos para determinação eletroquímica de tetraciclinas, incluindo técnicas, eletrodos, dados analíticos e referências

Tabela 3 - Resultados obtidos para o EGPU 60% (grafite, *m/m*).

Tabela 4 - Resultados da determinação de TC e OTC em amostras de água natural e purificada usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), após uso de SPE, considerando um valor original de  $1,90 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $914 \text{ ng mL}^{-1}$ ), na amostra

Tabela 5 - Resultados da determinação de OTC em urina bovina usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de  $0,47 \text{ mg mL}^{-1}$  na amostra

Tabela 6 - Resultados da determinação de TC em urina humana usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de  $283 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TC na amostra

Tabela 7 - Resultados da determinação de OTC em urina humana usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de  $285 \mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC na amostra

Tabela 8 - Experimentos para otimização do solvente de eluição do cartucho na determinação de TC em leite bovino

Tabela 9 - Resultados da determinação de TC em três amostras diferentes de leite bovino usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de 100 e  $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  na amostra

Tabela 10 - Resultados da determinação de TC em amostra de leite humano usando o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de  $0,43 \text{ mg L}^{-1}$  na amostra

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	15
1.1	Apresentação.....	15
1.2	Determinação de fármacos em fluidos biológicos e/ou amostras ambientais utilizando técnicas eletroanalíticas.....	16
1.3	Antibióticos .....	18
1.3.1	Tetraciclina.....	20
1.4	Comportamento eletroquímico e estabilidade das tetraciclina.....	24
1.5	Revisão bibliográfica de métodos de determinação voltamétrica de tetraciclina .....	26
1.6	Eletrodos compósitos.....	31
1.7	Resina poliuretana.....	33
1.8	Revisão bibliográfica dos eletrodos compósitos à base de grafite e poliuretana (PU).....	35
2	Objetivos.....	39
3	Parte Experimental.....	41
3.1	Reagentes e soluções.....	41
3.2	Preparação dos eletrodos compósitos.....	41
3.3	Tratamento mecânico .....	43
3.4	Equipamentos .....	43
3.5	Procedimento para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em amostras de água natural.....	44
3.6	Procedimento para a determinação de oxitetraciclina em urina bovina.....	46
3.7	Procedimento para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em urina humana.....	47
3.8	Procedimento para a determinação de tetraciclina em amostras de leite bovino e humano.....	48
4	Otimização dos parâmetros voltamétricos .....	51
4.1	Voltametria cíclica.....	51

4.2 Voltametria de pulso diferencial.....	52
4.2.1 Otimização dos parâmetros.....	52
4.2.2 Estudo do efeito do pH na resposta voltamétrica das tetraciclinas .....	54
4.2.3 Curvas analíticas para as tetraciclinas em DPV .....	63
5 Determinação de TC e OTC em amostras de água natural .....	68
6 Determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em amostras de urina bovina e humana .....	74
6.1 Determinação de OTC em amostra de urina bovina.....	74
6.2 Determinação de TC e OTC em amostras de urina humana.....	80
7 Determinação de tetraciclina em amostras de leite bovino e humano .....	85
7.1 Preparo da amostra de leite.....	85
7.2 Procedimento de extração em fase sólida.....	86
7.3 Determinação de tetraciclina em amostras de leite bovino .....	91
7.4 Determinação de tetraciclina em amostras de leite humano .....	94
8 Conclusões .....	98
Trabalhos futuros .....	100
Outras Atividades .....	102
Trabalhos apresentados.....	102
Congressos nacionais.....	102
Congresso internacional .....	102
Artigos .....	103
Prêmio .....	104
Estágio supervisionado em docência .....	104
Referências Bibliográficas.....	106

## ***Capítulo I - INTRODUÇÃO***

## 1 Introdução

### 1.1 Justificativa

O propósito deste trabalho é desenvolver métodos simples para a determinação de antibióticos da classe das tetraciclinas em amostras ambientais e biológicas, usando o eletrodo compósito à base de grafite e resina poliuretana (PU), sem modificação, para amostras contendo níveis de concentrações de  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com menor preparo de amostra possível e com a mínima geração de resíduos.

A determinação das tetraciclinas foi motivada pelo seu uso amplo nas práticas médicas em humanos e animais, resultando na possibilidade de contaminação de águas residuais em indústrias farmacêuticas e, esgotos, assim como em produtos alimentícios, como o leite.

A determinação voltamétrica das tetraciclinas em eletrodos não modificados representa um desafio dado aos potenciais relativamente elevados de sua oxidação, a baixa velocidade de transferência de elétrons, o que leva à sensibilidade relativamente pequena, devendo o eletrodo ser capaz de contornar ambos os problemas.

Entretanto, as concentrações relativamente elevadas presentes na excreção renal desses antibióticos, sugerem sucesso na análise voltamétrica das tetraciclinas.

Primeiramente, foi realizada uma tentativa de determinação do antibiótico amoxicilina (AMX), mas o pico de oxidação deste analito coincide com um pico de oxidação de grupos funcionais presentes na resina usada na confecção do eletrodo compósito grafite-PU, o que inviabilizou as medidas quantitativas. Em virtude disso, optou-se por utilizar os antibióticos da família das tetraciclinas, cujos potenciais de pico não se situam na região crítica.



O eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*) foi utilizado para investigar o comportamento voltamétrico dos antibióticos: tetraciclina, oxitetraciclina e da clortetraciclina, já que essa composição mostrou-se a mais eficiente em trabalhos anteriores. Foram avaliados os parâmetros relativos ao intervalo de potenciais, eletrólito suporte, pH, velocidade de varredura e amplitude de pulso. Para cada analito, foram obtidas curvas analíticas para definição de intervalos lineares de resposta, limites de detecção, limite de quantificação e sensibilidade.

Após definição destas condições, os procedimentos foram aplicados na determinação dos analitos nas amostras de água natural, de urina bovina e humana, e de leite bovino e humano.

Testes de adição e recuperação também foram realizados para uma caracterização dos métodos analíticos desenvolvidos, quanto a sua exatidão e repetibilidade.

## **1.2 Determinação de fármacos em fluidos biológicos e/ou amostras ambientais utilizando técnicas eletroanalíticas**

A literatura é rica em métodos voltamétricos e cromatográficos para a determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais. A principal vantagem das técnicas eletroanalíticas residiria no custo das análises e na simplicidade de procedimentos, aliada aos baixos limites de detecção, uma vez otimizados os parâmetros de análise e na geração de volumes menores de resíduos, em relação a outros métodos.

A determinação de fármacos na natureza é motivo de preocupação desde há algum tempo. Díaz-Cruz e Barceló<sup>1</sup> apresentaram um artigo de revisão sobre o assunto já em 2004. Entretanto, devido à intensidade do problema, ele vem sendo abordado pela

grande imprensa em veículos de comunicação em massa, como apresentado no Jornal Nacional, da Rede Globo de Televisão, há algum tempo. <sup>2</sup>

A contaminação das águas, por fármacos, pode ocorrer por diferentes fontes como a excreção humana em esgotos domésticos e de animais, quando drogas de uso veterinário são usadas em criatórios de grande escala ou despejos industriais. O controle das águas de rejeito das indústrias farmacêuticas pode ser realizado, pois, neste caso, são esperadas concentrações maiores que aquelas encontradas nas águas de rios ou lagos.

Os fármacos utilizados como analitos foram os antibióticos da família das tetraciclina: tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina.

Neste trabalho a extração em fase sólida (SPE) foi usada para a pré-concentração do analito e eliminação de componentes da matriz, visando melhorar a seletividade do método desenvolvido. Em seguida, os analitos foram retomados por eluição com solvente adequado e determinados por técnicas voltamétricas, usando o eletrodo compósito à base de grafite-PU, ao invés dos procedimentos cromatográficos, normalmente empregados.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada em mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada *cartucho de extração*, a qual contém a fase sólida, denominada fase estacionária em cromatografia. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada sob vácuo, de forma a penetrar no cartucho. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito em concentração já apropriada para análise. <sup>3</sup>

### 1.3 Antibióticos

O desenvolvimento dessa classe de fármacos se baseou na teoria microbiana das doenças, baseada nos trabalhos de Louis Pasteur e Robert Koch, que correlacionaram microrganismos específicos com doenças bem definidas. <sup>4</sup>

No século XX, essa teoria microbiana teve um avanço, devido à identificação e a caracterização de muitos patógenos microbianos e seus mecanismos patogénéticos e a introdução dos agentes antimicrobianos. <sup>4</sup>

Com isso, definiram-se os antibióticos como compostos naturais ou sintéticos, que, em doses adequadas, podem inibir o crescimento ou mesmo causar a morte de fungos e bactérias. <sup>5</sup>

Um antibiótico ideal deve preencher as seguintes características: <sup>6</sup>

- apresentar ação antibacteriana seletiva e potente, de preferência sobre ampla série de microrganismos, ou seja, de amplo espectro;
- ser bactericida e não somente bacteriostático;
- exercer sua atividade antibacteriana em presença dos líquidos do organismo e não ser destruído por enzimas teciduais;
- não perturbar as defesas do organismo,
- não produzir efeitos colaterais graves;
- não produzir efeitos de sensibilização alérgica;
- não provocar o desenvolvimento de resistência dos microrganismos sensíveis;
- absorção, distribuição, destino e excreção devem ser eficientes, a fim de obter rapidamente os níveis bactericidas no sangue, tecidos, líquidos

teciduais, inclusive no líquido céfalo-raquidiano e na urina, mantendo-se no organismo pelo tempo necessário para ação;

- ser eficaz por todas as vias de administração;
- apresentar a possibilidade de ser fabricado em grandes quantidades e a custo acessível.

Os antibióticos diferem muito nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano de atividade e nos mecanismos de atuação. Por isso, é necessária uma classificação desses fármacos, sendo a mais comum aquela que se baseia na estrutura química e no mecanismo de ação. <sup>7,8</sup>

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos são os mais utilizados na clínica médica e podem ser distribuídos nas seguintes classes: <sup>5</sup>

- *β-lactâmicos,*
- *tetraciclinas,*
- *aminoglicosídeos,*
- *macrolídeos,*
- *peptídeos cíclicos,*
- *estroptograminas.*

As classes de antibióticos de origem sintética incluem: <sup>5</sup>

- *sulfonaminas,*
- *fluoroquinolonas,*
- *oxazolidinonas.*

### 1.3.1 Tetraciclina

Os antibióticos da família da tetraciclina selecionados, foco deste trabalho, apresentam importância tanto no tratamento de humanos, quanto na produção animal, podendo aparecer no meio ambiente, pois são fármacos largamente produzidos e utilizados.

A tetraciclina (TC), 2-(amino-hidróxi-metilideno)-4-dimetilamino-6,10,11,12a-tetrahidróxi-6-metil-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-1,3,12-triona (Tabela 1), é um dos fármacos mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas em humanos e na medicina veterinária, devido ao seu amplo espectro de atividade contra bactérias *gram-positivas* e *gram-negativas*.<sup>9</sup>

As tetraciclina foram descobertas, em consequência, de uma pesquisa de amostras de solo, coletadas em várias partes do mundo, com o objetivo de encontrar microrganismos produtores de antibióticos.<sup>4</sup>

A Tabela 1 apresenta as estruturas químicas das principais tetraciclina utilizadas nas práticas médicas e veterinárias, incluindo as que foram objeto de estudo no presente trabalho.

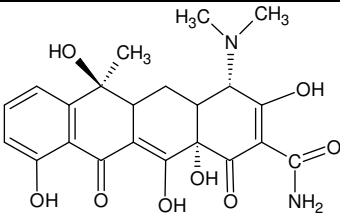
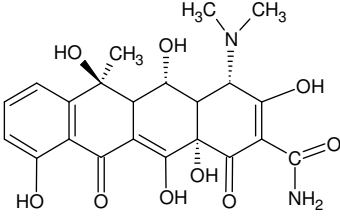
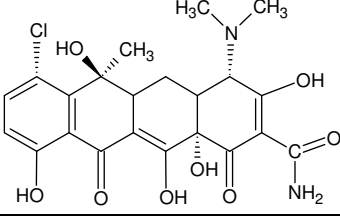
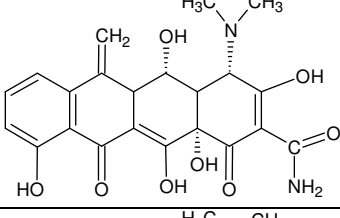
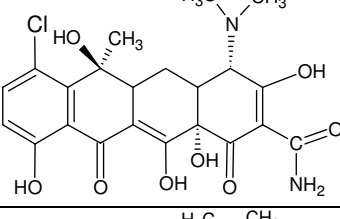
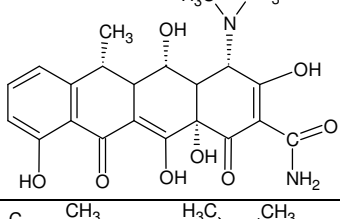
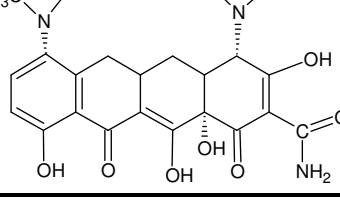
Em 1945, Benjamin Duggar descobriu a primeira tetraciclina, a clortetraciclina (CTC), que é um produto da fermentação natural de uma bactéria do solo a *Streptomyces aureofaciens*.<sup>10</sup> Essa descoberta marcou a introdução do primeiro antibiótico ativo contra uma variedade de bactérias e de outros microrganismos.<sup>6</sup>

A oxitetraciclina (OTC) é um produto da fermentação natural da bactéria *Streptomyces rimosus*. Já, a tetraciclina é um derivado semissintético da clortetraciclina, e a demeclociclina é o produto de uma cepa mutante do *S. aureofaciens*, enquanto a metaciclina, a doxiciclina e a minociclina são todos produtos semissintéticos.<sup>9</sup>

Entre 1950 e 1970, vários antibióticos da família das tetraciclina foram desenvolvidos e, neste mesmo período, as tetraciclina foram os fármacos mais utilizados nos EUA para o combate de doenças infecciosas.<sup>9</sup>

Em 2010, Pereira-Maia *et al.*<sup>9</sup> apresentaram uma revisão sobre a importância dessa classe de antibióticos, focando na química de coordenação das tetraciclina e suas possíveis aplicações. Uma vez que compostos de coordenação contendo tetraciclina poderão ser utilizados, futuramente, na clínica médica no tratamento de câncer e, também, no tratamento de doenças infecciosas.

Tabela 1 - Fórmulas estruturais das principais tetraciclinas

Nome genérico	Fórmula Estrutural
Tetraciclina	
Oxitetraciclina	
Clortetraciclina	
Metaciclina	
Demeclociclina	
Doxiciclina	
Minociclina	

Esses antibióticos são classificados como bacteriostáticos, devido ao seu mecanismo de ação, pois inibem o mecanismo de reprodução das proteínas bacterianas, através de sua ligação ao ribossomo bacteriano 30S, impedindo o acesso do tRNA ao local acceptor (A) no complexo mRNA-ribossomo. <sup>4</sup>

As tetraciclinas apresentam atividade contra *Rickettsia*, bactérias *gram*-negativas e *gram*-positivas, aeróbios, anaeróbios e *Chlamydia*. E também apresentam baixa toxicidade, baixo custo, e podem ser administradas por via oral. <sup>9</sup>

Em virtude dessas características, as tetraciclinas ainda são muito utilizadas na clínica médica, na terapia animal para o tratamento de infecções e, também, como aditivos alimentares, a fim de aumentar a eficiência de crescimento de alguns animais. <sup>9,10</sup>

Entretanto, pesquisadores têm revelado o uso inadequado desses compostos, o que provoca o acúmulo de resíduos desses antibióticos em tecidos animais e no leite, podendo apresentar efeitos tóxicos diretos nos consumidores. <sup>10</sup>

Os resíduos de antibióticos em produtos alimentares podem causar alergia em alguns indivíduos sensíveis, super infecções e resistência aos antibióticos em pacientes humanos. <sup>10</sup>

Com base nesses fatos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), determina como limite máximo residual (LMR) aceitável das tetraciclinas o valor de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . <sup>11</sup>

Já o Ministério da Agricultura, pela Portaria 193, de 12 de maio de 1998, proíbe o uso das tetraciclinas como aditivo na alimentação animal. <sup>12</sup>

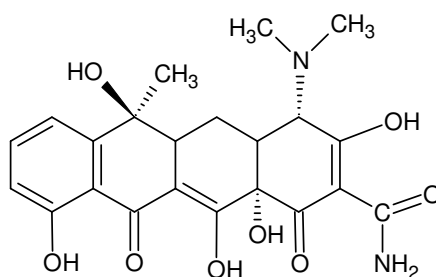
Os limites de tolerância para esses analitos se situam na região de resposta linear dos eletrodos compósitos à base de grafite-PU e sugerem a possibilidade da



aplicação destes dispositivos, sem modificações, minimizando as dificuldades e custo de análise.

#### 1.4 Comportamento eletroquímico e estabilidade das Tetraciclina

Para o estudo do comportamento eletroquímico das tetraciclina, deve-se considerar que cada TC contém um substituinte fenólico na posição C-10 e um substituinte dimetilamina na posição C-4, como observado na fórmula estrutural da tetraciclina: <sup>13</sup>



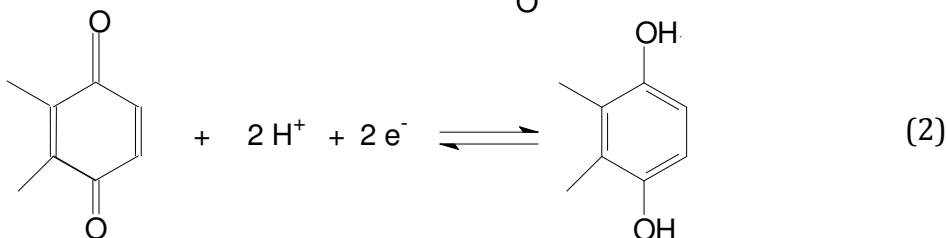
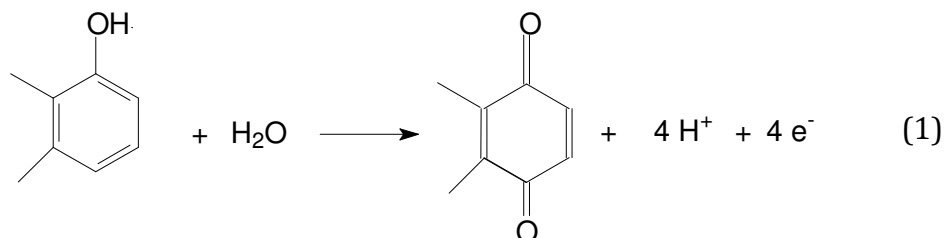
Fórmula estrutural da tetraciclina.

Segundo Kazemifard *et al.* <sup>14</sup>, a oxidação eletroquímica das tetraciclina ocorre no grupo fenol na posição C-10 e no grupo dimetilamina na posição C-4.

