



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

WILLIAM BARROS VELOSO

**DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS SOBRE ELETRODO  
IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM CARBON BLACK SUPER P EM  
SISTEMA BIA-AMP**

SÃO LUÍS - MA

2021

WILLIAM BARROS VELOSO

**DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS SOBRE ELETRODO  
IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM CARBON BLACK SUPER P EM  
SISTEMA BIA-AMP**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão (PPGQuim - UFMA), como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de concentração:** Química Analítica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luiza Maria F. Dantas.

SÃO LUÍS - MA

2021

Barros Veloso, William.

Determinação de antibióticos macrolídeos sobre eletrodo impresso de carbono modificado com carbon black Super P em sistema BIA-AMP / William Barros Veloso. - 2021.

81 p.

Orientador(a): Luiza Maria Ferreira Dantas.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Amostra ambiental. 2. Carbon black. 3. Eletrodo impresso. 4. Fármaco. 5. Macrolídeos. I. Ferreira Dantas, Luiza Maria. II. Título.

**WILLIAM BARROS VELOSO**

**DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS SOBRE ELETRODO  
IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM CARBON BLACK SUPER P EM  
SISTEMA BIA-AMP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 15/02/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Maria Ferreira Dantas (Orientador-UFMA)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Quintino da Rocha (UFMA)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz (UFU)

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

*Em especial...*

*Aos meus pais, aos quais eu devo tudo o que tenho e o que sou. Por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui. A eles eu dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Eu reconheço que é bem difícil expressar com palavras o quanto sou grato a todos que, de alguma forma, contribuíram para conclusão de mais essa etapa em minha vida. Foram dias de muito aprendizado, as vezes acompanhados de dificuldades, mas que nunca me fizeram pensar em desistir.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e por sempre estar comigo aonde quer que eu vá, me concedendo forças para prosseguir. Aos meus pais, Eunice e Expedito, e também aos meus irmãos, Douglas e Lorrana, os quais sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Amo vocês mais que tudo nessa vida.

Quero agradecer também à minha orientadora, professora Luiza Dantas, por ter me dado mais essa oportunidade e por todo apoio desde a minha graduação, e ao professor Iranaldo, que sempre esteve presente dando contribuições importantíssimas ao trabalho. Ambos têm sido minha inspiração como pessoa e profissional. Ao professor Marco e à IC Anny Thalia, que também contribuíram muito para conclusão deste trabalho.

Ao Laboratório de Eletroquímica (LELQ) na pessoa dos professores, Auro Tanaka, Roberto e Isaide, e aos caros amigos: José, Gilvana, Mesaque, Jhonilson, Antonio, Ilana, Patrick, e aos demais colegas que fazem parte do LELQ, muito obrigado por todo apoio diário.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPEMA pelo financiamento do projeto ao qual este trabalho está vinculando.

À UFMA e ao PPGQuim pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e por dedicarem seu tempo à leitura e avaliação deste trabalho, de forma a contribuir para seu aprimoramento.

A todos, o meu muito obrigado!

*“The mind that opens to a new idea never  
returns to its original size.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

Os macrolídeos são um grupo de medicamentos empregados no tratamento de doenças infecciosas, tanto na medicina humana quanto veterinária, estando atualmente entre os quatro antimicrobianos mais utilizados no mundo. A presença desses compostos em concentrações inadequadas pode desencadear uma série de problemas diretos, como reações alérgicas em indivíduos sensíveis, e de forma indireta, com o surgimento de cepas de bactérias resistentes. No presente trabalho foi investigado a potencialidade de aplicação do carbon black Super P como modificante para eletrodos impressos de carbono (SPCE's) em sistema de Análise por Injeção em Batelada com detecção Amperométrica (BIA-AMP) para determinação de quatro antibióticos macrolídeos (eritromicina, azitromicina, claritromicina e roxitromicina). Otimizações prévias do modificante mostraram que a concentração de carbon black e o volume do modificante ideais são, respectivamente,  $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $10 \mu\text{L}$ . O estudo voltamétrico inicial realizado com a eritromicina, composto protótipo para os demais, demonstrou as características do processo redox desta classe de antibióticos, além disso, por meio deste pôde-se definir o eletrólito de suporte (tampão Sörensen) e o pH do meio (7,8) ideais para o desenvolvimento do método. Voltamogramas hidrodinâmicos foram construídos com cada um dos antibióticos para definição do potencial de trabalho a ser utilizado nas medidas amperométricas. Foram otimizados os parâmetros relacionados ao sistema BIA, e os valores ideais obtidos para cada um deles foi: volume de injeção ( $100 \mu\text{L}$ ) e velocidade de dispensa ( $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ). Nessas condições, um estudo de repetibilidade foi realizado obtendo-se valor de DPR de  $0,983 \%$  ( $n = 25$ ) e uma frequência analítica estimada em  $125 \text{ injeções h}^{-1}$ . O método apresentou faixa linear de  $1 - 190 \mu\text{mol L}^{-1}$  para eritromicina ( $R = 0,999$ ), azitromicina ( $R = 0,998$ ) e roxitromicina ( $R = 0,999$ ) e de  $10 - 190 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a claritromicina ( $R = 0,998$ ). Dessa forma, o método foi aplicado na determinação desses quatro compostos em amostra ambiental de água, coletada em uma lagoa localizada no campus da Universidade Federal do Maranhão, e em amostras farmacêuticas. Testes de adição e recuperação foram realizados em ambas as amostras, nos quais se obteve valores de recuperação entre  $96,0$  e  $104,7\%$  para os testes realizados em amostra ambiental e entre  $95,6$  e  $105,1\%$  para os testes realizados em amostras de medicamentos, comprovando a boa exatidão do método, o qual, além disso, mostrou-se uma alternativa bastante atraente do ponto de vista econômico e de portabilidade.