Chatten *et al.* <sup>15</sup> concordam que os grupos fenol e dimetilamina são os prováveis sítios para ocorrer uma oxidação inicial, em potencial menor que 1,0 V (vs. ECS). Segundo os autores, o grupo amino é protonado em tampão acetato pH 4,0 e 5,6 e o núcleo fenólico da molécula se oxida de forma irreversível na presença de 1 elétron.

Por outro lado, Dang *et al.* <sup>16</sup> observaram somente um pico de oxidação da TC (E~0,58 V vs. ECS), o qual atribuíram à oxidação do grupo fenol na posição 10. O mecanismo de oxidação proposto pelos autores, Equações 1 e 2, é baseado na oxidação

do grupo fenol a benzoquinona, o qual se adsorve na superfície do eletrodo negro de acetileno, formando um par redox hidroquinona/benzoquinona.



O fato destes autores não observarem o segundo evento, pode estar relacionado com a atividade da superfície do eletrodo e à aparente baixa velocidade do processo de transferência eletrônica.

A estabilidade das tetraciclinas em água foi discutida por Loftin *et al.*<sup>17</sup>. De acordo com esses autores, as tetraciclinas se degradam em água, incluindo os processos de hidrólise e epimerização. Os efeitos da força iônica, pH e temperatura em cada reação foram apresentados e, para a TC, OTC e CTC a 4 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 2,0, a 22°C, foram encontrados tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) iguais a 306, 1052 e 318 h, respectivamente.

## 1.5 Revisão bibliográfica de métodos de determinação voltamétrica de tetraciclinas

As técnicas voltamétricas são caracterizadas pela simplicidade, rapidez e baixo custo e tem sido usadas na determinação das tetraciclinas. A seguir, estão relacionados alguns trabalhos sobre a determinação dessa classe de antibióticos usando essas técnicas em amostras farmacêuticas, ambientais e biológicas.

Caplis *et al.*<sup>18</sup> apresentaram a primeira determinação de tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina por polarografia de corrente alternada. Neste trabalho, os autores discutem o efeito do pH e a degradação destes antibióticos na resposta polarográfica, em comparação com a atividade biológica.

A Tabela 1 apresenta uma resenha de diversos trabalhos descritos na literatura sobre a determinação eletroquímica de tetraciclinas.

Pode-se observar um uso frequente de eletrodos de trabalho de ouro, modificados ou não, além do uso de outros materiais eletródicos, cobrindo uma ampla gama de limites de detecção.

Um eletrodo de ouro não modificado foi utilizado na determinação de oxitetraciclina por titulação associada a diferentes técnicas eletroquímicas.<sup>19</sup> Também foram apresentados eletrodos de disco de ouro<sup>25, 26</sup>, microeletrodo de ouro não modificado<sup>24</sup>, e também, um eletrodo impresso de ouro<sup>14</sup> com limites de detecção que variam entre  $9,36 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Eletrodos de ouro modificados com polímeros molecularmente impressos<sup>21, 22</sup> e um microeletrodo de ouro modificado com tungstênio<sup>23</sup>, permitiram obter limites de detecção entre  $6,49 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Obviamente os eletrodos modificados apresentam melhores limites de detecção. Entretanto, com maior dificuldade de regeneração da superfície do eletrodo, quando se perde a modificação, caso ela superficial, e também não sendo necessárias para amostras biológicas, em que há excreção em concentrações relativamente altas desses analito.

Outros tipos de materiais de eletrodo são utilizados na determinação das tetraciclinas em diferentes técnicas voltamétricas, tais como eletrodos de carbono vítreo modificados<sup>27, 32</sup>, eletrodos de diamante dopados/anodizados com boro<sup>28, 31</sup>, eletrodo compósito de grafite e resina poliuretana<sup>36</sup>, eletrodos gotejante de mercúrio<sup>33-35</sup>, entre outros, como resume a Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo dos resultados descritos para determinação eletroquímica de tetraciclina, incluindo técnicas, eletrodos, dados analíticos e referências

<b>Eletrodo</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica (s)</b>	<b>Região linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Au	OTC	Titulação condutométrica, potenciométrica e CV	-	-	Kurzawa <i>et al.</i> <sup>19</sup>
Au-PAMAN	CTC	CV	9,00 x 10 <sup>-8</sup> - 5,00 x 10 <sup>-5</sup>	4,95 x 10 <sup>-8</sup>	Lian <i>et al.</i> <sup>20</sup>
Au-MIP	OTC	CV, DPV	0 - 1,0 x 10 <sup>-7</sup>	6,49 x 10 <sup>-10</sup>	Li <i>et al.</i> <sup>21</sup>
μAu/Tg	TC	CV	2,0 x 10 <sup>-6</sup> - 21 x 10 <sup>-6</sup> , 21 x 10 <sup>-6</sup> - 208 x 10 <sup>-6</sup>	1,9 x 10 <sup>-6</sup>	Wang <i>et al.</i> <sup>22</sup>
μAu	TC	CV, FIA-AMP	33 x 10 <sup>-12</sup> - 915 x 10 <sup>-12</sup>	9,36 x 10 <sup>-12</sup>	Norouzi <i>et al.</i> <sup>23</sup>
			1,0 x 10 <sup>-6</sup> - 500 x 10 <sup>-6</sup>	0,96 x 10 <sup>-6</sup>	
SPGE	TC, CTC, OTC	FIA-pAMP	5,0 x 10 <sup>-6</sup> - 50 x 10 <sup>-6</sup>	0,50 x 10 <sup>-6</sup>	Masawat <i>et al.</i> <sup>13</sup>
			1,0 x 10 <sup>-6</sup> - 500 x 10 <sup>-6</sup>	0,35 x 10 <sup>-6</sup>	
Disco de Au	DC, CTC	LSV	1,0 x 10 <sup>-6</sup> - 0,1 x 10 <sup>-3</sup>	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	Charoenraks <i>et al.</i> <sup>24</sup>
Disco de Au	TC		5,0 x 10 <sup>-6</sup> - 0,6 x 10 <sup>-3</sup>	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	Palaharn <i>et al.</i> <sup>25</sup>
IL-MWNT-GCE	TC		1,1 x 10 <sup>-7</sup> - 2,2 x 10 <sup>-5</sup>	3,0 x 10 <sup>-8</sup>	Guo <i>et al.</i> <sup>26</sup>

Tabela 2 - Continuação

<b>Eletrodo</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica (s)</b>	<b>Região linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
BDD-depositado, BDD- anodizado	TC, CTC, DC, OTC	CV			Taherpour <i>et al.</i> <sup>27</sup>
			0,1 x 10 <sup>-6</sup> - 208 x 10 <sup>-6</sup>	2,1 x 10 <sup>-8</sup>	
Ni-DIA	OTC, TC, CTC, DC	CV	0,1 x 10 <sup>-6</sup> - 208 x 10 <sup>-6</sup>	2,1 x 10 <sup>-8</sup>	Treetepvijit <i>et al.</i> <sup>28</sup>
			0,2 x 10 <sup>-6</sup> - 208 x 10 <sup>-6</sup>	0,1 x 10 <sup>-6</sup>	
			0,2 x 10 <sup>-6</sup> - 208 x 10 <sup>-6</sup>	0,1 x 10 <sup>-6</sup>	
Ni-DIA	TC	CV	1,0 x 10 <sup>-6</sup> - 9,0 x 10 <sup>-6</sup>	10 x 10 <sup>-9</sup>	Treetepvijit <i>et al.</i> <sup>29</sup>
BDD-anodizado	TC, CTC, OTC, DC	CV	0,1 x 10 <sup>-3</sup> - 50 x 10 <sup>-3</sup>	10 x 10 <sup>-9</sup>	Wangfuengkanagul <i>et al.</i> <sup>30</sup>
			0,5 x 10 <sup>-3</sup> - 50 x 10 <sup>-3</sup>		
Ni-GCE	TC, DC, OTC, CTC	FIA-AMP	5,2 x 10 <sup>-6</sup> - 166 x 10 <sup>-6</sup>	6,2 x 10 <sup>-8</sup>	Oungpipat <i>et al.</i> <sup>31</sup>
			5,2 x 10 <sup>-6</sup> - 166 x 10 <sup>-6</sup>	1,9 x 10 <sup>-6</sup>	
			5,2 x 10 <sup>-6</sup> - 166 x 10 <sup>-6</sup>	7,1 x 10 <sup>-7</sup>	
			5,2 x 10 <sup>-6</sup> - 166 x 10 <sup>-6</sup>	3,8 x 10 <sup>-8</sup>	
HMDE	TC, OTC	DCSV, DPSV		1,0 x 10 <sup>-7</sup> - 5,0 x 10 <sup>-8</sup>	Ghandou <i>et al.</i> <sup>32</sup>

Tabela 2 - Conclusão

<b>Eletrodo</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica (s)</b>	<b>Região linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
HMDE	MC	ACP	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	Tanase <i>et al.</i> <sup>33</sup>
HDME	OTC, TC, CTC	DPSV	$4,1 \times 10^{-8} - 37 \times 10^{-8}$	$6,2 \times 10^{-6} - 10 \times 10^{-6}$	Ni <i>et al.</i> <sup>34</sup>
EGPU	TC	DPV	$4,00 - 40,0 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-6}$	Calixto <i>et al.</i> <sup>35</sup>
Negro de acetileno	TC	ASV	$1,2 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-8}$	Dang <i>et al.</i> <sup>16</sup>
$\mu$ eletrodo de fibra de carbono	OTC	SWV	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-7}$	Agui <i>et al.</i> <sup>36</sup>

Obs.:PAMAN: dendrímero de amina poliamida; MIP: polímero molecularmente impresso; Tg: tungstênio; SPGE: eletrodo impresso de ouro; IL: líquido iônico; MWNT: nanotubo de carbono de parede múltipla; GCE: eletrodo de carbono vítreo; DTC: doxitetraciclina; CV: voltametria cíclica; DPV: voltametria de pulso diferencial; FIA-AMP: análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica; FIA-pAMP: análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de pulso; LSV: voltametria de varredura linear; DCSV: voltametria de redissolução de corrente direta; DPSV: voltametria de redissolução de pulso diferencial; ACP: polarografia de corrente alternada; Ni-DIA: eletrodo de diamante dopado com boro com níquel implantado; BDD: diamante dopado com boro; HMDE: eletrodo gotejante de mercúrio; MC: minociclina; EGPU: eletrodo compósito grafite-poliuretana; ASV: voltametria de redissolução adsortiva; SWV: voltametria de onda quadrada.

## 1.6 Eletrodos compósitos

Eletrodos sólidos foram os primeiros a serem utilizados em eletroquímica.<sup>37,38</sup> Com o advento da polarografia, proposta por Heyrovski nos anos 1920, popularizou-se o eletrodo gotejante de mercúrio, inicialmente proposto por Kucera em 1903, apresentando as vantagens de renovação constante da superfície com repetibilidade de área.<sup>39</sup>

Entretanto, devido às suas limitações em potenciais positivos, nos quais o Hg é oxidado, o desenvolvimento de materiais eletródicos alternativos é um campo de pesquisa profícuo e importante em eletroquímica e eletroanalítica.<sup>39</sup> Em adição, os problemas ambientais resultantes da toxicidade do mercúrio, vêm limitando cada vez mais o seu uso em eletroanálise.

Adams<sup>40</sup> propôs o eletrodo de pasta de carbono, (do inglês, *carbon paste electrode*, CPE), para ser utilizado como um material eletródico útil no intervalo de potenciais em que o mercúrio não é adequado, com a vantagem de que esse eletrodo também poderia ser aplicado em estudos de substâncias orgânicas, com interesse biológico.

A aplicação dos eletrodos de carbono também oferece vantagens em relação aos eletrodos metálicos, nos quais, pode ocorrer a formação de óxidos na sua superfície, além da dificuldade de reprodutibilidade de área superficial entre polimentos sucessivos e, também, do custo de preparação quando se usam metais nobres como ouro e platina.<sup>38</sup>

Desta forma, os eletrodos a base de carbono voltam a ser uma opção interessante, apresentando custo relativamente baixo e possibilidade de preparação usando as diversas formas em que este material se apresenta.<sup>38,41</sup>



A literatura apresenta diversas estratégias para a preparação de eletrodos à base de carbono<sup>42</sup>, sendo exemplos clássicos os eletrodos de grafite pirolítico, carbono vítreo, fibras de carbono, além das pastas de carbono utilizando diversos compostos orgânicos como aglutinantes. Todos apresentam vantagens e desvantagens, as quais também são descritas na literatura.<sup>43</sup> Dentre estas alternativas pode-se destacar os eletrodos compósitos sólidos em que os aglutinantes líquidos são substituídos, geralmente, por polímeros.

Recentemente, Cavalheiro *et al.*<sup>44</sup> apresentaram uma revisão sobre determinações eletroanalíticas de fármacos, na qual os autores deram ênfase à utilização de materiais à base de carbono nas análises voltamétricas.

Tallman e Petersen<sup>45</sup> definiram um eletrodo compósito como “*um material consistindo de pelo menos uma fase condutora aglutinada por pelo menos uma fase isolante*”, como as pastas de carbono e os compósitos sólidos.

A principal vantagem dos eletrodos compósitos reside na estabilidade, principalmente em solventes não aquosos e aplicações em fluxo, além da resistência mecânica de tais arranjos, melhoria da relação sinal/ruído, com conseqüente ganho nos limites de detecção, relativa simplicidade na preparação e renovação da superfície, possibilidade de incorporação de modificadores, baixo custo na preparação e relativa repetibilidade de área ativa.<sup>46</sup> As pastas de carbono apresentam, por sua vez, problemas de reprodutibilidade de sinal e falta de robustez, principalmente para aplicações em fluxo e em meio não aquoso, no qual o aglutinante pode ser solubilizado.

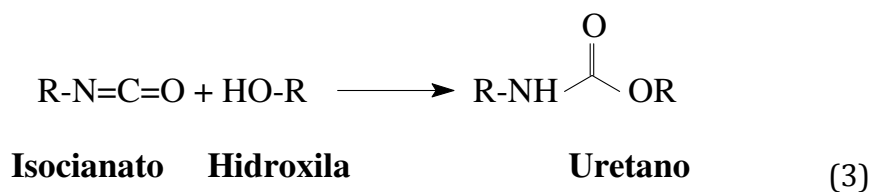
A facilidade de preparação desses materiais eletródicos permite preparar sensores de tamanhos e formas diferentes, além da possibilidade de incorporação de uma variedade de modificadores no corpo do eletrodo compósito e não somente na superfície.

Um dos polímeros que vem sendo utilizado na confecção de eletrodos compósitos sólidos é a poliuretana (PU), que foi a utilizada nesse trabalho.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos sobre as potencialidades analíticas do compósito à base de grafite e poliuretana de origem vegetal, quando utilizado como material de eletrodos em diversas técnicas eletroanalíticas e na determinação de vários analitos, desde 2002.<sup>47, 48</sup>

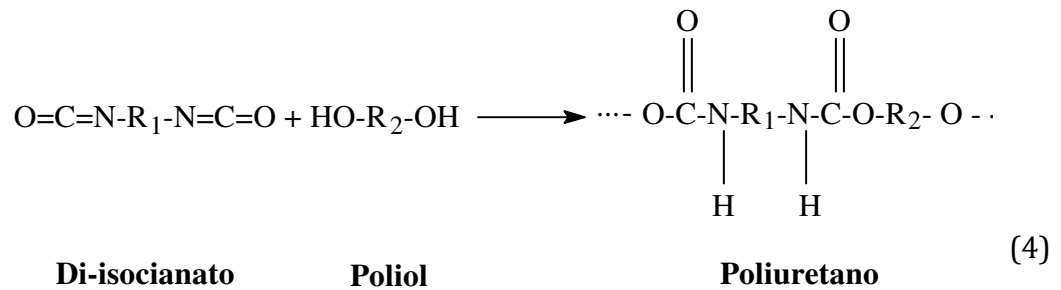
### 1.7 Resina poliuretana (PU)

Em 1848, Wurtz *et al.*<sup>49</sup> descobriram o uretano (ou uretana), produto da reação química entre um grupo isocianato e um grupo hidroxila, conforme Equação 3.



No entanto, esta descoberta somente teve aplicação comercial nos anos 40, quando Bayer<sup>50</sup> desenvolveu, na Alemanha, os primeiros polímeros à base de poliuretano.

A polimerização dos uretanos ocorre quando um composto com dois ou mais grupos isocianato reage com um polioliol, ou seja, um álcool polifuncional, conforme Equação 4.



A resina poliuretana utilizada no presente estudo foi desenvolvida pelo Grupo de Química e Tecnologia de Polímeros (GQATP) – USP – São Carlos. Essa resina é derivada do óleo de mamona, conhecido também como óleo de rícino, (em inglês, “*castor oil*”), que é uma matéria prima renovável e de origem natural, contendo cerca de 95% (*m/m*) de ácido ricinoleico. <sup>51, 52</sup>

As principais vantagens do uso da resina PU de origem vegetal são:

- sustentabilidade ambiental por ser derivada de fonte renovável;
- processo de cura à temperatura ambiente;
- alta hidrofobicidade, bicomponente, o que confere facilidade na preparação;
- facilidade de renovação de superfície;
- possibilidade de incorporação de modificadores, por simples homogeneização;
- resistência a solventes orgânicos;
- facilidade de manuseio e moldagem, podendo ser usada em diferentes composições;
- redução de custo;
- independência tecnológica, por ser produzida no Brasil.

## 1.8 Revisão Bibliográfica dos Eletrodos Compósitos à Base de Grafite e Poliuretana

O primeiro trabalho desenvolvido buscou estabelecer as condições de preparação do material compósito grafite-PU e realizar uma investigação geral de suas possíveis aplicações.<sup>53</sup>

Mendes *et al.*<sup>54</sup>, avaliaram a resposta voltamétrica do eletrodo compósito grafite/poliuretana em voltametria de pulso diferencial na determinação de hidroquinona em reveladores fotográficos. O limite de detecção (LOD) de 66 nmol L<sup>-1</sup> foi observado para hidroquinona dentro da faixa linear de 66 a 530 nmol L<sup>-1</sup>. A determinação da hidroquinona em amostras de reveladores fotográficos mostrou uma concordância com os valores rotulados, dentro do nível de confiança de 95%, com um máximo de 2,0% de erro relativo, sendo que o coeficiente de recuperação variou entre 100,1% a 100,4%.

Este eletrodo também foi avaliado em aplicações em fluxo nas determinações de hidroquinona, paracetamol e atenolol, conforme os descritos a seguir.

Cervini *et al.*<sup>55</sup> avaliaram a performance do eletrodo compósito grafite-PU como detector amperiométrico para análise em fluxo na determinação de hidroquinona em reveladores fotográficos. O LOD obtido no intervalo de  $1,00 \times 10^{-4}$  a  $1,00 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> foi de 100 μmol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos pelo eletrodo compósito estão de acordo com os obtidos pelo método HPLC, dentro de um nível de confiança de 95%.

Cervini *et al.*<sup>56</sup> utilizaram o eletrodo compósito grafite-PU como detector amperiométrico para análise em fluxo na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Uma curva analítica foi obtida no intervalo de  $5,00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> a

$5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com LOD de  $18,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos pelo método HPLC, dentro de um nível de confiança de 95%.