**Palavras-chave:** Macrolídeos. BIA. Carbon black. Eletrodo impresso. Amostra ambiental. Fármaco.

## ABSTRACT

Macrolides are a group of drugs used in the treatment of infectious diseases, both in human and veterinary medicine. Currently these molecules are among the four most used antimicrobials in the world. The presence of these compounds in inadequate concentrations can be a trigger to a series of problems both directly and indirectly, such as allergic reactions in sensitive individuals and the emergence of resistant strains of bacteria. This work investigated the potential application of carbon black Super P as a modifier for screen-printed carbon electrodes (SPCE's) in a Batch Injection Analysis system with Amperometric detection (BIA-AMP) to determine four macrolide antibiotics (erythromycin, azithromycin, clarithromycin and roxithromycin). Previous modifier's parameters optimization have shown that the ideal carbon black concentration and suspension volume are, respectively, 7.0 mg mL<sup>-1</sup> and 10 µL. Initial voltammetric studies carried out with erythromycin, a prototype compound, demonstrated the redox process characteristics of this class of antibiotics. In addition, it was also possible to define the support electrolyte (Sørensen buffer) and pH of the medium (7.8) ideal for the development of the method. Hydrodynamic voltamograms respective to each antibiotics were constructed to define the work potential used in all amperometric measurements. BIA system parameters optimization showed ideal values respectively equal to: injection volume (100 µL) and dispensing speed (100 µL s<sup>-1</sup>). Under these conditions, a precision study was carried out to obtain the DPR value of 0.983% (n = 25) and an analytical frequency estimated at 125 injections per hour. The proposed method presented a linear range of 1 - 190 µmol L<sup>-1</sup> for erythromycin (R = 0.999), azithromycin (R = 0.998) and roxithromycin (R = 0.999) and 10 - 190 µmol L<sup>-1</sup> for clarithromycin (R = 0.998). Thus, the method was applied to determine these four compounds in a water sample, collected in a pond located on the Federal University of Maranhão campus, and in pharmaceutical samples. Addition-recovery studies were performed on both samples, in which recovery values between 96.0 and 104.7% were obtained for the tests carried out on an environmental sample and between 95.6 and 105.1% for the tests carried out on medicine samples, proving the good accuracy of the method, which proved to be a very attractive alternative from an economic and portability point of view.

**Keywords:** Macrolides. BIA. Carbon black. Screen-printed electrode. Environmental sample. Drug.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da eritromicina. ....	21
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da azitromicina. ....	23
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da claritromicina. ....	24
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da roxitromicina. ....	25
<b>Figura 5 - A:</b> Esquema de varredura de potencial em voltametria cíclica. <b>B:</b> Voltamogramas obtidos pela relação entre corrente e potencial. ....	28
<b>Figura 6 – (A)</b> Perturbação aplicada em AMP. <b>(B)</b> Resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial. ....	29
<b>Figura 7</b> - Etapas de injeção em Sistema BIA. ....	31
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da morfologia do CB em escala nanométrica. ....	33
<b>Figura 9</b> - Sistema eletroquímico utilizado para medidas voltamétricas. (1) computador, (2) potenciostato, (3) agitador magnético, (4) barra magnética, (5) eletrodo de trabalho, (6) eletrodo auxiliar e (7) eletrodo de referência. ....	37
<b>Figura 10</b> - Sistema de Análise por Injeção em Batelada como detecção Amperométrica (BIA-AMP). (1) célula BIA, (2) micropipeta eletrônica, (3) SPE, (4) eletrodo auxiliar de carbono, (5) eletrodo de trabalho de carbono modificado com CB Super P, (6) pseudoreferência de Ag. ...	38
<b>Figura 11</b> - Mapa da Universidade Federal do Maranhão campus São Luís. ....	40
<b>Figura 12</b> - Imagens obtidas por MEV para o (a) CBSP e para o (b) CBSP-CT. ....	41
<b>Figura 13</b> - Espectros Raman para o CBSP e CBSP-CT. ....	42
<b>Figura 14 – (A)</b> Voltamogramas cíclicos do $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $KCl$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre o GCE (—) e CBSP-CT/CGE (—). $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$ . <b>(B)</b> Dependência da $I_p$ com $\nu^{1/2}$ obtido a partir do estudo de variação da velocidade de varredura; <b>Inserido:</b> Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura ( $10 - 300 \text{ mV s}^{-1}$ ). ....	43
<b>Figura 15</b> - Diagrama de Nyquist para o (a) GCE e (b) CBSP-CT/GCE em $KCl$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença do par redox $[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . (c) Circuito eletroquímico proposto para o CBSP-CT/GCE. ....	45
<b>Figura 16</b> - Efeito da variação da (A) concentração ( $1 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e (B) do volume ( $5 - 15 \mu\text{L}$ ) do modificante CBSP-CT sobre a resposta eletroquímica da ERI ( $79,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de suporte: tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{step}}$ : $5,0 \text{ mV}$ ; Eletrodo: CBSP-CT/GCE. ....	46
<b>Figura 17</b> - Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (GCE) e modificado com CB Super P (CBSP-CT/GCE) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na ausência (linhas pontilhadas) e na	

presença (linhas contínuas) de ERI (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). <b>Inserido:</b> Voltamograma obtido apenas com o GCE. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ . .....	47
<b>Figura 18 - (A)</b> Voltamogramas de varredura linear obtidos com o CBSP-CT/GCE na presença de ERI (79,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão BR 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (4 – 10). <b>(B)</b> Dependência da corrente ( $I_p$ ) e potencial de pico ( $E_p$ ) com o pH do meio. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ . .....	48
<b>Figura 19 -</b> Reações propostas para oxidação da ERI. ....	49
<b>Figura 20 – (A)</b> Voltamogramas cíclicos do eletrodo CBSP-CT/GCE na presença de ERI 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura (5 – 300 $\text{mV s}^{-1}$ ). <b>(B)</b> Dependência da $I_p$ com a velocidade de varredura e com a raiz quadrada da velocidade de varredura (inserido). <b>(C)</b> Dependência do log da velocidade de varredura com o log da corrente de pico. ....	50
<b>Figura 21 -</b> Voltamogramas cíclicos sucessivos do eletrodo de CBSP-CT/GCE na ausência e na presença de ERI (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes eletrólitos de suporte ( <b>a:</b> tampão BR; <b>b:</b> tampão Sörensen; <b>c:</b> tampão McIlvaine; <b>d:</b> tampão fosfato; <b>e:</b> KCl) todos de concentração igual a 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,0). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ . ....	51
<b>Figura 22 -</b> Dependência da $I_p$ e $E_p$ em função do pH do meio. <b>Inserido:</b> Estudo de pH realizado pelo registro de voltamogramas do CBSP-CT/GCE na presença de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ERI em diferentes valores de pH. ES: tampão Sörensen 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ ; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ ; $n=3$ . .....	53
<b>Figura 23 -</b> Dependência da $I_p$ com a concentração do eletrólito de suporte. <b>Inserido:</b> voltamogramas do eletrodo CBSP-CT/GCE na presença de ERI 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do eletrólito de suporte (0,05 - 0,5 $\text{mol L}^{-1}$ ); ES: tampão Sörensen (pH 7,8) $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	53
<b>Figura 24 -</b> Voltamogramas cíclicos do CBSP-CT/GCE na ausência ( <b>—</b> ) e na presença ( <b>—</b> ) de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ERI, AZI, CLA e ROX. ES: tampão Sörensen 0,5 $\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,8); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	56
<b>Figura 25 -</b> Voltamogramas hidrodinâmicos dos antibióticos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX obtidos a partir dos valores de $I_p$ ( $n = 3$ ) em função dos potenciais aplicados no sistema BIA-AMP. ES: Tampão Sörensen 0,5 $\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,8); [macrolídeo] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrodo: CBSP-CT/SPE. ....	54
<b>Figura 26 –</b> Otimização dos parâmetros do sistema BIA: variação do <b>(A)</b> Volume de injeção (a – j: 10 – 200 $\mu\text{L}$ ) e <b>(B)</b> Velocidade de dispensa (a – i: 18,9 – 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ ) da micropipeta eletrônica. <b>Inseridos:</b> Amperogramas obtidos a partir de injeções de solução padrão de ERI 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ( $n = 3$ ). ES: tampão Sörensen 0,5 $\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,8). ....	55