Cervini *et al.*<sup>57</sup> também avaliaram o eletrodo compósito grafite-PU como detector amperiométrico para análise em fluxo na determinação do anti-hipertensivo atenolol em formulações farmacêuticas. Uma curva analítica foi observada no intervalo entre 0,2 e  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$  com LOD de  $18,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Foram observadas somente interferências do propranolol e da furosemida. Portanto, foi possível a determinação do atenolol em comprimidos sem interferência de outros componentes da formulação farmacêutica. Os resultados obtidos concordam com os obtidos pelo método HPLC, em um nível de confiança de 95%.

Várias aplicações foram desenvolvidas utilizando os eletrodos compósitos à base de grafite e PU na determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, em amostras ambientais e biológicas.

Cervini *et al.*<sup>58</sup> realizaram a determinação de atenolol em formulações farmacêuticas utilizando o eletrodo compósito a base de grafite-poliuretana. Usando a técnica de voltametria de pulso diferencial, uma curva analítica linear foi observada no intervalo entre  $4\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$  com LOD igual  $3,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sem a necessidade de renovação da superfície entre as sucessivas medidas, com recuperações entre 95,5% e 108%. A interferência de outras drogas anti-hipertensivas foi observada, mas não de componentes comuns dos comprimidos. Os resultados do método proposto concordaram com o HPLC com 95% de nível de confiança.

Calixto *et al.*<sup>35</sup> avaliaram o eletrodo compósito grafite-PU na determinação do antibiótico tetraciclina em amostras de água natural, em voltametria de pulso diferencial (DPV), com LOD de  $2,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sem necessidade de renovação da superfície. Foram obtidas recuperações entre 92,6% e 100 %, após etapa de pré-concentração.

Também foi investigada a possibilidade de inserir modificadores na matriz do compósito visando aumentar a seletividade e sensibilidade dos eletrodos obtidos.

Entre alguns trabalhos, pode-se citar o eletrodo compósito grafite-PU modificado com sílica 2-benzotiazolietiol organofuncionalizada para a determinação de íons de  $\text{Cu}^{2+}$  em amostras de etanol combustível. Após 20 min de tempo de acumulação, uma região linear foi obtida entre 0,1-1,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com LOD igual a  $3,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .<sup>59</sup>

Cervini *et al.*<sup>60</sup> prepararam um polímero metacrilato molecularmente impresso (MIP) com paracetamol (APAP) e incorporado ao eletrodo compósito. O compósito foi utilizado na determinação de APAP em formulações farmacêuticas, em DPV, com boa sensibilidade e seletividade, obtendo um LOD igual a  $6,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Além do sistema grafite-PU, vimos trabalhando com compósitos à base de grafite-borracha de silicone (BS)<sup>61</sup>, nanotubos de carbono-BS<sup>62</sup> e grafite-Araldite®<sup>63,64</sup>.

Calixto *et al.*<sup>65</sup> apresentaram em um artigo o comportamento voltamétrico de três tipos diferentes de eletrodos compósitos: grafite-PU, grafite-BS e grafite-Araldite®. Os compósitos também foram caracterizados utilizando microscopia eletrônica de varredura e por termogravimetria.

Uma das vantagens apresentadas para os compósitos é a possibilidade de seu uso em diversas formas. Recentemente, dentro dessa linha, foram propostos eletrodos impressos descartáveis à base de grafite-PU, que foram aplicados na determinação simultânea de cafeína e paracetamol.<sup>66</sup>

Como resultado, também foi feito um pedido de depósito de patente referente ao processo de confecção do eletrodo compósito impresso grafite-PU e desenvolvimento da tinta.<sup>67</sup>

## **Capítulo 2 - Objetivos**

## 2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

1. Determinar tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina, todos antibióticos da família das tetraciclinas, em águas naturais e em fluidos biológicos, utilizando o eletrodo compósito à base de grafite e poliuretana 60% (grafite, *m/m*), sem modificação;
2. Contribuir com novas informações para o desenvolvimento deste material eletródico;
3. Propor alternativas de baixo custo e confecção simples para determinação desses antibióticos em amostras ambientais e biológicas.



## **Capítulo 3 - Parte Experimental**

### 3 Parte Experimental

#### 3.1 Reagentes e soluções

Todos reagentes utilizados foram de grau analítico (PA). As soluções foram preparadas com água purificada em sistema Barnstead™ EasyPure® RoDi (Thermoscientific, modelo D13321), resistividade maior que 18,2 MΩ cm.

A soluções de TC (95%), OTC (95%) e CTC (77%) foram preparadas diariamente pela dissolução dos compostos (Sigma-Aldrich) em água ou em meio de tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH.

A solução de ácido sulfúrico (96%) 3,0 mol L<sup>-1</sup> foi preparada pela diluição de 8,3 mL do ácido (J. T. Baker) em 50,0 mL de água.

A solução de ácido tricloroacético (Panreac, PA) 80% foi preparada pela dissolução de 20,0 g do ácido em 25,0 mL de água.

#### 3.2 Preparação dos eletrodos compósitos

A resina poliuretana (Poliquil) foi preparada misturando-se 0,9 partes do polioli (B-471) e 1,0 parte do pré-polímero (A-249), de acordo com recomendações do fabricante. A seguir, uma quantidade de pó de grafite (Aldrich, diâmetro da partícula 1-2 micron) foi adicionada à resina para obter compósitos contendo 60% (grafite, *m/m*).<sup>53</sup> Essa mistura foi homogeneizada por 10 minutos em um almofariz de vidro e prensada numa prensa manual (Figura 1) com extrusor de 3,0 mm de diâmetro.

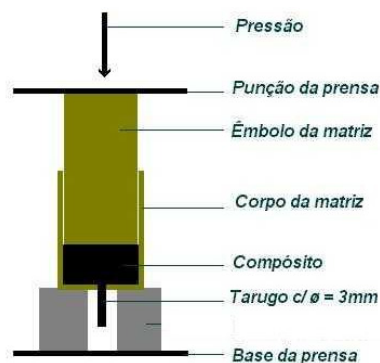


Figura 1 - Representação esquemática da prensa manual utilizada na preparação dos eletrodos compósitos grafite-PU (grafite,  $m/m$ ).

Após a cura total da resina, que ocorre após 24 h, em temperatura ambiente, de acordo com o fabricante, os tarugos foram cortados em peças com 1,0 cm de comprimento. A seguir, foram conectados a um fio de cobre com auxílio de cola de prata (Conductive Silver Epoxy Kit, Electron Microscopy Sciences, USA).

Após 48 horas, o conjunto compósito/fio de cobre foi inserido em um tubo de vidro de 6,0 mm de diâmetro e 9,0 cm de comprimento. Então, a resina epóxi (Silaex, SQ 2004) foi adicionada ao tubo de vidro com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para preenchimento (Figura 2). O processo de cura durou 24 horas.

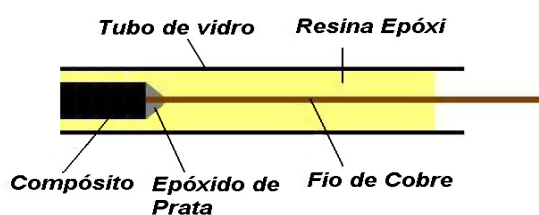


Figura 2 - Esquema de preparação do EGPU (grafite,  $m/m$ ).

### 3.3 Tratamento Mecânico

O tratamento mecânico consistiu de abrasão em lixa d'água 600 SiC, para eliminar o excesso de resina epóxi na superfície e expor o compósito. Em seguida, foi feito um polimento com suspensão de alumina 1,0  $\mu\text{m}$  (Arotec), que foi efetuado em uma lixadeira politriz motorizada modelo APL-02 (Arotec).

Então, o eletrodo foi imerso em isopropanol e submetido ao ultrassom em um banho USC 1400 (Unique) por 5 minutos, antes de cada medida. Este procedimento foi feito em água, para a retirada de possíveis partículas de sílica da superfície do eletrodo.

### 3.4 Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato-galvanostato  $\mu\text{AUTOLAB}$  Type III, acoplado a um microcomputador e controlado pelo software GPES (v. 4.9). Foi utilizada uma célula de vidro com capacidade total de 25,0 mL, contendo os eletrodos: trabalho (EGPU), o eletrodo auxiliar (eletrodo de platina de 1,0 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro) e o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS), ligados ao potenciostato. As soluções não foram desaeradas e as medidas realizadas em temperatura ambiente em sala climatizada a  $23 \pm 1$  °C.

### 3.5 Procedimento para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em amostras de água natural

O procedimento descrito a seguir para a determinação de TC e OTC em amostras de água natural usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*) foi adaptado do artigo de Gros *et al.*<sup>68</sup> Neste trabalho os autores desenvolveram um método recente para a determinação de fármacos em águas de superfície e residuárias.

Uma amostra de água do lago da Universidade Federal de São Carlos, localizado no município de São Carlos-SP, a 21°59'08-S e 47°52'58-O, foi coletada em um galão de polietileno de 5,0 L, o qual foi pré-lavado com metanol grau HPLC, enxaguado com água purificada e seco antes da coleta. No laboratório, toda a água foi filtrada em papel de filtro qualitativo.

A 500,0 mL dessa amostra foram adicionados 100,0 µL de uma solução estoque  $9,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, resultando em uma concentração de  $1,9 \text{ µmol L}^{-1}$  de TC, na água natural. Esta passou a ser considerada a “amostra contaminada”. Em seguida, ajustou-se o pH = 3,0, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

A “amostra contaminada” com TC foi filtrada, primeiramente, em papel de filtro qualitativo. Em seguida, passou-se a água através de um filtro de membrana ( $\Phi = 0,45 \text{ µm}$ , Sartorius) para a remoção das partículas sólidas.

Esta amostra foi submetida à extração em fase sólida (SPE) em um cartucho Oasis HLB (Waters®, 200 mg, 6,0 mL). Os cartuchos foram pré-condicionados usando 6,0 mL de metanol e de 6,0 mL de água purificada, a uma vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Em seguida, a amostra de água contendo TC foi percolada pelo cartucho a uma vazão de  $10,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Após a extração, o cartucho foi percolado com três porções de 2,0 mL de metanol, a  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , para a eluição do analito.

Após a eluição, o metanol foi evaporado cuidadosamente com fluxo de nitrogênio, e o analito diluído em 100,0 mL de tampão fosfato pH 2,3. Em seguida, 15,0 mL desta solução foram adicionados à célula eletroquímica.

O EGPU 60% (grafite, *m/m*) foi utilizado na determinação de TC, pelo método da adição de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, e os parâmetros otimizados:  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , entre 600 e 1200 mV.

Este mesmo procedimento foi realizado também com 500,0 mL de água purificada no sistema Barnstead®, contendo  $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  para avaliar o coeficiente de recuperação do procedimento.

Experimento similar foi realizado para determinação de oxitetraciclina em amostras de água natural e purificada, utilizando o EGPU 60% (grafite, *m/m*).

### 3.6 Procedimento para a determinação de oxitetraciclina em urina bovina

O procedimento descrito, a seguir, para o tratamento das amostras de urina para a determinação de TC e OTC utilizando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), foi adaptado do artigo de Jin *et al.*<sup>10</sup>.

Uma amostra de urina bovina foi fornecida pela EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos/SP), e coletada em um frasco de polietileno com capacidade para 1,0 L, o qual foi pré-lavado com o detergente Extran®, ácido nítrico (PA), água purificada e seco antes da coleta.

Primeiramente, toda a urina foi acidificada, com ácido clorídrico (PA) concentrado, até pH 2,0. Em seguida, foi preparada uma solução estoque de urina  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de OTC, resultando uma concentração de  $0,47 \text{ mg mL}^{-1}$  de OTC, na urina bovina. Esta amostra foi submetida à centrifugação durante 25 minutos, a 3900 rpm. A fase líquida foi removida.

Após o pré-tratamento da amostra de urina, 200,0  $\mu\text{L}$  da fase líquida foram adicionados à célula eletroquímica contendo 15,0 mL de solução tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3. O EGPU 60% (grafite, *m/m*), foi utilizado para determinação de OTC na amostra pelo método de adição única de padrão, usando voltametria de pulso diferencial e os seguintes parâmetros previamente otimizados:  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , entre 600 e 1200 mV.

### **3.7 Procedimento para a determinação de tetraciclina e oxitetraciclina em urina humana <sup>10</sup>**

Uma amostra de urina humana foi fornecida por um indivíduo saudável, que não estava fazendo uso de nenhum medicamento, em um frasco de polietileno com capacidade de 500,0 mL, o qual foi pré-lavado com detergente Extran®, ácido nítrico, água purificada e seco antes da coleta.

Inicialmente, toda a amostra de urina foi acidificada com ácido clorídrico (PA) concentrado até pH 2,0. Em seguida, foi preparada uma solução estoque de urina de  $5,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, resultando em uma concentração de  $283 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TC na urina humana. Esta amostra foi submetida à centrifugação a 3900 rpm, durante 25 min.

Após o preparo da amostra, 250,0  $\mu\text{L}$  da fase líquida foram adicionados à célula eletroquímica, contendo 15,0 mL de solução de tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3.

O eletrodo compósito grafite-PU foi utilizado na determinação da concentração de TC pelo método de adição única de padrão, usando voltametria de pulso diferencial e os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

Este mesmo procedimento também foi realizado, nas mesmas condições, para a determinação de OTC em amostra de urina humana, utilizando o eletrodo compósito grafite-PU.



### **3.8 Procedimento para a determinação de tetraciclina em amostras de leite bovino e humano**

O procedimento do tratamento das amostras de leite descrito, a seguir, foi adaptado do artigo de Denobile e Nascimento.<sup>69</sup> Os autores apresentaram a validação de um método por HPLC para determinação de resíduos dos antibióticos OTC, TC, CTC e DC em leite por extração com desproteinização acídica.

As amostras de leite bovino desnatado U.H.T. (1,0 L), de diferentes marcas, foram adquiridas em mercados locais do município de São Carlos/SP.

No laboratório, a 200,0 mL de leite foram adicionados 90,5 µL de uma solução estoque  $4,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, resultando em uma concentração de  $2,15 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, equivalente a  $100 \text{ µg Kg}^{-1}$  de TC, conforme a legislação<sup>12</sup>, no leite bovino. Esta passou a ser considerada a “amostra contaminada”.

A amostra de leite materno humano, totalizando 100,0 mL, foi fornecida pelo Banco de Leite da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos (São Carlos/SP), sendo proveniente de mais de uma doadora.

A 80,0 mL deste leite foram adicionados 144,0 µL de uma solução estoque  $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, resultando em uma concentração de  $3,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de TC, equivalente a  $1,64 \text{ mg L}^{-1}$  de TC, no leite humano. Esta passou a ser considerada a “amostra contaminada”.

O procedimento à seguir foi adotado para os dois tipos de leite.

À amostra foram adicionados 25,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 80%, a fim de realizar a desproteinização da amostra de leite. Em seguida, foi submetida à centrifugação durante 30 min, a 10000 rpm. A fase líquida (soro do leite) foi separada para as análises.

Esse soro foi filtrado em papel de filtro qualitativo para a remoção das partículas sólidas e dividido em três alíquotas.

Cada alíquota foi submetida à extração em fase sólida (SPE) em um cartucho Oasis HLB (Waters®, 200 mg, 6,0 mL), a uma vazão de 10,0 mL min<sup>-1</sup>.

Após a extração, o cartucho foi percolado com duas porções de 5,0 mL de tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 2,3, a 2,0 mL min<sup>-1</sup>, para a eluição do analito.

Os cartuchos foram pré-condicionados usando 5,0 mL de metanol e de 5,0 mL de água purificada, a uma vazão de 2,0 mL min<sup>-1</sup>.

Após a eluição, esta solução foi adicionada à célula eletroquímica, e o EGPU 60% (grafite, *m/m*) foi utilizado para a determinação de TC, pelo método da adição de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, e os seguintes parâmetros:  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , entre 600 e 1200 mV.

Todo este procedimento foi repetido para cinco amostras diferentes de leite bovino.

## **Capítulo 4 – Otimização dos parâmetros voltamétricos**

## 4 Otimização dos parâmetros voltamétricos

### 4.1 Voltametria Cíclica

Inicialmente, a resposta eletroquímica das tetraciclinas TC, OTC e CTC no eletrodo compósito à base de grafite e resina poliuretana 60% (grafite, *m/m*) foi investigada usando voltametria cíclica.

Os voltamogramas cíclicos obtidos são apresentados na Figura 3, nos quais podem ser observados dois picos de oxidação das tetraciclinas, em aproximadamente 0,9 V e 1,1 V, representando um sistema irreversível, em meio ácido, em pHs descritos como adequados para esses analitos, na literatura.<sup>70</sup>

Conforme já apresentado na Introdução desta Tese, Kazemifard *et al.*<sup>14</sup> descreveram que a oxidação das tetraciclinas ocorre através do grupo fenol na posição C-10 e do grupo dimetilamina na posição C-4, resultando em dois picos de oxidação.

Na Figura 3 é também possível observar que os picos são pouco resolvidos e apresentam intensidades de corrente relativamente baixas, o que mostra a necessidade da otimização dos parâmetros instrumentais para sua determinação quantitativa.

A baixa intensidade de corrente e os elevados potenciais de pico sugerem que a oxidação ocorre com a dificuldade e que a cinética de transferência de elétrons é lenta, resultando em um processo irreversível, sob as condições investigadas.

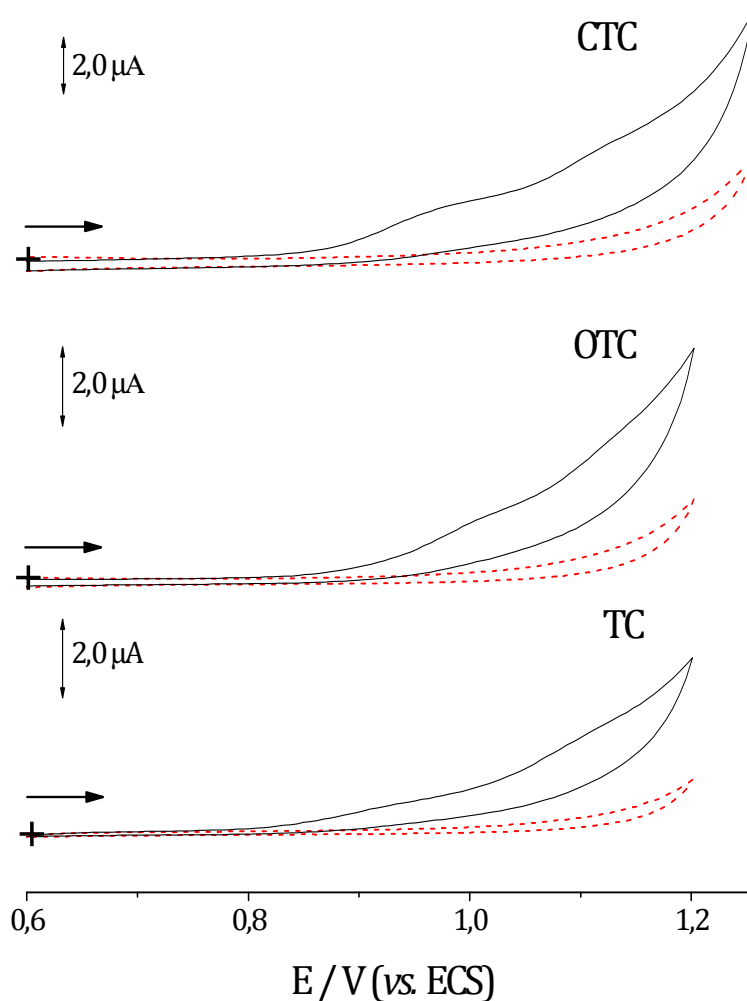


Figura 3 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) na ausência (---) e na presença (—) de solução de TC, OTC, ambas  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e CTC  $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3, 2,3 e 4,0, respectivamente, com  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ .

A voltametria de onda quadrada não se mostra como alternativa para essas determinações, dada à elevada velocidade de varredura que é alcançada nesta técnica, o que dificultaria a aquisição de sinais de corrente e às suas limitações quanto a aplicação em sistemas irreversíveis.

Portanto, para essas determinações optou-se pela voltametria de pulso diferencial (DPV), dada a sua maior sensibilidade.<sup>43</sup>

## 4.2 Voltametria de pulso diferencial

### 4.2.1 Otimização dos parâmetros

Inicialmente, os parâmetros experimentais a serem usados em voltametria de pulso diferencial (DPV) devem ser otimizados para se obter melhores respostas do método analítico. Uma maneira de se fazer isso seria variar um parâmetro de cada vez e manter fixos os demais, porém um procedimento mais eficiente para tal fim seria a realização de um planejamento fatorial<sup>71</sup>, utilizando o EGPU 60% (grafite, *m/m*).

O planejamento fatorial permite avaliar o efeito conjunto de dois ou mais fatores na resposta. Neste experimento, os dois fatores de interesse são a amplitude de pulso (*a*) e a velocidade de varredura (*v*), em dois níveis cada um: *a* = 10 e 50 mV e *v* = 10 e 50 mV s<sup>-1</sup>. Este tipo de planejamento é considerado o mais simples e é denominado planejamento fatorial 2<sup>n</sup>, em que *n* = número de fatores. Portanto, sendo 2<sup>2</sup>, foram realizados quatro ensaios experimentais.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos são apresentados na Figura 4 e podem ser divididos em dois grupos, em função da amplitude de pulso. Quanto maior a amplitude de pulso, maior a sensibilidade observada, porém velocidades de varredura menores apresentaram melhor definição dos picos de oxidação da TC em torno de 0,9 V e 1,1 V (vs. ECS).

No caso da curva “d”, nota-se um ganho da corrente faradaica, concomitante com um significativo aumento da corrente capacitiva. Assim, o ganho líquido na intensidade da corrente de pico em relação à curva “c” não é suficientemente grande para compensar a perda de definição na forma do voltamograma.

Dessa forma, selecionaram-se os parâmetros usados para obter a curva “c”,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , como sendo os melhores para os estudos seguintes.

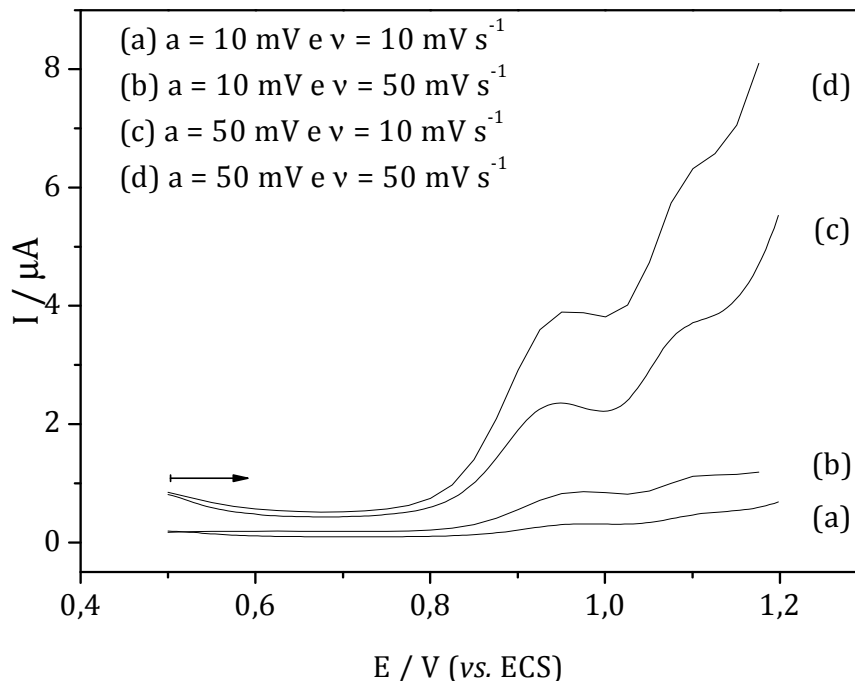


Figura 4 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) utilizando solução de TC  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 2,3 e os parâmetros  $a = 10$  e  $50 \text{ mV}$  e  $v = 10$  e  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Estudos semelhantes foram realizados para a OTC e CTC, os quais mostraram que as mesmas condições são melhores para esses analitos, conforme resumido na Tabela 3 apresentada no final deste Capítulo.

Essa melhor definição dos picos de oxidação em menores velocidades de varredura deve estar associada à baixa velocidade de transferência de carga entre as TCs e o eletrodo.

#### 4.2.2 Estudo do Efeito do pH na Resposta Voltamétrica das Tetraciclina

Após otimizar os parâmetros instrumentais, foi realizado um estudo para selecionar o pH que permite obter uma melhor resposta voltamétrica das tetraciclina no eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*) em DPV, em relação à intensidade de corrente e resolução dos picos.

Para isso, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial utilizando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, em diferentes valores de pH variando entre 2,3 e 7,3, como mostrado na Figura 5, para a TC, OTC e CTC.



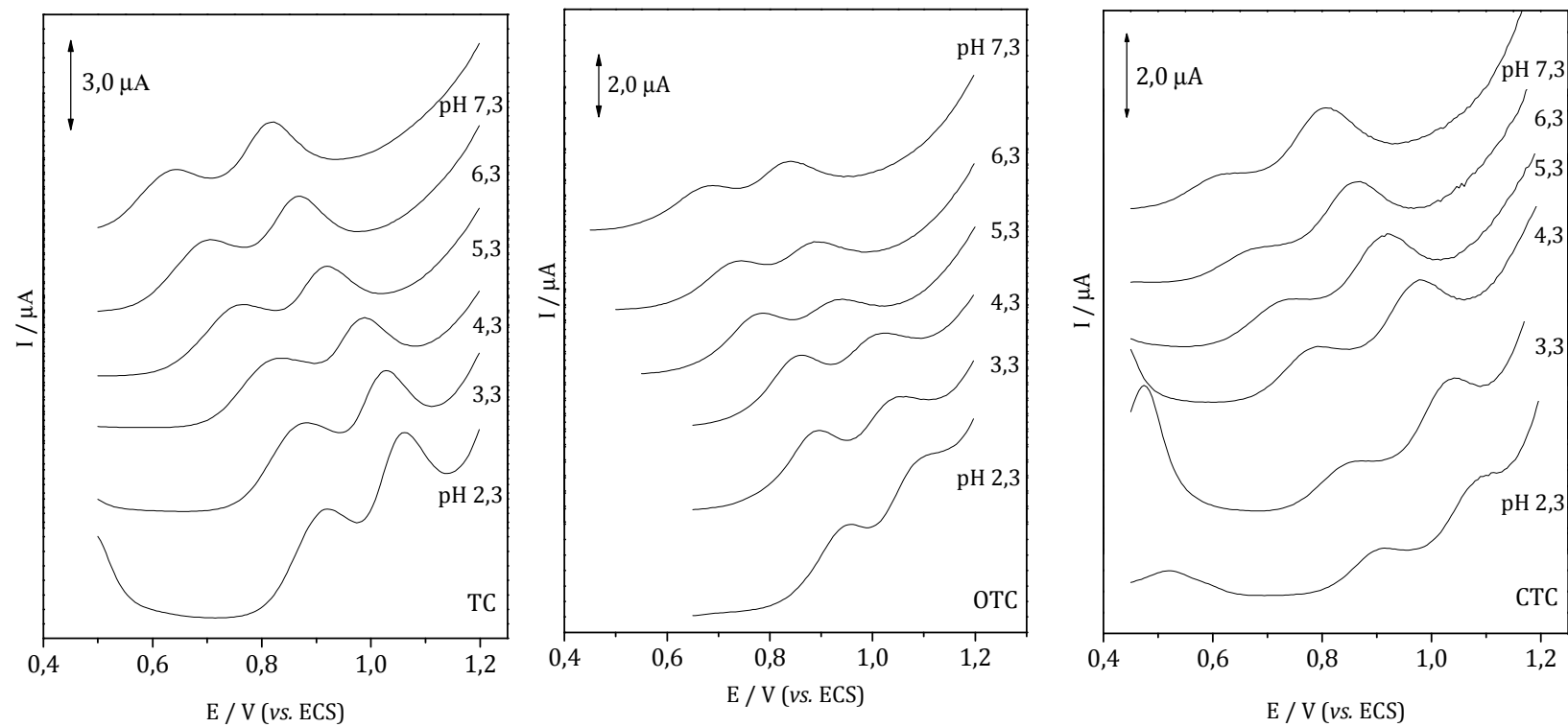


Figura 5 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ) utilizando soluções de TC e OTC, ambas  $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e CTC  $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , nos diferentes valores de pH (pH 2,3-7,3), com  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Pela Figura 5 observa-se que, com o aumento do pH, ocorre uma diminuição na intensidade de corrente dos picos de oxidação da TC e OTC, enquanto verifica-se um deslocamento dos picos para potenciais menos positivos.

Portanto, a partir desses dados fica evidente que os dois picos de oxidação da TC e da OTC são mais resolvidos em pH 2,3, o que concorda com Vega *et al.*<sup>70</sup>, que atribuíram a diminuição do sinal do pico de oxidação, em pH mais elevado, à baixa estabilidade das tetraciclinas, nestas condições.

Wangfuengkanagul *et al.*<sup>30</sup> observaram um sinal intenso do pico de oxidação para a TC, utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro após tratamento anódico, em pH 2,0, e atribuíram isto ao fato do eletrodo estar carregado negativamente, enquanto a TC seria um cátion, neste pH.

Entretanto, isto não parece ser a única razão dessa melhor resposta em meio ácido, pois no presente trabalho também foi observado o mesmo fato, sem a presença de cargas negativas na superfície do eletrodo compósito, já que o EGPU não foi submetido a tratamento eletroquímico e seria de esperar que os grupos funcionais gerados na superfície do eletrodo estariam protonados em meio ácido. Assim, propõe-se que a maior intensidade de sinal se deve, principalmente, à maior estabilidade das tetraciclinas, em meio ácido.

Melhores respostas voltamétricas e boa resolução dos dois picos também foram observadas por Masawat e Slater<sup>13</sup>, usando um eletrodo de ouro, em meio ácido.

A partir da relação entre potencial de pico ( $E_p$ ) e os valores de pH, da TC, podem ser observadas duas regiões lineares. A primeira entre pH 2,3 e 3,3, e a segunda região linear entre pH 4,3 e 7,3. Essas duas regiões lineares são observadas tanto para o primeiro pico de oxidação da TC, quanto para o segundo pico.

A intersecção dessas retas ocorre em valor de pH próximo a 3,5, para o primeiro pico e 3,7, para o segundo pico. Esses valores estão muito próximos do valor do  $pK_a$  da TC descrito na literatura<sup>72</sup>,  $pK_a = 3,3$ . Os resultados são mostrados na Figura 6.

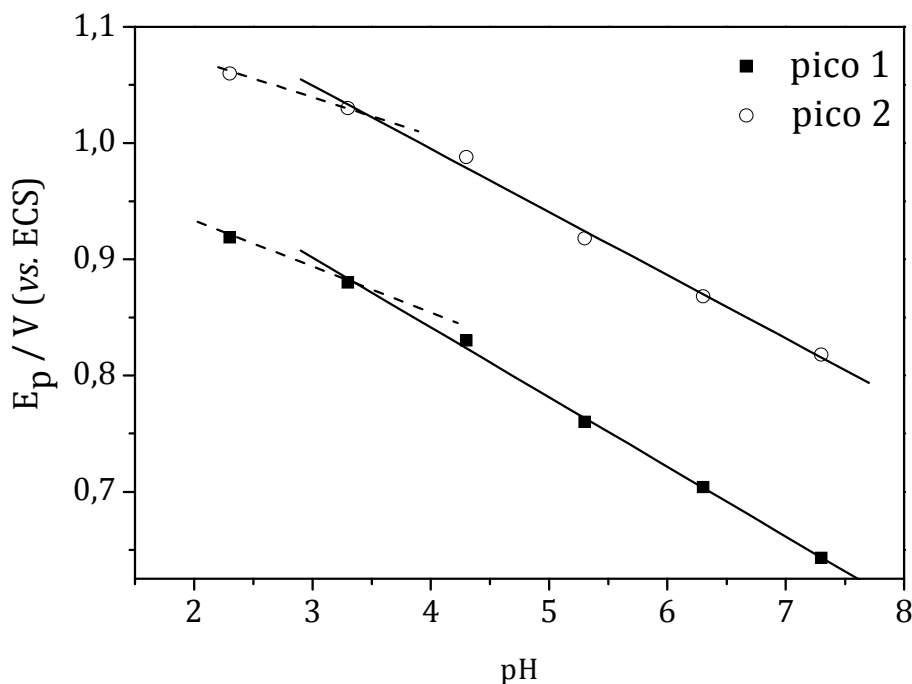


Figura 6- Relação entre o potencial de pico em voltametria de pulso diferencial e pH, em solução tampão fosfato, em diferentes valores de pH, contendo TC  $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

A primeira região linear, entre pH 2,3 e 3,3 segue a relação linear representada pelas Equações 4 e 5 a seguir:

$$E_p = 1012\text{mV} - 40 \text{ pH} \quad (R = 1 \text{ e } n = 2), \text{ para o pico 1} \quad (4)$$

$$E_p = 1129 \text{ mV} - 30 \text{ pH} \quad (R = 1 \text{ e } n = 2), \text{ para o pico 2} \quad (5)$$

A segunda região linear, entre pH 4,3 e 7,3 segue a relação linear representada pelas Equações 6 e 7 a seguir:

$$E_p = 1081 \text{ mV} - 60 \text{ pH} \quad (R = 0,999 \text{ e } n = 5), \text{ para o pico 1} \quad (6)$$

$$E_p = 1213 \text{ mV} - 56 \text{ pH} \quad (R = 0,997 \text{ e } n = 5), \text{ para o pico 2} \quad (7)$$

A inclinação das retas representadas pelas Equações 6 e 7, mostram deslocamentos de potencial dos picos anódicos, da ordem de 59 mV por unidade de pH e sugerem um mecanismo envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons, no processo redox.

Apesar da disponibilidade de apenas dois pontos abaixo do  $pK_a$ , nota-se uma redução significativa na inclinação da reta na primeira região linear, cujo valor de 30 – 40  $\text{mV pH}^{-1}$ , revela que há mudanças no mecanismo de oxidação, com envolvimento de números diferentes de prótons e elétrons. Se a inclinação é  $\frac{1}{2}$  60 mV pode-se pensar em  $1H^+/2e^-$ .

A relação  $E_p$  e pH para a OTC é semelhante à da TC, sendo que a intersecção dessas retas nos fornece os valores aproximados dos  $pK_a$  da OTC de 4,2, para o primeiro pico e 4,1, para o segundo pico. Tais valores estão um pouco acima do valor descrito na literatura <sup>72</sup>,  $pK_a = 3,3$ .

Isso, provavelmente, se deve à dificuldade de definir o potencial de pico de forma exata, devido às baixas correntes de pico e à forma dos voltamogramas, além do número pequeno de pontos tomados na primeira região linear. A literatura também não descreve as condições exatas para a determinação destes valores de  $pK_a$ , podendo o meio, ser uma outra fonte de diferença.

A primeira região linear, entre pH 2,3 e 4,3, segue a relação linear representada pelas Equações 9 e 10, a seguir:

$$E_p = 1062 \text{ mV} - 50 \text{ pH} \quad (R = 0,993 \text{ e } n = 3), \text{ para o pico 1} \quad (9)$$

$$E_p = 1179 \text{ mV} - 40 \text{ pH} \quad (R = 0,990 \text{ e } n = 3), \text{ para o pico 2} \quad (10)$$

A segunda região linear, entre pH 4,3 e 7,3, segue a relação linear representada pelas Equações 11 e 12, a seguir:

$$E_p = 1100 \text{ mV} - 59 \text{ pH} \quad (R = 0,998 \text{ e } n = 4), \text{ para o pico 1} \quad (11)$$

$$E_p = 1245 \text{ mV} - 56 \text{ pH} \quad (R = 0,996 \text{ e } n = 4), \text{ para o pico 2} \quad (12)$$

A inclinação das retas representadas pelas Equações 11 e 12, mostram deslocamentos de potenciais dos picos anódicos da ordem de 60 mV por unidade de pH e sugerem um mecanismo envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons, no processo redox. O valor de 56 mV para inclinação da Eq. 10 foi atribuído à dificuldade de medir o  $E_p$  devido à baixa definição do processo, enquanto a inclinação de 40 mV  $\text{pH}^{-1}$ , concorda com o mecanismo envolvendo  $1\text{H}^+/2\text{e}^-$  observado anteriormente.

Já para a CTC foi observado um comportamento diferente, pois com o aumento do pH, ocorre uma diminuição da intensidade de corrente do primeiro pico de oxidação e um aumento na corrente do segundo pico de oxidação. E também, verifica-se um deslocamento dos picos para potenciais menos positivos. Portanto, para a CTC o pH 4,3 foi escolhido para os estudos futuros, conforme Figura 5. Isso sugere que a oxidação pode estar ocorrendo no grupo hidroxila do carbono na posição 10.

A partir da relação entre potencial de pico ( $E_p$ ) e os valores de pH foi observada somente uma região linear para o primeiro pico de oxidação da CTC, sugerindo que o  $\text{pK}_a$  estaria fora dessa região. Segundo a literatura o valor do  $\text{pK}_a$  da CTC é igual a 3,3.<sup>72</sup>

Já para o segundo pico de oxidação da CTC, podem ser observadas duas regiões lineares. A primeira entre pH 2,3 e 3,3, e a segunda região linear entre pH 4,3 e 7,3. A intersecção dessas retas ocorre em valor de pH próximo a 2,9. Esse valor está próximo do valor do  $\text{pK}_a$  da CTC descrito na literatura. Os resultados são mostrados na Figura 7.