**Figura 27** – (A) Amperograma obtido a partir de injeções sucessivas de ERI  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 25$ ) no sistema BIA.  $E_t = +0,85 \text{ V}$ ; ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . (B) Gráfico de pontos obtido a partir da variação de corrente em cada injeção.

..... 58

**Figura 28** - Estudo de reprodutibilidade para o CBSP-CT/SPE obtidos por meio da média de 10 injeções de solução de ERI ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ao longo de 10 dias.  $E_t = +0,85 \text{ V}$ ; ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . **Inseridos:** Amperogramas obtidos no 1º, 8º e 10º dia de análise. .... 59

**Figura 29** – Resposta amperométrica obtida em sistema BIA-AMP por meio de injeções ( $n = 3$ ) de soluções padrão de ERI (A1), AZI (B1), CLA (C1) e ROX (D1) em diferentes concentrações e curvas de calibração obtidas a partir dos valores de  $I_p$  nos sentidos crescente e decrescente de concentração para ERI (A2), AZI (B2), CLA (C2) e ROX (D2). ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . .... 60

**Figura 30** - Amperograma obtido por meio de injeções ( $n = 3$ ) em sistema BIA de soluções padrão de ERI (A1), AZI (B2), CLA (C1) e ROX (D1) em diferentes concentrações (a – e:  $10 - 160 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), amostra de água (s) e amostra fortificada em duas concentrações dos respectivos padrões ( $r_1$  e  $r_2$ ). ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . Curvas de calibração obtidas a partir dos valores de  $I_p$  nos sentidos crescente e decrescente de concentração de ERI (A2), AZI (B2), CLA (C2) e ROX (D2). .... 63

**Figura 31** - Amperograma obtido por meio da injeção ( $n = 3$ ) em sistema BIA de soluções padrão de AZI (A1) e CLA (A2) (a - e:  $10 - 160 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), soluções de amostra do fármaco ( $s_1$ ,  $s_2$  e  $s_3$ ) e amostra  $s_1$  fortificada em duas concentrações ( $r_1$  e  $r_2$ ). ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $E = +0,90 \text{ V}$ ;  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . Curvas de calibração obtidas a partir dos valores de  $I_p$  nos sentidos crescente e decrescente de concentração de AZI (A2) e CLA (B2). .... 66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Lista de reagentes utilizados e suas respectivas procedências. ....	35
<b>Tabela 2</b> - Posições das bandas D e G ( $\text{cm}^{-1}$ ) e razão $I_{(D)}/I_{(G)}$ obtidos para o CBSP e CBSP-CT. ....	42
<b>Tabela 3</b> - Valores de coeficiente angular equivalentes à curva de $I_{p_a}$ em função de $v^{1/2}$ e área eletroativa do GCE e CBSP-CT/GCE. ....	44
<b>Tabela 4</b> - Dados experimentais de potencial de pico ( $E_p$ ), potencial de meia-onda ( $E_{1/2}$ ) e corrente de pico ( $I_p$ ) obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos.....	57
<b>Tabela 5</b> - Valores de sensibilidade ( $a$ ), LD e LQ do método proposto.....	61
<b>Tabela 6</b> - Teste de adição e recuperação em amostra ambiental para ERI, AZI, CLA e ROX. ....	65
<b>Tabela 7</b> - Determinação de AZI e CLA em amostras farmacêuticas e teste de adição e recuperação.....	67
<b>Tabela 8</b> - Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos eletroanalíticos e em fluxo para determinação de ERI, AZI, CLA e ROX reportados na literatura.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**AMP** – Amperometria