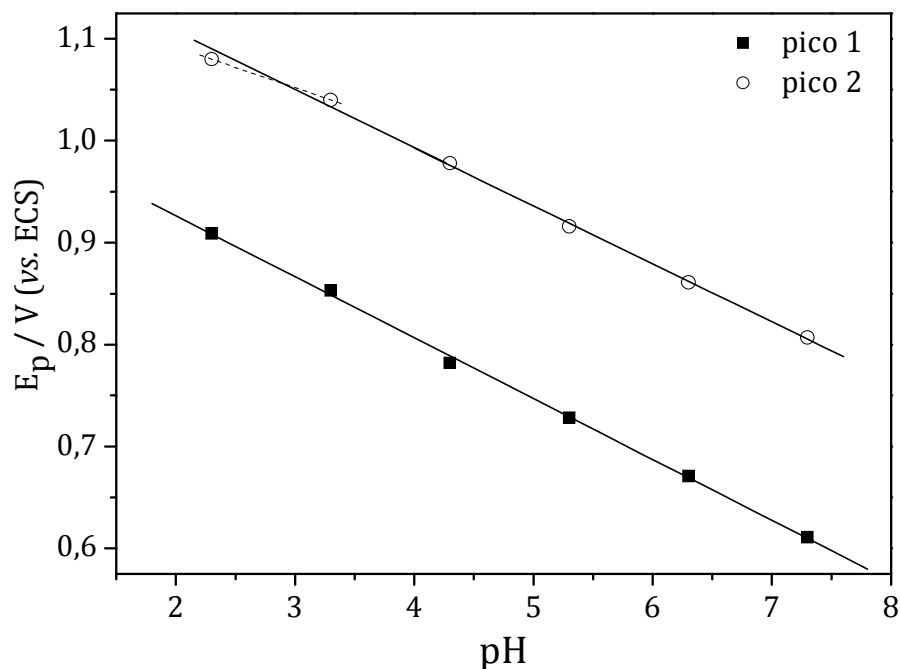


Figura 7 - Relação entre o potencial de pico em voltametria de pulso diferencial e pH, em solução tampão fosfato, em diferentes valores de pH, contendo CTC  $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

A região linear para o primeiro pico de oxidação da CTC, entre pH 2,3 e 7,3 pode ser representada pelas Equação 13, a seguir:

$$E_p = 1028 \text{ mV} - 60 \text{ pH} \quad (R = 0,999 \text{ e } n = 6), \text{ para o pico 1} \quad (13)$$

A primeira região linear do segundo pico de oxidação da CTC, entre pH 2,3 e 3,3, segue a relação linear representada pelas Equação 14, a seguir:

$$E_p = 1160 \text{ mV} - 40 \text{ pH} \quad (R = 1 \text{ e } n = 2), \text{ para o pico 2} \quad (14)$$

A segunda região linear do segundo pico de oxidação da CTC, entre pH 4,3 e 7,3, segue a relação linear representada pelas Equação 15, a seguir:

$$E_p = 1203 \text{ mV} - 57 \text{ pH} \quad (R = 0,999 \text{ e } n = 4), \text{ para o pico 2} \quad (15)$$

A inclinação das retas representadas pelas Equações 13 e 15, mostram deslocamentos de potencial dos picos anódicos, da ordem de 59 mV por unidade de pH e sugerem um mecanismo envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons, no processo redox.

Apesar da disponibilidade de apenas dois pontos abaixo do  $pK_a$ , nota-se uma redução significativa na inclinação da reta na primeira região linear do segundo pico, cujo valor de  $40 \text{ mV pH}^{-1}$ , revela que há mudanças no mecanismo de oxidação, com envolvimento de números diferentes de prótons e elétrons. Se a inclinação é  $\frac{1}{2} 60 \text{ mV}$ , também pode-se pensar em  $1H^+/2e^-$ .

O fato de ter observado somente uma região linear para o primeiro pico de oxidação é atribuído à falta de resolução do primeiro pico de oxidação.

### 4.2.3 Curvas Analíticas para as Tetraciclinas em DPV

Após a otimização da velocidade de varredura, amplitude de pulso e acidez do meio para a determinação das tetraciclinas utilizando o EGPU 60% (grafite, *m/m*) em DPV, foram obtidas curvas analíticas para a TC, OTC e CTC. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

O limite de detecção (LOD) foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão do branco ( $S_d$ ), dividido pelo coeficiente angular da reta ( $b$ ),<sup>73</sup> conforme Equação 16:

$$LOD = 3 S_d / b \quad (16)$$

Na Figura 8 estão representadas as respostas em DPV e as curvas analíticas da TC, OTC e CTC, nas mesmas condições otimizadas descritas na Tabela 3.



Tabela 3 – Resultados obtidos para o EGPU 60% (grafite, *m/m*)

<b>Antibióticos</b>	<b>Parâmetros DPV</b>	<b>pH</b>	<b>Picos de Oxidação</b>	<b>Região Linear / <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b>LOD/ <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b>Sensibilidade / <math>\mu\text{A}(\mu\text{mol})^{-1} \text{L}</math></b>	<b>pK<sub>a</sub> estimado</b>	<b>pK<sub>a</sub> literatura</b>
<b>TC</b>	a = 50 mV	2,3	1 <sup>o</sup>	3,8 a 38,0	2,6	0,02	3,6 ± 0,1	3,3
	v = 10 mV s <sup>-1</sup>		2 <sup>o</sup>	3,8 a 19,0	2,3	0,03		
<b>OTC</b>	a = 50 mV	2,3	1 <sup>o</sup>	3,8 a 28,5	1,7	0,03	4,1 ± 0,05	3,2
	v = 10 mV s <sup>-1</sup>		2 <sup>o</sup>	3,8 a 14,3	1,6	0,04		
<b>CTC</b>	a = 50 mV	4,3	1 <sup>o</sup>	3,8 a 23,1	0,82	0,01	2,9	3,3
	v = 10 mV s <sup>-1</sup>		2 <sup>o</sup>	0,77 a 7,7	0,59	0,03		

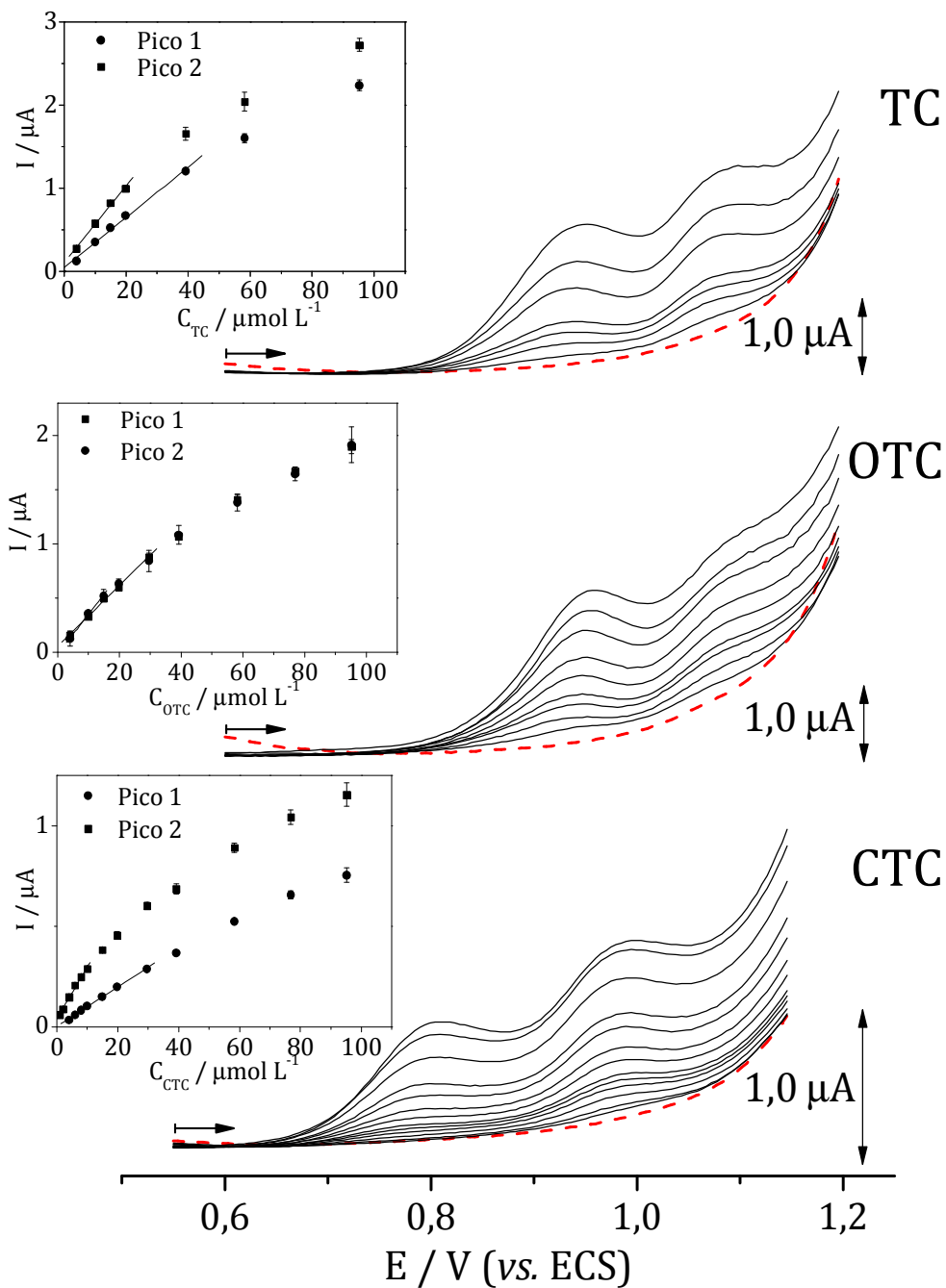


Figura 8 – Voltamogramas em pulso diferencial em diferentes concentrações de TC, OTC e CTC, respectivamente, utilizando o eletrodo composto grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ). No detalhe as curvas analíticas descritas. As concentrações utilizadas foram:

TC: 3,8; 9,5; 14,3; 19,0; 38,0; 57,0; 76,0; 95,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$

OTC: 3,8; 9,5; 14,3; 19,0; 28,5; 38; 57; 76; 95  $\mu\text{mol L}^{-1}$

CTC: 0,77; 1,5; 3,1; 4,6; 6,2; 7,7; 11,5; 15,4; 23,1; 30,8; 46,2; 61,6; 77  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Após a otimização dos parâmetros experimentais das tetraciclinas, o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*) foi utilizado na determinação desses fármacos em amostras de água natural, urina bovina e humana, e também em leite bovino e humano, como será apresentado nos próximos Capítulos.

## **Capítulo 5 - Determinação de TC e OTC em amostras de água natural**

## 5 Determinação de TC e OTC em amostras de água natural

Uma vez definidas as condições para determinação de TC e OTC, usando o eletrodo compósito, decidiu-se desenvolver uma aplicação deste procedimento a uma amostra mais complexa que as formulações farmacêuticas, tendo-se escolhido inicialmente uma amostra de água natural, proveniente do lago da UFSCar em São Carlos/SP.

Com base no procedimento de SPE <sup>68</sup>, descrito na Parte Experimental desta Tese iniciou-se esse experimento com a coleta de água do lago, que foi intencionalmente “contaminada” com TC.

Inicialmente, as amostras de água contendo TC e OTC foram submetidas à extração, usando cartucho para SPE. Após a eluição e retomada do analito retido no cartucho, as quantidades de TC e OTC presentes nas amostras foram determinadas pelo método da adição de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o EGPU 60% (grafite, *m/m*). Os voltamogramas foram obtidos em triplicata e um resultado típico é apresentado na Figura 9.

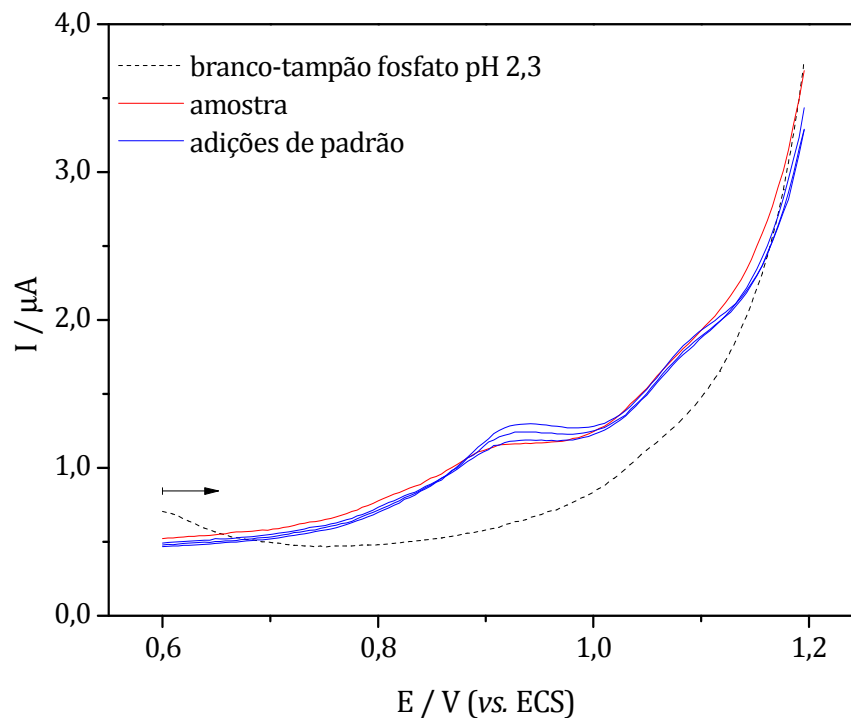


Figura 9 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos com o eletrodo composto grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em água natural.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Da Figura 9, nota-se que a passagem da TC pelo cartucho modifica a forma dos voltamogramas em relação às soluções aquosas e diminui sua resolução, quando comparada às curvas analíticas. Isso pode estar relacionado com a presença de substâncias provenientes da água natural, que interfeririam na forma da resposta da TC no eletrodo composto.

Também, é possível notar mudança significativa na linha base entre o branco, composto de tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3 e as soluções contendo TC.

Essas alterações na linha base foram notadas mesmo usando água purificada, sugerindo que a própria TC, e/ou seus produtos de oxidação, possam ser responsáveis por essas mudanças.

Assim, foi necessário estabelecer um procedimento adequado para a tomada de correntes, tendo também em vista a pequena variação de intensidade de pico sob estas condições e as variações na linha base.

A Figura 10 ilustra como foram tomadas as correntes de pico para as soluções de TC, passadas pelo cartucho extrator, após as adições de padrão. A linha base foi definida manualmente, com auxílio de uma curva francesa, representada pela linha em vermelho e a corrente tomada no ponto máximo.

A linha base foi traçada buscando-se a tendência mais natural possível da curva antes do pico respeitando os limites do perfil do branco, o que seria impossível usando métodos instrumentais.

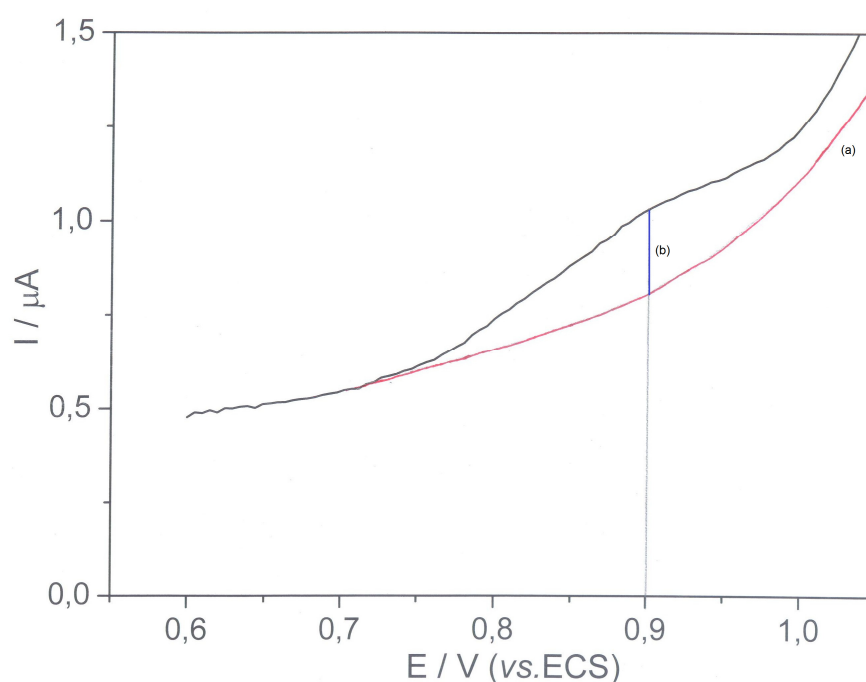


Figura 10 - Demonstração do uso do método gráfico na estimativa do valor da corrente de pico do voltamograma de pulso diferencial obtido com o eletrodo composto grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ) para a determinação de TC, em água natural: (a) curva estimada para a linha base e (b) resposta voltamétrica na presença do TC.

Também, foi feito um teste usando solução de TC em água purificada, ao invés de água natural, para avaliar o coeficiente de recuperação do procedimento de extração.

A Tabela 4 reúne os resultados obtidos na determinação de TC e OTC em amostras de água natural e de água purificada, utilizando o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ).

Tabela 4 - Resultados da determinação de TC e OTC em amostras de água natural e purificada usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), após uso de SPE, considerando um valor original de 1,90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (914  $\text{ng mL}^{-1}$ ), na amostra

Antibióticos	Amostra de água	Obtido por DPV / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação / %
TC	natural	1,86	98,0
		1,76	92,6
		1,87	98,5
		1,83 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 3
TC	purificada	1,84	97,0
		1,90	100,0
		1,82	96,0
		1,85 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 2
OTC	natural	1,90	100
		1,84	97
		1,82	96
		1,85 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 2
OTC	purificada	1,86	98,0
		1,81	95,0
		1,86	98,0
		1,84 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 2

<sup>a</sup> - média  $\pm$  SD

A proximidade dos valores de recuperação, tanto na amostra de água purificada, quanto em água natural mostra que o procedimento é viável e que, aparentemente, não está significativamente limitado por possíveis interferentes presentes na água natural, ou que os mesmo foram eliminados pelo cartucho SPE.



Os resultados também se mostram bastante promissores, tendo em vista a cinética lenta da transferência de elétrons das tetraciclinas, e as correntes de pico relativamente baixas apresentadas pelas mesmas.

Vega *et al.*<sup>70</sup> apresentam uma tabela que resume as características analíticas de vários métodos aplicados para a detecção eletroquímica de tetraciclinas, nos quais os limites de detecção variam entre 0,01 e 3,76  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, os valores obtidos mostram que este procedimento é viável para a determinação das tetraciclinas em amostras de água natural e compatível com outros procedimentos descritos na literatura.

A vantagem do método proposto é o baixo custo da instrumentação, baixa geração de resíduos e preparo relativamente simples de amostra.

**Capítulo 6 - Determinação de TC e OTC em amostras de urina bovina e humana**

## **6 Determinação de TC e OTC em amostras de urina bovina e humana**

### **6.1 Determinação de OTC em amostra de urina bovina**

A urina é uma solução aquosa que contem várias substâncias orgânicas e inorgânicas, na maioria produtos da eliminação do metabolismo. Cerca de 60% da composição da urina são constituídos de solutos orgânicos, tais como ureia, ácido úrico, creatinina e amônia. Os outros 40% da composição são solutos inorgânicos, tais como cloreto de sódio, cálcio, potássio, fosfatos e sulfatos. A composição química e física da urina reflete frequentemente a quantidade de fluidos ingeridos, na dieta e nas mudanças patológicas, tanto do trato urinário, quanto de outras partes do corpo.<sup>75</sup>

A urina bovina foi escolhida como matriz, pois a OTC é, um antibiótico de amplo espectro, muito utilizado nas práticas veterinárias<sup>7</sup> e, também, pela disponibilidade de amostra e riscos reduzidos de contaminação ao operador.

Segundo Huber<sup>7</sup> as tetraciclinas são excretadas primariamente pelos rins, sendo que aproximadamente 25 a 30% de uma única dose podem ser encontrados na urina bovina. Em um período de medicação repetida, a concentração pode exceder  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para a OTC), sendo excessiva em relação à quantidade necessária para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis. Com isso, os cálculos do procedimento, para determinação de OTC na urina bovina, se basearam nesta concentração.

A amostra de urina bovina foi fornecida pela EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos/SP), proveniente de animais que não eram medicados com o fármaco. Portanto, a

amostra foi intencionalmente “contaminada” com OTC, conforme descrito na Parte Experimental.

Segundo a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) não é necessário abrir um processo para uso da urina de animais, pois se trata de um ato involuntário do animal.

Após o preparo da amostra de urina ficaram definidas as seguintes condições:

- ✓ Razão de diluição da amostra, ou seja, volume de amostra adicionada ao eletrólito suporte na cela voltamétrica: 1:75 (o pico de oxidação da OTC torna-se mais evidenciado, sem prejuízo nos valores da recuperação);
- ✓ Solução estoque de urina  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de OTC (urina “contaminada”, equivalente a  $0,47 \text{ mg mL}^{-1}$  de OTC);
- ✓ 200,0  $\mu\text{L}$  de urina “contaminada” são adicionados a 15,0 mL de tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3, resultando em uma concentração de  $14,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  de OTC na cela eletroquímica.
- ✓ A quantidade de OTC na amostra de urina foi determinada pelo método de adição única de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*).

Estas condições foram definidas após grande número de experimentos e, talvez, representam a contribuição mais significativa para as determinações objeto de estudo.

A maior dificuldade foi estabelecer a razão da diluição da urina no eletrólito, sem ultrapassar as concentrações de excreção previstas na literatura. O ajuste desse parâmetro consumiu também grande número de tentativas e repetições experimentais até os resultados satisfatórios apresentados anteriormente.

Bergamini *et al.*<sup>74</sup> realizaram um estudo do efeito da matriz urina na determinação voltamétrica do fármaco isoniazida. Os autores constataram que razões de

diluição (amostra/eletrólito suporte) maiores que 1:100 promovem a diminuição no valor da recuperação. Sendo que diluições na razão de 1:10 promovem uma perda de 35% do sinal voltamétrico, e que o pico catódico desaparece na presença de 1:1 da amostra de urina. Com isso, os autores sugerem que, compostos presentes na urina podem ser adsorvidos na superfície do eletrodo, atuando como uma barreira no processo de redução da isoniazida. Portanto, estabeleceram a razão 1:100 como a melhor condição para a determinação voltamétrica da isoniazida.

Com base nestas informações, partiu-se do pressuposto que a urina deveria ser diluída pelo menos 100 vezes. Portanto, para 15,0 mL de tampão fosfato pH 2,3 utilizou-se 150,0  $\mu\text{L}$  de urina.

Para tanto, a concentração da solução estoque de urina “contaminada” foi de  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de OTC, equivalente a  $472 \mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC, para que, na cela eletroquímica, seja de  $9,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de OTC, dentro da região linear de resposta do EGPU 60% (grafite, *m/m*) e acima do LOD.

A quantidade de OTC presente na amostra foi determinada pelo método da adição de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o EGPU 60% (grafite, *m/m*).

Pelos voltamogramas da Figura 11, pode-se observar que os valores das correntes de pico não variaram proporcionalmente às concentrações das adições de padrão. Assim, foi necessário partir para o método de adição única de padrão, apesar de que a resolução do pico de OTC foi melhor a cada incremento. As correntes foram medidas a 0,95 V (vs. ECS).

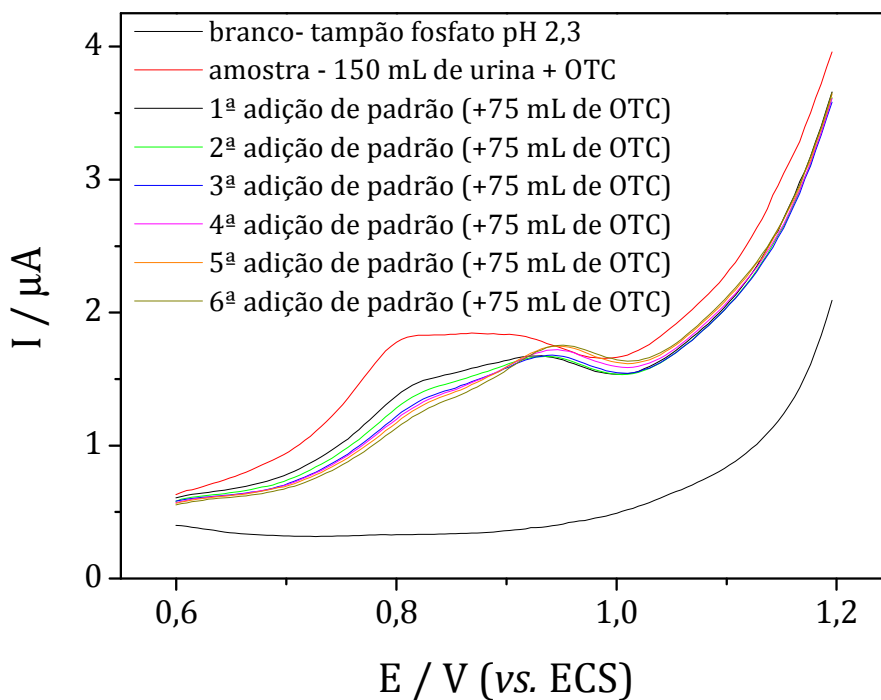


Figura 11 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para OTC no EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em urina bovina.  $[\text{OTC}]_{\text{estoque}} = 9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

Após otimização da razão de diluição da urina no eletrólito suporte, os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em triplicata e um resultado típico é apresentado na Figura 12.

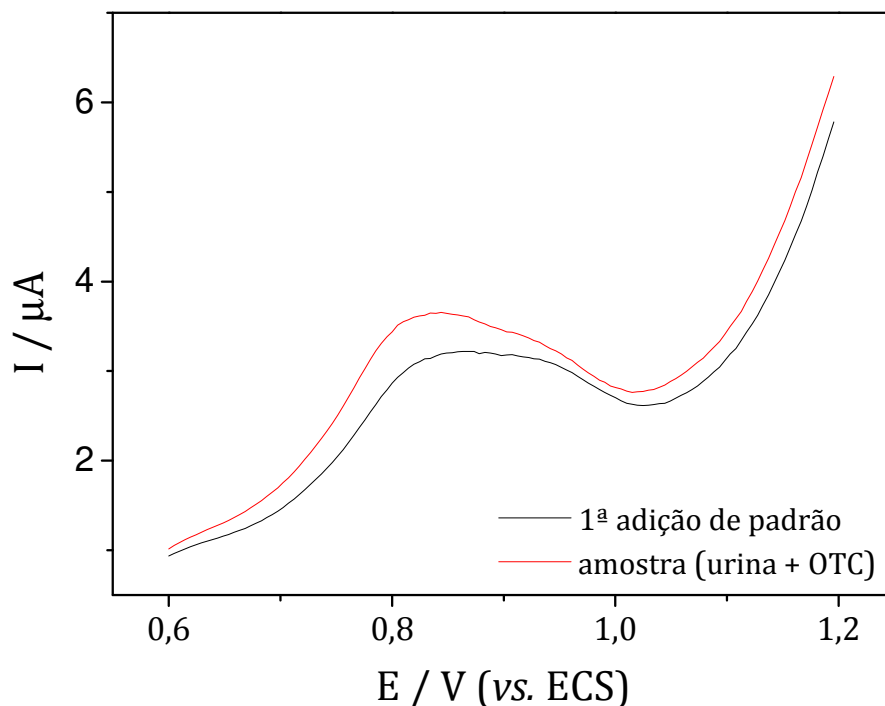


Figura 12 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de OTC em urina bovina.  $[\text{OTC}]_{\text{estoque}} = 9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Das Figuras 11 e 12, nota-se que, com a adição de urina, há uma modificação na forma dos voltamogramas e diminuição na resolução do pico de oxidação da OTC, quando comparadas às curvas analíticas. Isso pode estar relacionado com a presença de outras substâncias na urina, que poderiam alterar a forma da resposta da OTC no eletrodo compósito, talvez por adsorção delas mesmas ou de seus produtos de oxidação.

Também é possível notar forte mudança na linha base entre o branco, composto por tampão fosfato pH 2,3 e as soluções contendo OTC.

Assim, foi preciso utilizar um procedimento de tomada de correntes, com o auxílio de uma curva francesa para estabelecer a linha base adequada, tendo também em vista a pequena variação de intensidade de pico sob estas condições.

A Tabela 5 reúne os resultados de três determinações de OTC adicionada à amostra de urina bovina e os respectivos coeficientes de recuperação, obtidos usando o procedimento de adição única de padrão.

Tabela 5 - Resultados da determinação de OTC em urina bovina usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de 0,47 mg mL<sup>-1</sup> na amostra

Amostras	OTC / mg mL <sup>-1</sup>		Recuperação / %
	Adicionada	Determinada por DPV	
1	0,47	0,47	100
2	0,47	0,49	96
3	0,47	0,49	96
		0,48 ± 0,01 <sup>a</sup>	97 ± 2 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> - média ± SD

Durante as adições únicas de padrão foram observadas recuperações entre 96 e 100%, que mostram a viabilidade do procedimento.

Apesar das mudanças na forma das curvas observadas em água e nas amostras de urina, provavelmente devido aos concomitantes, o procedimento de adição única de padrão, contornou eventuais interferências, pois, aparentemente não há influência sobre a corrente de pico.



## 6.2 Determinação de TC e OTC em amostra de urina humana

Com base no procedimento descrito anteriormente, para determinação de OTC em urina bovina, decidiu-se determinar TC e OTC em amostras de urina humana, utilizando o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*), por DPV.

Segundo Weinstein<sup>4</sup> todas as tetraciclinas são eliminadas na urina e nas fezes, sendo que sua eliminação é significativamente afetada pela função renal do indivíduo. De 20 a 60% de uma dose de 0,5 g de tetraciclina são excretados na urina nas primeiras 24 h do tratamento. De 10 a 35% de uma dose de oxitetraciclina são excretados na forma ativa, na urina, na qual as tetraciclinas atingem concentrações de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Após o preparo da amostra, foram adicionados à cela eletroquímica 250,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de urina contendo  $5,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TC (equivalente a 283  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de TC). A quantidade de TC presente na amostra foi determinada pelo método da adição única de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o EGPU 60% (grafite, *m/m*). Os voltamogramas foram obtidos em triplicata e um resultado típico é mostrado na Figura 13.

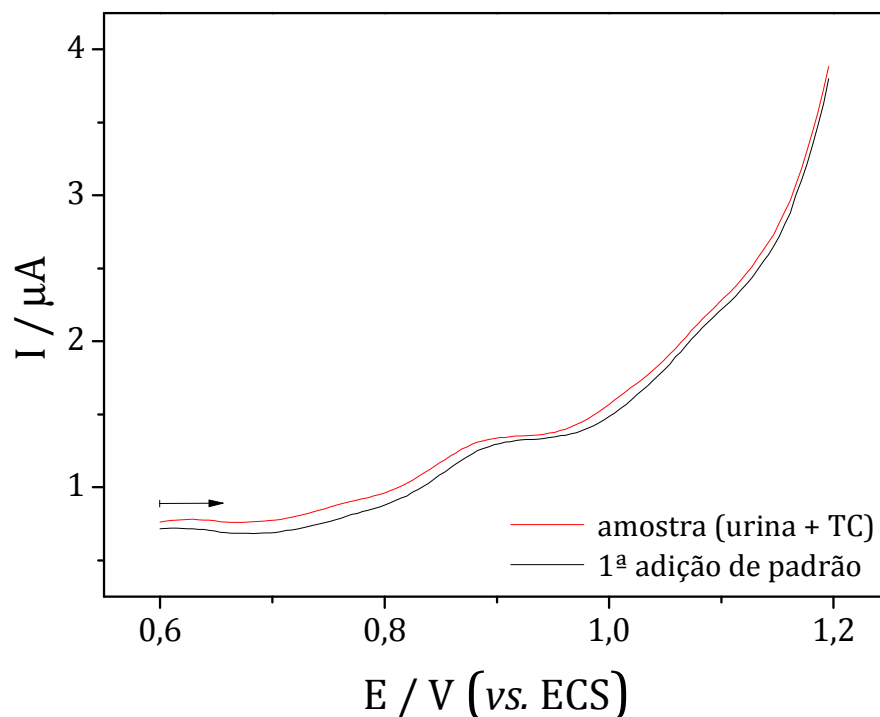


Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de TC em urina humana.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 5,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

A Tabela 6 reúne os resultados de três determinações de TC em amostra de urina humana e os respectivos coeficientes de recuperação.

Tabela 6 - Resultados da determinação de TC em urina humana usando o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), considerando um valor original de  $283 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TC na amostra

Amostras	TC / $\mu\text{g mL}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionada	Determinada por DPV	
1	283	275	97
2	283	275	97
3	283	264	93
		$271 \pm 6^a$	$96 \pm 2^a$

<sup>a</sup> - média  $\pm$  SD

Durante as adições únicas de padrão foram observadas recuperações entre 93% e 97%, que mostram a viabilidade do procedimento e que os concomitantes eventualmente presentes não provocam interferência significativa na determinação.

Para a OTC, após o pré-tratamento da amostra, foram adicionados à cela eletroquímica 250,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de urina contendo  $5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de OTC (equivalente a  $285 \mu\text{g mL}^{-1}$  de OTC). A quantidade de OTC presente na amostra foi determinada pelo método da adição única de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ). Os voltamogramas foram obtidos em triplicata e um resultado típico é mostrado na Figura 14.

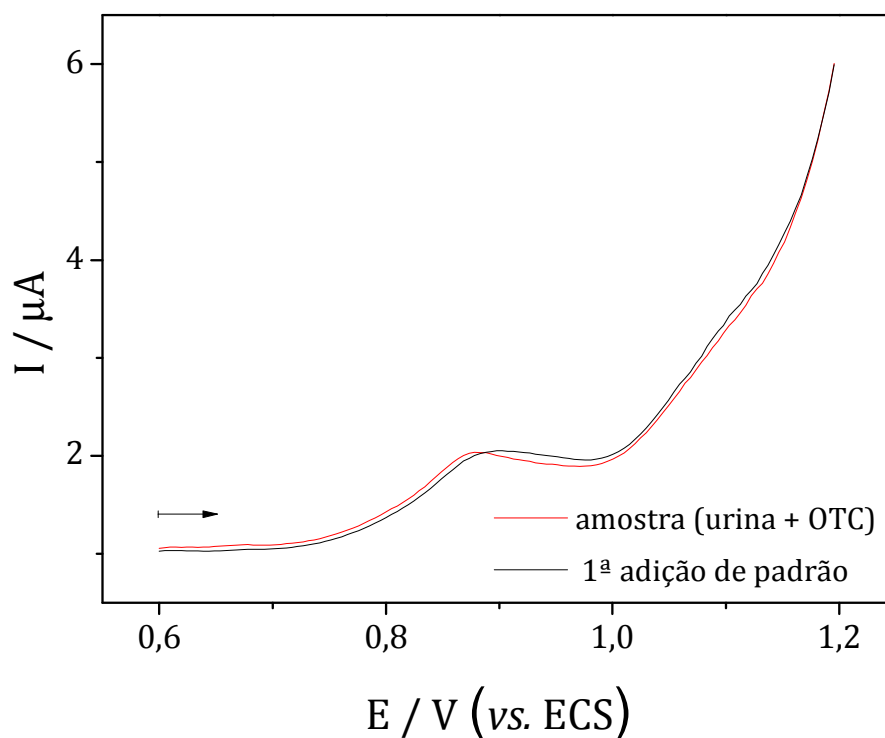


Figura 14 - Voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , na determinação de OTC em urina humana.  $[\text{OTC}]_{\text{estoque}} = 5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

A Tabela 7 reúne os resultados de três determinações de OTC adicionada à amostra de urina humana e os respectivos coeficientes de recuperação.

Tabela 7 - Resultados da determinação de OTC em urina humana usando o EGPU 60% (grafite, m/m), considerando um valor original de 285 µg mL<sup>-1</sup> de OTC na amostra

Amostras	OTC / µg mL <sup>-1</sup>		Recuperação / %
	Adicionada	Determinada por DPV	
1	285	285	100
2	285	271	95
3	285	276	97
		277 ± 7 <sup>a</sup>	97 ± 2,5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> - média ± SD

Durante as adições únicas de padrão foram observadas recuperações entre 95 e 100%, que mostram a viabilidade do procedimento e que os concomitantes eventualmente presentes provocam interferência na determinação.

A amostra de urina humana é significativamente mais fácil de ser analisada que a bovina, pois a segunda é mais viscosa, de cor mais escura e contém maior quantidade de precipitado, inclusive durante estocagem.

Provavelmente, os valores de recuperação menores que 100% obtidos nas amostras de urina sugerem que parte do fármaco pode ter sido perdida na centrifugação, ao se adsorver ao material sólido.

**Capítulo 7 - Determinação de TC em amostras de leite bovino e humano**

## 7 Determinação de TC em amostras de leite bovino e humano

Considerando o sucesso obtido nas determinações de tetraciclinas em amostras de urina bovina e humana, usando o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ), decidiu-se desenvolver outra aplicação deste procedimento a uma amostra biológica mais complexa. Escolheu-se o leite bovino e humano, como amostras, devido à importância desse alimento no mercado brasileiro e tendo em vista o uso amplo de antibióticos no trato animal e eventual uso humano.

Segundo a U. S. Public Health, o leite é definido como uma secreção láctea, praticamente livre de colostro, o qual é obtido pela ordenha completa de uma ou mais fêmeas leiteiras.<sup>76</sup>

Silva<sup>77</sup> estima que o leite possua em torno de cem mil constituintes distintos, embora muitos deles ainda não identificados. Os principais constituintes do leite são a água, gorduras, vitaminas, proteínas, enzimas e a lactose, além de substâncias minerais. Devido a essas características, pode-se considerar o leite uma amostra de complexidade considerável.