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AZI** – Azitromicina

**BIA** – Análise por injeção em batelada, do inglês, “*Batch Injection Analysis*”

**CBSP** – Carbon Black Super P

**CLA** – Claritromicina

**CT** – Quitosana, do inglês, “*Chitosan*”

**DMF** – Dimetilformamida

**EA** – Eletrodo auxiliar

**E<sub>i</sub>** – Potencial de inversão

**ER** – Eletrodo de referência

**ERI** – Eritromicina

**ES** – Eletrólito de suporte

**ET** – Eletrodo de trabalho

**E<sub>0</sub>** – Potencial inicial

**E<sub>pa</sub>** – Potencial de pico anódico

**E<sub>pc</sub>** – Potencial de pico catódico

**FA** – Frequência analítica

**FIA** – Análise por injeção em fluxo, do inglês, “*Flow Injection Analysis*”

**GCE** – Eletrodo de carbono vítreo, do inglês, “*Glassy Carbon Electrode*”

**I<sub>pa</sub>** – Corrente de pico anódico

**I<sub>pc</sub>** – Corrente de pico catódico

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada

**k<sup>0</sup>** – Constante heterogênea de transferência de elétrons

**LD** – Limite de detecção

**LELQ** – Laboratório de Eletroquímica da UFMA

**LQ** – Limite de quantificação

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ROX** – Roxitromicina

**SPE** – Eletrodo impresso, do inglês, “*Screen-printed Electrode*”

**VC** – Voltametria cíclica

**VOQ** – Voltametria de onda quadrada

**VPD** – Voltametria de pulso diferencial

$\Phi$  – Diâmetro

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>20</b>
2.1. ANTIBIÓTICOS MACROLÍDEOS .....	20
2.1.1. <i>Eritromicina (ERI)</i> .....	21
2.1.2. <i>Azitromicina (AZI)</i> .....	22
2.1.3. <i>Claritromicina (CLA)</i> .....	23
2.1.4. <i>Roxitromicina (ROX)</i> .....	24
2.1.5. <i>Determinação dos antibióticos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX</i> .....	25
2.2. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS .....	27
2.2.1. <i>Voltametria Cíclica</i> .....	27
2.2.2. <i>Amperometria</i> .....	29
2.3. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA (BIA).....	30
2.4. NANOMATERIAIS DE CARBONO.....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
4.1. INSTRUMENTAÇÃO .....	35
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES .....	35
4.3. PREPARO DO ELETRODO MODIFICADO COM CARBON BLACK SUPER P .....	36
4.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS .....	37

4.4.1. Análises Voltamétricas.....	37
4.4.2. Sistema BIA .....	38
4.4.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	39
4.5. OBTENÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS .....	39
4.5.1. Amostra ambiental .....	39
4.5.2. Amostras de fármacos .....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>41</b>
5.1. ESTUDO DO MODIFICANTE CBSP-CT.....	41
5.1.1. Caracterização física .....	41
5.1.2. Caracterização eletroquímica.....	43
5.1.3. Otimização do modificante CBSP-CT.....	45
5.2. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA ERITROMICINA (ERI) .....	46
5.2.1. Estudo de pH.....	47
5.2.2. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....	49
5.2.3. Estudo do eletrólito de suporte .....	51
5.3. DETERMINAÇÃO DE MACROLÍDEOS POR BIA-AMP .....	54
5.3.1. Otimização de parâmetros BIA.....	55
5.4. PERFIL VOLTAMÉTRICO DOS MACROLÍDEOS ERI, AZI, CLA E ROX.....	56
5.4.1. Repetibilidade.....	57
5.4.2. Reprodutibilidade.....	58
5.4.3. Linearidade .....	59
5.4.4. Determinação dos macrolídeos em amostra ambiental.....	62
5.4.5. Determinação em amostras de fármacos .....	65
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos consistem em um grupo de medicamentos empregados na medicina humana e veterinária, capazes de prevenir ou tratar doenças causadas por infecções microbianas. Porém, a utilização indiscriminada desses compostos pode causar graves efeitos adversos aos usuários, bem como um aumento da presença dessas substâncias no meio ambiente [1]. Dentre os problemas causados por isso, temos o desenvolvimento de resistência bacteriana devido, principalmente, à exposição contínua desses microrganismos à baixas concentrações de antibióticos, o que tem despertado uma maior conscientização em relação à poluição ambiental causada por esses compostos [2,3].