Para os cálculos das concentrações de TC no leite bovino foi considerado o valor de densidade médio de  $1,032 \text{ g mL}^{-1}$ .<sup>77</sup>

### 7.1. Preparo da Amostra de Leite

Devido à complexidade do leite, foi necessário buscar um preparo de amostra eficaz para a utilização do eletrodo compósito, pois, substâncias constituintes do leite, tais como as proteínas ou a gordura poderiam se adsorver na superfície do eletrodo

bloqueando, assim, a superfície e o sinal analítico. Para tanto, foram testados alguns procedimentos descritos na literatura, os quais estão descritos a seguir.

Na primeira tentativa, foi testado um procedimento proposto por Barbosa *et al.*<sup>78</sup>, que utiliza uma mistura acetonitrila e água (1:1, v/v), como agente precipitante de proteínas, adicionada a amostra de leite. Mas não foi possível observar nenhuma separação de fases.

Outro teste também realizado foi uma extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila<sup>70</sup>, o qual também não resultou em sucesso, pois não foi possível evaporar todo o solvente.

Após grande número de tentativas sem sucesso, optou-se por usar o ácido tricloroacético 80% para a precipitação das proteínas do leite<sup>69</sup>, o qual se apresentou eficaz na separação de fases sólida (branca) e líquida (soro), após centrifugação da amostra. Definido o procedimento de preparo da amostra, partiu-se para o procedimento de extração em fase sólida, como já descrito na Parte Experimental desta Tese.

## **7.2 Procedimento de Extração em Fase Sólida**

Outro desafio na determinação de tetraciclinas em amostras de leite foi a etapa da eluição dos cartuchos utilizados na extração em fase sólida. Para tanto, foi necessário realizar uma série de experimentos para escolha do solvente de eluição. Estes experimentos estão descritos a seguir.

No primeiro teste, após a extração, o cartucho foi percolado com três porções de 2,0 mL de metanol, a 2,0 mL min<sup>-1</sup>, para eluição analito.

Após eluição, o metanol foi evaporado com fluxo de nitrogênio, e o analito diluído em 10 mL de tampão fosfato pH 2,3. Esta solução foi adicionada a cela eletroquímica, para a determinação de TC, pelo método de adição de padrão.

A Figura 15 apresenta os voltamogramas obtidos, mas o resultado não foi o esperado, pois conforme se adicionava volumes da solução padrão de TC, o sinal dos picos de oxidação da TC diminuía.

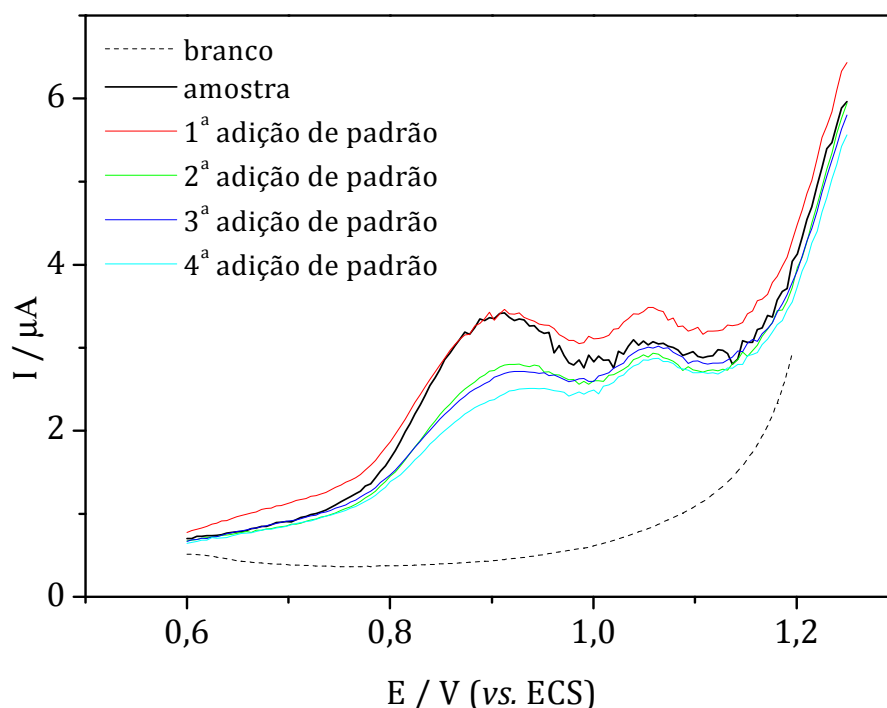


Figura 15 - Voltamograma de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite, *m/m*), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Isso ocorreu, pois o metanol deve ter eluído além da TC, outras substâncias retidas no cartucho, as quais podem ter se adsorvido na superfície do eletrodo provocando, assim, a diminuição do sinal analítico.

No segundo teste, foi utilizado, como solvente de eluição, 6,0 mL de etanol. Os voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 16, mas também se observou a diminuição do sinal analítico, conforme as adições de solução padrão de TC.



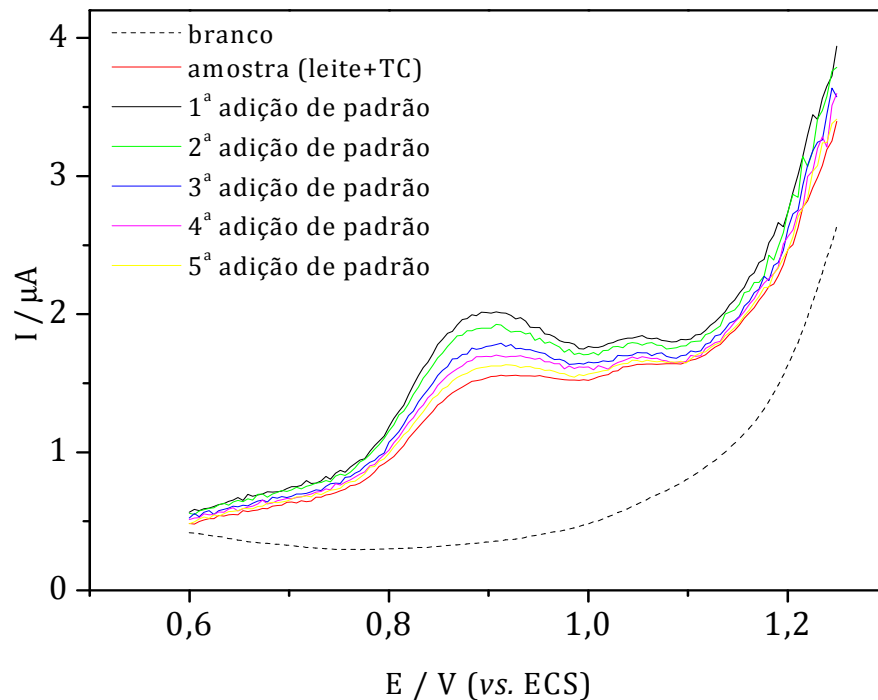


Figura 16 - Voltamograma de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite, *m/m*), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Provavelmente, o etanol também deve eluir do cartucho a TC e outras substâncias indesejadas, porém com resultado piores que em metanol. Isso sugere que a polaridade do eluente deve ser relativamente elevada e próxima à da água.

No terceiro teste, decidiu-se por utilizar uma mistura de metanol e tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,3 e somente solução tampão, a partir dos seguintes sistemas de eluentes:

- ✓ Tampão fosfato pH 2,3 (100%)
- ✓ Tampão fosfato pH 2,3 + metanol 1:1 (v/v)

Nestes testes, a 200 mL de leite foram adicionados 360  $\mu\text{L}$  de solução estoque de TC  $4,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , resultando numa concentração de  $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  na amostra de leite.

Essa amostra de leite foi dividida em dois experimentos diferentes, como resumido na Tabela 8.

Tabela 8 - Experimentos para otimização do solvente de eluição do cartucho na determinação de TC em leite bovino

<i>Cartuchos</i>	<i>Volume de amostra / mL</i>	<i>Eluição</i>
1	50	10,0 mL de tampão fosfato pH 2,3
2	50	5,0 mL de metanol + 5,0 mL de tampão fosfato pH 2,5

Os voltamogramas obtidos para os dois testes estão apresentados nas Figuras 17 e 18, a seguir.

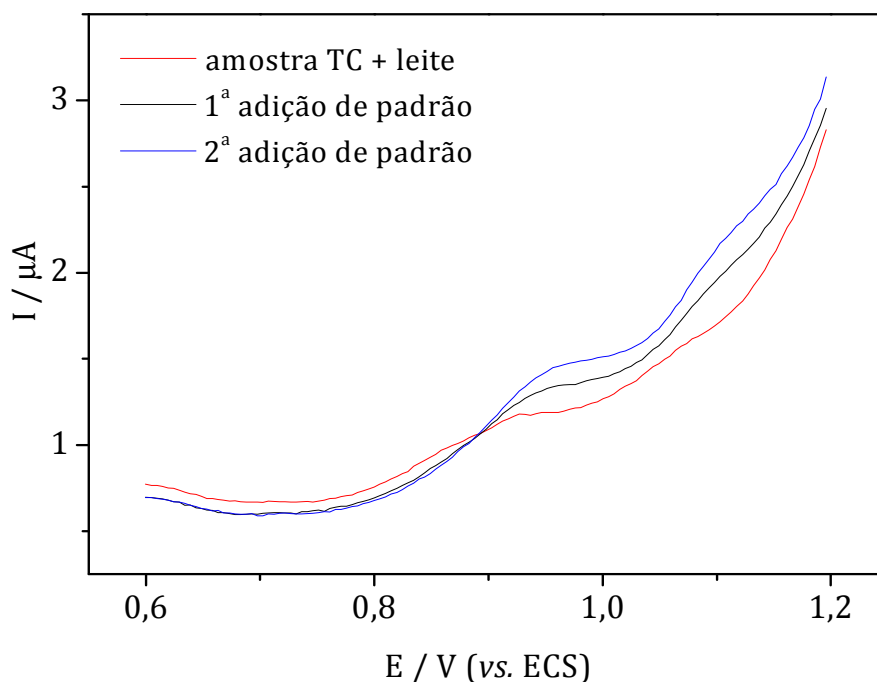


Figura 17 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos om o EGPU 60% (grafite, *m/m*), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino. Teste 1.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Na Figura 18 pode-se observar que a presença do metanol, como eluente, provoca desaparecimento do segundo pico de oxidação da TC, assim como promove a presença

de um interferente no mesmo potencial do primeiro pico de oxidação com maior intensidade de corrente.

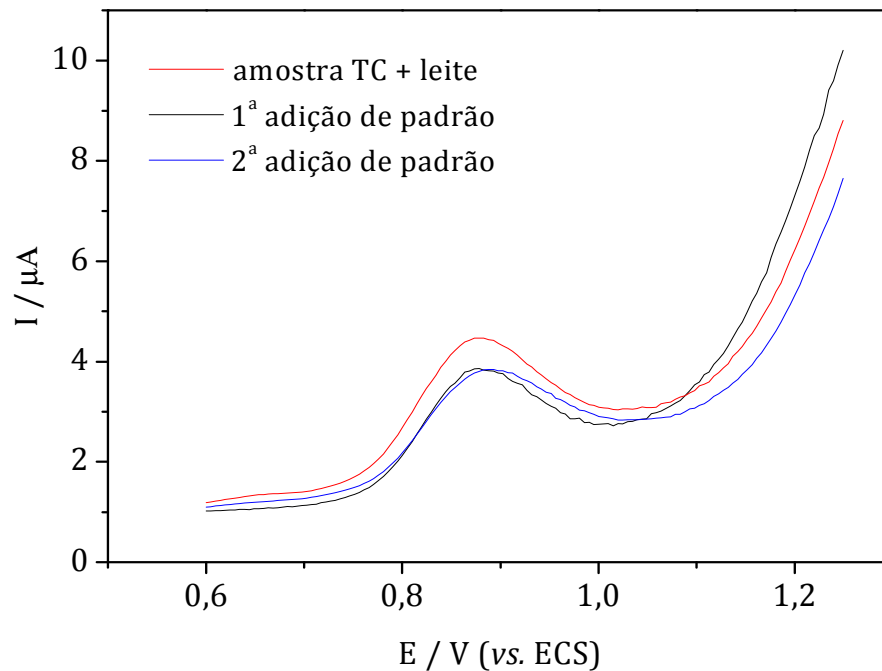


Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,5,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino. Teste 2.  
 $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Portanto, ficou definido como solvente de eluição no procedimento de extração em fase sólida, a solução tampão fosfato pH 2,3, assim foi possível dar continuidade a determinação de TC em amostras de leite, como descrito a seguir.

### 7.3 Determinação de Tetraciclina em Amostras de Leite Bovino

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), o limite máximo residual (LMR) aceitável das tetraciclinas em leite é de  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .<sup>12</sup>

Já o Ministério da Agricultura, pela Portaria 193, de 12 de maio de 1998, proíbe o uso das tetraciclinas como aditivo na alimentação animal<sup>13</sup>, de forma que se torna importante o controle de TC em leite.

Portanto, uma amostra de leite bovino foi intencionalmente “contaminada” com TC ( $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de TC, equivalente a  $2,15 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de TC), descrito na Parte Experimental desta Tese.

Após o preparo da amostra, foram realizadas as medidas de quantificação de TC no leite bovino pelo método de adição de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*). Um resultado típico é mostrado na Figura 19.

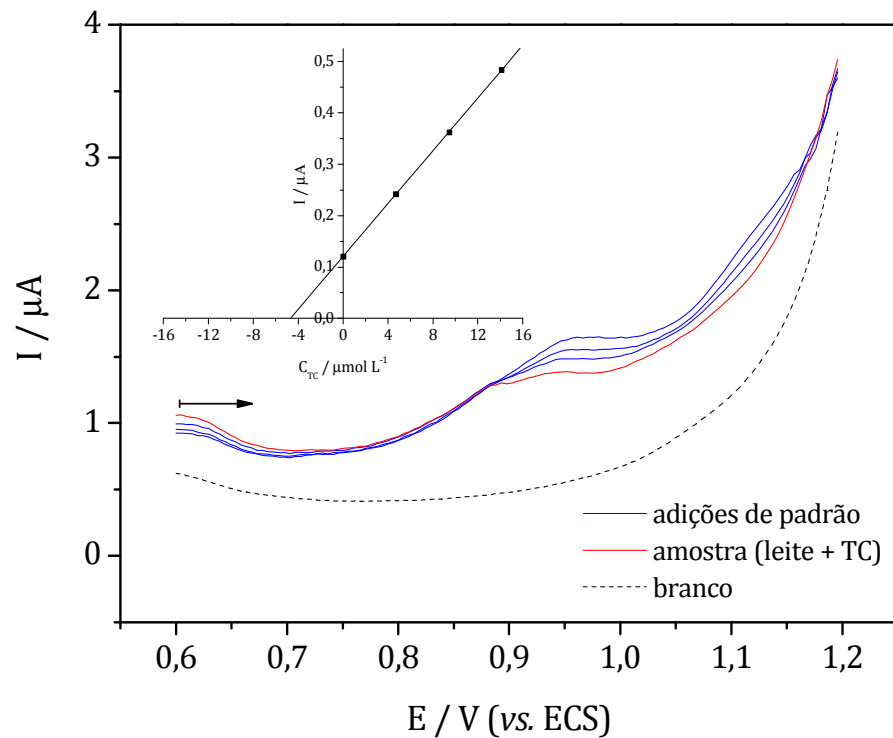


Figura 19 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo composto grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite bovino.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Pelos voltamogramas da Figura 19, pode-se observar que os valores das correntes de pico variaram proporcionalmente às concentrações das adições de padrão.

Também é possível notar uma mudança na linha base entre o branco (tampão fosfato pH 2,3) e as soluções contendo a TC. Assim, foi preciso utilizar o mesmo procedimento de tomadas de correntes, como já discutido anteriormente.

A Tabela 9 reúne os resultados de três determinações de TC adicionada a cinco diferentes amostras de leite bovino e os respectivos coeficientes de recuperação.

Tabela 9 - Resultados da determinação de TC em três amostras diferentes de leite bovino usando o EGPU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  na amostra

Amostras	TC / $\mu\text{g Kg}^{-1}$		
	Adicionada	Determinada por DPV	Recuperação / %
1	100	82,9	83
2	100	98,6	99
		98,3	98
		97,8	98
		$98 \pm 0,4^a$	$98 \pm 0,4^a$
3	100	98,6	99
		98,9	99
		99,4	99
		$99 \pm 0,4^a$	$99 \pm 0,4^a$
4	400	388,6	97
		413,8	103
		391,4	98
		$398 \pm 14^a$	$99 \pm 3,2^a$
5	400	301,9	75
		413,8	103
		396,1	99
		$371 \pm 60^a$	$92 \pm 15^a$

<sup>a</sup> - média  $\pm$  SD

Também foram realizadas determinações com duas amostras de leite contendo  $400 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de TC, a fim de observar alguma interferência em concentrações mais altas de TC no leite.

Os estudos de adições de padrão mostram recuperações entre 75% e 103 %, que mostram a viabilidade do procedimento, após preparo adequado de amostra e procedimento de extração.

Os valores ligeiramente superiores a 100% observados nas determinações podem ser devidos à presença de outros fármacos nas amostras de leite.

#### **7.4 Determinação de TC em Amostras de Leite Humano**

Após otimizadas as condições para as determinações de TC em amostras de leite bovino, o eletrodo compósito grafite-PU foi também aplicado na determinação de tetraciclina em amostras de leite humano.

Posner *et al.*<sup>79</sup> apresentaram um estudo em que cinco mulheres receberam TC em um período de medicação repetida, sendo que os níveis de TC no leite variaram de 0,43 a 2,58  $\text{mg L}^{-1}$ . Com isso, os cálculos do procedimento, para determinação de TC no leite materno, se basearam nessa faixa de concentração.

A amostra de leite humano foi fornecida pelo Banco de Leite da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos/SP, de mulheres que, provavelmente, não eram medicadas com o fármaco. Portanto, a amostra foi intencionalmente “contaminada” com TC, conforme descrito na Parte Experimental desta Tese.

Considerando a origem das amostras coletadas e que todas são misturadas no banco de leite da Santa Casa, não há como garantir a presença ou não de fármacos

nessas amostras. Entretanto, considerando a condição de lactantes das mães, é de se esperar que as mesmas não estivessem fazendo uso de medicamentos.

Os padrões éticos adotados seguiram os critérios do banco de leite que forneceu as amostras.

A quantidade de TC presente na amostra “contaminada” foi determinada pelo método de adições sucessivas de padrão, usando voltametria de pulso diferencial, com o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite,  $m/m$ ). Os voltamogramas foram obtidos e um resultado típico é mostrado na Figura 20.

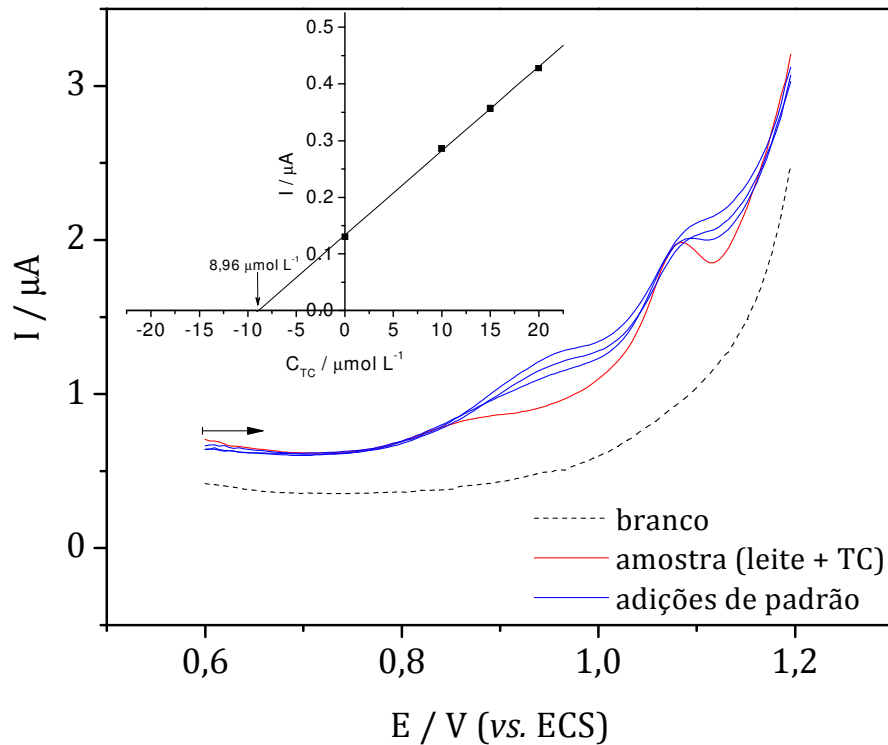


Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EGPU 60% (grafite,  $m/m$ ), em tampão fosfato pH 2,3,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , em leite humano.  $[\text{TC}]_{\text{estoque}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

A Tabela 10 reúne os resultados de três determinações de TC adicionada à amostra de leite humano e os respectivos coeficientes de recuperação.



Tabela 10 - Resultados da determinação de TC em amostra de leite humano usando o eletrodo composto grafite-PU 60% (grafite, *m/m*), considerando um valor original de 1,64 mg L<sup>-1</sup> na amostra

Amostras	TC / mg L <sup>-1</sup>		
	Adicionada	Determinada por DPV	Recuperação / %
1	1,64	1,64	100
2	1,64	1,49	91
3	1,64	1,64	100
		1,59 ± 0,09 <sup>a</sup>	97 ± 5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> - média ± SD

Durante as adições únicas de padrão foram observadas recuperações entre 91% e 100 %, que mostram a viabilidade do procedimento.

## **Capítulo 8 – Conclusão**

## 8 Conclusão

Os resultados apresentados permitiram concluir que o eletrodo compósito grafite-PU 60% (grafite, *m/m*) representa uma alternativa na determinação dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina em amostras de águas naturais, usando pré-concentração em SPE, além de amostras de urina bovina e humana, e amostras de leite bovino e humano utilizando voltametria de pulso diferencial, com limite de detecção na ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sem necessidade de modificação e dentro dos valores de excreção previstos pela literatura para mamíferos.

As correntes obtidas são baixas e a sensibilidade do método também, mas com os devidos cuidados experimentais, e o processo de medida de linha base usado, foi possível determinar os antibióticos ao nível de  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sem necessidade de modificação do eletrodo, de pré-concentração, derivatização ou outros artifícios experimentais. Comparados aos procedimentos HPLC-MS, os custos são mais baixos e há menor geração de resíduos.

Geralmente, as tetraciclinas são analitos que apresentam processo de oxidação com baixa velocidade de transferência de carga, e pequena intensidade de corrente em potenciais relativamente elevados, próximos a descarga do eletrólito. Isso representa um desafio para o material de eletrodo e para a metodologia proposta em eletroanalítica.

**Trabalhos futuros**

## Trabalhos futuros

- ✓ Confeccionar o eletrodo compósito grafite-PU em dimensões reduzidas com alta área superficial e nanoestruturas expandidas;
- ✓ Introduzir modificadores no corpo do eletrodo e não apenas na superfície, tais como, nanopartículas de ouro, níquel, entre outros;
- ✓ Possibilidade de uso em aplicações biológicas *in vivo* .

**Outras Atividades**

## Outras Atividades

### Trabalhos apresentados

#### ✓ Congressos nacionais

1. CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E.T.G. *Avaliação do desempenho do eletrodo compósito à base de grafite e resina poliuretana, na determinação de tetraciclina*. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP. CD-ROM, 2010.

1. CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E.T.G. *Aplicação do eletrodo compósito grafite-poliuretana na determinação voltamétrica do fármaco oxitetraciclina em amostra biológica*. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 28 de agosto a 1º de outubro de 2011, Bento Gonçalves-RS. CD-ROM, 2011.

3. CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E.T.G. *Aplicação do eletrodo compósito grafite-poliuretana na determinação voltamétrica do fármaco oxitetraciclina em amostra biológica*. In: 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 6 a 8 de novembro de 2011, São José do Rio Preto - SP. Livro de Resumos, 2011.

#### ✓ Congresso Internacional

1. CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E.T.G. *Determination of tetracycline at a graphite-polyurethane composite electrode in natural water sample*. In: 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 26 de setembro a 1º de outubro de 2010, Nice-França. CD-ROM, 2010.

✓ **Artigos**

1. **CALIXTO, C. M. F.**; MENDES, R. K.; OLIVEIRA, A. C.; RAMOS, L. A.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Development of graphite-polymer composite as electrode materials. *Materials Research*, v. 10, p.109-114, 2007. **Citações: 7**

2. **CALIXTO, C. M. F.**; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-Araldite®: aplicações didáticas. *Química Nova*, v. 31, p. 2194-2198, 2008. **Citações: 8**

3. **CALIXTO, C. M. F.**; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of atenolol in pharmaceutical formulations and environmental water samples at a graphite-epoxy composite electrode. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 92, n. 5, p. 561-570, 2012.

4. **CALIXTO, C. M. F.**; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 5, p. 938-943, 2012.

5. **CALIXTO, C. M. F.**; CAVALHEIRO, E.T.G. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. *Química Nova na Escola*, v. 34, n. 3, p.118-123, 2012.

6. **CALIXTO, C. M. F.**; CAVALHEIRO, E. T. G. Analysis of tetracyclines in bovine and human urine samples using a graphite-polyurethane composite electrode. *Em fase de redação*.

7. **CALIXTO, C. M. F.**; SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-Araldite®: aplicações didáticas- parte II. *Em fase de redação*.



✓ **Prêmio**

*Menção honrosa* por ter desempenhado atividade de destaque no estágio de Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, realizado no Instituto de Química de São Carlos durante o 1º semestre de 2011.

✓ **Estágio supervisionado em docência**

No período de 01/07/2010 a 30/11/2010, a aluna participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina SQM407 - Química Analítica Qualitativa ministrada aos alunos de graduação do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

No período de 01/02/2011 a 30/06/2011, a aluna participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina SQM 0421 - Análise Instrumental III: Teórica e Prática ministrada aos alunos de graduação do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

A aluna acompanhou o bolsista de iniciação científica/PIBIC Glauco Ferro Leal nos estudos de modificação do eletrodo compósito grafite-PU.

## **Referências bibliográficas**

## Referências bibliográficas

- 1 DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in waste waters, sludge and sediments. In: HUTZINGER, O. **The Handbook of Environmental Chemistry**. New York: Springer-Verlog, 2004. v. 5, Part J, p. 227-260.
- 2 ÁGUA dos EUA está contaminada com resíduos químicos. Disponível em: <<http://jornalnacional.globo.com/jornalismo/JN/0,,AA1675212-3586,00.html>>. Acesso em: 10 mar. 2008.
- 3 LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p.
- 4 WEINSTEIN, L. As tetraciclinas: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, e desmetilclortetraciclina. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN A. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. p. 1129-1144.
- 5 GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- 6 LACAZ, C. S. **Antibióticos**. São Paulo: Edgar Blücher, 1975. 509p.
- 7 HUBBER, W. G. Tetraciclinas. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. (Ed.). **Farmacologia e terapêutica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. v. 1, p. 655-661.
- 8 CUNHA, C. O.; SILVA, C. R.; AMORIM, C.G.; JÚNIOR, S. A.; ARAÚJO, A. N.; MONTENEGRO, C. B. S. M.; SILVA, V. L. Tetracycline potentiometric sensor based on cyclodextrin for pharmaceuticals and waste water analysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 24, p. 2967-2972, 2010.
- 9 PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B.; SANTOS, H. F., MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R. GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

10 JIN, H.; KUMAR, A.P.; PAIK, D.-H.; HÁ, K.-C.; YOO, Y.-J., LEE, Y.-I. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC-QToF mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 94, p. 139-147, 2010.

11 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo-PAMVET**. Brasília, 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 04 jul. 2012.

12 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Aditivos proibidos na alimentação animal**. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos>>. Acesso em: 04 jul. 2012.

13 MASAWAT, P.; SLATER, J. M. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 124, p. 127-132, 2007.

14 KAZEMIFARD, A. G.; MOORE, D. E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 689-696, 1997.

15 CHATTEN, L. G.; FLEISCHMANN, M.; PLETCHER, D. The anodic oxidation of some tetracyclines. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 102, p. 407-413, 1979.

16 DANG, X.; CHENGGUO, H.; WEI, Y.; CHEN, W.; HU, S. Sensitivity improvement of the oxidation of tetracycline at acetylene black electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Electroanalysis**, v. 16, n. 23, p. 1949-1955, 2004.

17 LOFTIN, K. A.; ADAMS, C. D.; MEYER, M. T.; SURAMPALLI, R. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 378-386, 2008.

18 CAPLIS, M. E.; RAGHEB, H. S.; SCHALL, E. D. Determination of tetracycline antibiotics by alternating-current polarography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 5, p. 694-698, 1965.

19 KURZAWA, M.; KOWALCZYK-MARZEC, A. Electrochemical determination of oxytetracycline in veterinary drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 95-102, 2004.

20 LIAN, W.; HUANG, J.; YU, J.; ZHANG, X.; LIN, Q.; HE, X.; XING, X.; LIU, S. A molecularly imprinted sensor based on beta-cyclodextrin incorporated multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticles-polyamide amine dendrimer nanocomposites combining with water-soluble chitosan derivative for the detection of chlortetracycline. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 620-627, 2012.

21 LI, J.; JIANG, F.; WEI, X. Molecularly imprinted sensor based on an enzyme amplifier for ultratrace oxytetracycline determination. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 14, p. 6074-6078, 2010.

22 WANG, H.; ZHAO, H.; QUAN, X. Gold modified microelectrode for direct tetracycline detection. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 313-319, 2012.

23 NOROUZI, P.; GANJALI, M. R.; DANESHGAR, P. FFT-Adsorptive voltammetric technique for pico-level determination of tetracycline in capsules at an Au microelectrode in flowing solutions. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 279-291, 2007.

24 CHAROENRAKS, T.; PALAHARN, S.; GRUDPAN, K.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection. **Talanta**, v. 64, n. 5, p. 1247-1252, 2004.

25 PALAHARN, S.; CHAROENRAKS, T.; WANGFUENKANAGUL, N.; GRUDPAN K.; CHAILAPAKUL, O. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, n. 1-2, p. 191-197, 2003.

26 GUO, G.; ZHAO, F.; XIAO, F.; ZENG, B. Voltammetric determination of tetracycline by using multi-wall carbon nanotube-ionic liquid film coated glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, n. 9, p. 1365-1372, 2009.

27 TAHERPOUR, A.; CHERAGHI, O. Theoretical study of structural relationships and electrochemical properties of supramolecular[tetracyclines].Cn complexes. **Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 17, n. 6, p. 636-651, 2009.

- 28 TREETPVITY, S.; PREECHAWORAPUN, A.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHUANUWATANAKUL, U.; EINAGA, Y.; CHAILPAKUL, O. Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1329-1335, 2006.
- 29 TREETPVITY, S.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; SATO, R.; CHAILPAKUL, O. Electroanalysis of tetracycline using nickel-implanted boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 5, p. 531-535, 2005.
- 30 WANGFUENGGANAGUL, N.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. **Talanta**, v. 64, p. 1183-1188, 2004.
- 31 OUNGPIPAT, W.; SOUTHWELLKEELY, P.; ALEXANDER, P. W. Flow-injection detection of tetracyclines by electrocatalytic oxidation at a nickel-modified glassy-carbon electrode. **Analyst**, v. 120, n. 5, p. 1559-1565, 1995.
- 32 GHANDOUR, M. A.; ALI, A. M. M. Adsorptive stripping Voltammetric determination of tetracycline and oxytetracycline. **Analytical Letters**, v. 24, n. 12, p. 2171-2186, 1991.
- 33 TANASE, I. G.; DAVID, I. G.; RADU, G. L.; IORGULESCU, E. E.; LITESCU, S. Electrochemical determination of minocycline in pharmaceutical preparations. **Analisis**, v. 26, n. 4, p. 175-179, 1998.
- 34 NI, Y.; LI, S.; KOKOT, S. Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in food. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1157-1163, 2011.
- 35 CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 938-943, 2012.
- 36 AGÜÍ, L.; GUZMAN, A.; PEDRERO, M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Voltammetric and flow injection determination of oxytetracycline residues in food samples using carbon fiber microelectrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 7, p. 601-607, 2003.
- 37 DELAHAY, P. **New instrumental methods in electrochemistry interscience**. New York: Interscience, 1954. 437 p.

38 ADAMS, R. N. **Electrochemistry at solid electrodes**. New York: Marcel Dekker, 1969. 402 p.

39 GALUS, Z. Mercury electrodes. In: KISSINGER, P. T., HEINEMAN, W. R., (Ed.) **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996, p.443-446.

40 ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.

41 KINOSHITA, K. **Carbon: electrochemical and physicochemical properties**. New York: John Wiley, 1988. 553 p.

42 PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.D.; KUBOTA, L.T. Trends in amperometric electrodes modification for electroanalysis applications. **Química Nova**, v. 25, p. 1012, 2002.

43 KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W.R. (Eds.). **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 986.

44 CAVALHEIRO, E. T. G.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M.; FATIBELLE-FILHO, O. Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds. **Bioanalytical Reviewers**, v. 4, p. 31-53, 2012.

45 TALLMAN, D. E.; PETERSEN, S. L. Composite electrode for electroanalysis: principles and applications. **Electroanalysis**, v. 2, p. 499-510, 1990.

46 KALCHER, K.; KAUFFMAN, J.M.; WANG, J.; SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electroanalytical analysis: a review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v. 7, p. 5-22, 1995.

47 MENDES, R. K. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos poliuretana/grafite**. 2002. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

48 CERVINI, P. **Aplicação de eletrodos compósitos à base de poliuretana-grafite**. 2006, 185f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

49 BAYER, W. G. **The ICI polyurethane book**. New York: John Wiley, 1987. p. 236.

50 BAYER, W. G. **The ICI polyurethane book**. New York: John Willey, 1987. 432 p.

51 CLARO-NETO, S. **Caracterizações físico-químicas de um poliuretano derivado de óleo de mamona utilizado para implantes ósseos**. 1997. 153f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

52 BRUINS, P. F. **Polyurethane technology**. New York: Interscience, 1969. 289 p.

53 MENDES, R. K.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material. **Talanta**, v. 57, p. 909-917, 2002.

54 MENDES, R. K.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of a graphite-castor oil polyurethane composite electrode for the determination of hidroquinone in photographic developers. **Talanta**, v. 68, p. 708-712, 2006.

55 CERVINI, P.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of hidroquinone using composite graphite-PU in FIA. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v. 2, p. 187-194, 2006.

56 CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of paracetamol at a graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 836-841, 2008.

57 CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector in the determination of atenolol. **Analytical Letters**, v. 41, n. 10, p. 1867-1877, 2008.

58 CERVINI, P.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode. **Talanta**, v. 72, p. 206-209, 2007.

59 CESARINO, I.; MARINO, G.; CAVALHEIRO, E. T. G. A novel graphite-polyurethane composite electrode modified with thiol-organofunctionalized sílica for the determination of copper ions in ethanol fuel. **Fuel**, v. 89, n. 8, p. 1883-1888, 2010.

60 CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of the analytical potentialities of a composite electrode modified with molecularly imprinted polymers. **Analytical Letters**, v. 42, n. 13, p. 1940-1957, 2009.



- 61 OLIVEIRA, A. C.; SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. Graphite-silicone rubber composite electrode: preparation and possibilities of analytical application. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 1043-1049, 2008.
- 62 SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G.; BRETT, C. M. A. Analytical potentialities of carbono nanotube/silicone rubber composite electrodes: determination of propranolol. **Electroanalysis**, v. 22, n. 23, p. 2776-2783, 2010.
- 63 CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-Araldite®: aplicações didáticas. **Química Nova**, v. 31, p. 2194-2198, 2008.
- 64 CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of atenolol in pharmaceutical formulations and environmental water samples at a graphite-epoxy composite electrode. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, n. 5, p. 561-570, 2012.
- 65 CALIXTO, C. M. F.; MENDES, R. K.; OLIVEIRA, A. C.; RAMOS, L. A.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Development of graphite-polymer composite as electrode materials. **Materials Research**, v. 10, p.109-114, 2007
- 66 SACIOTO, T. R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine at a graphite/polyurethane screen-printed composite electrode. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF ELECTROCHEMISTRY, 63., 2012, Praga. **Abstract...** Praga: International Society of Electrochemistry, 2012. CD-ROM.
- 67 SACIOTO, T. R.; CERVINI, P.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E. T. G., , **Tinta e processo para preparação de eletrodos impressos descartáveis à base de um compósito de grafite e poliuretana e eletrodo obtido pelo referido processo.** BR n. PI 1.104.355-5, 27 out. 2011.
- 68 GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D.; Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, p. 678-690, 2006.
- 69 DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para a determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.

70 VEGA, D.; AGÜÍ, L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at a multi-wall carbon nanotube modified electrodes. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 389, n. 3, p. 951-958, 2007.

71 BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 299 p.

72 REEUWIJK, H. J. E. M.; TJADEN, U. R. High-performance liquid chromatography of tetracyclines. **Journal of Chromatography**, v. 359, p. 339-350, 1986.

73 MILLER, J.; MILLER, J. **Statistics for analytical chemistry**, New York: Ellis Horwood, 1993. 233 p.

74 BERGAMINI, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M. V. B. Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/ glutaraldehyde film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 398-403, 2008.

75 ENCYCLOPEDIA of Science & Technology. New York: McGraw-Hill Book Company, 1982. v. 14, p. 297.

76 ENCYCLOPEDIA of Science & Technology. New York: McGraw-Hill Book Company, 1982. v. 8, p. 559.

77 SILVA, P. H. F. Leite. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3-5, 1997.

78 BARBOSA, A. M. J.; ARAÚJO, T. A.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. A simple method for electroanalytical determination of ceftiofur in UHT Milk samples using square-wave voltammetry technique. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 41, p. 249-255, 2011.

79 POSNER, A. C.; PRIGOT, A.; KONICOFF, N. G. Further observations on the use of tetracycline hydrochloride in prophylaxis and treatment of obstetric infection. **Antibiotics Annual 1954-1955**, p. 594-598, 1955.