Antibióticos macrolídeos são uma importante classe de antimicrobianos empregados em diversos tratamentos clínicos há mais de 50 anos. São moléculas lipofílicas constituídas por um grande anel lactona com 14 – 16 átomos, ao qual um ou mais amino açúcares estão ligados por meio de ligação glicosídica [4,5]. Partindo-se da eritromicina (ERI), o macrolídeo protótipo, outros compostos foram sintetizados e estão disponíveis clinicamente, dentre eles: azitromicina (AZI), claritromicina (CLA) e roxitromicina (ROX). Esses compostos, além de apresentarem atividade antimicrobiana, têm sido empregados nas mais diversas áreas da medicina como na neurologia, gastroenterologia, reumatologia, cardiologia, oncologia, dentre outras [5,6].

Dentre os métodos disponíveis na literatura para determinação desses quatro antibióticos em matrizes ambientais e farmacêuticas, ocupam um lugar de destaque os métodos cromatográficos que, embora apresentem excelentes características como sensibilidade e seletividade, possui um demérito relacionado à questão ambiental, por haver a necessidade da utilização de uma grande quantidade de solventes orgânicos caros e muitas vezes tóxicos, causando fortes prejuízos ao meio ambiente [7]. Diante disso, as técnicas eletroanalíticas apresentam-se como uma poderosa ferramenta para quantificação desses compostos por serem simples, sensíveis, de baixo custo e, em particular, permitem a possibilidade da realização de análise “*in situ*” com tratamentos básicos de amostra [8]. Essas características são potencializadas com a utilização de materiais capazes de catalisar reações químicas na interface eletrodo/solução, dentre esses materiais destacam-se nanoestruturas à base de carbono [9].

Desde a descoberta dos nanomateriais de carbono, a tecnologia em escala nanométrica tem impulsionado vários ramos da ciência, dentre eles a eletroquímica. Esses materiais possuem características que favorecem o desenvolvimento de novos sensores eletroquímico, tais como: elevada área superficial, facilidade de funcionalidade e rápida transferência de elétrons. Essas

características agregam aos sensores eletroquímicos propriedades de grande interesse como, elevada sensibilidade e seletividade, robustez e capacidade de catalisar processos redox [10,11]. Um tipo de nanomaterial de carbono antigo, mas que só recentemente tem sido empregado na detecção de analitos em solução é o carbon black (CB), o qual agrega às propriedades dos nanomateriais de carbono o fato de este ser um material de baixo custo, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baratos [12,13].

Sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA) associado a técnicas de detecção amperométrica permite, sob condições hidrodinâmicas, a realização de medidas com elevadas sensibilidade e rapidez na execução [14]. Além disso, a utilização de eletrodos impressos, os chamados “*screen-printed electrodes*” (SPE’s), agregam recursos adicionais ao sistema, principalmente em relação ao custo de análise, simplicidade e robustez [15]. A utilização de pequenos volumes de amostra, em geral de 20 a 100  $\mu\text{L}$ , dificultam a contaminação do eletrodo de trabalho, permitindo a realização de mais de 150 injeções sem que haja a necessidade de troca do eletrólito de suporte ou de manuseio dos eletrodos [16].

Diante disso, este trabalho visa o desenvolvimento de um método eletroanalítico para quantificação de antibióticos macrolídeos em amostras ambientais e farmacêuticas, empregando eletrodo impresso modificado com carbon black Super P, o qual será acoplado a um sistema de Análise por Injeção em Batelada.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Antibióticos Macrolídeos

Os antibióticos constituem uma classe de substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética, que são capazes de intervir sob processos vitais de outros microrganismos, mesmo que estes estejam em pequenas concentrações [17]. A baixa biodegradabilidade e a letalidade sobre bactérias essenciais fazem com que esse grupo de compostos sejam considerados os mais problemáticos ao meio ambiente [18]. Um panorama a respeito do efeito causado ao meio ambiente pela presença de antibióticos foi apresentado por Kemper et. al., 2008 [19].

Dentre as diversas classes de antibióticos destacam-se os macrolídeos, compostos extremamente potentes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O termo macrolídeo é derivado de duas palavras: ‘macro’ (grande) e ‘olideo’ (lactona) [20]. Esses compostos apresentam em sua estrutura química um anel lactona macrocíclico com 14, 15 ou 16 átomos. Além disso, esse grupo encontra-se ligado, por meio de ligações glicosídicas, a desoxiaçúcares como, por exemplo, desosamina, cladinose, micaminose, micarose e micosamina. Essas características estruturais dos macrolídeos lhes atribuem algumas propriedades como lipofilicidade e, em sua maioria, caráter básico [21,22].

Os macrolídeos podem ser divididos em três grupos, de acordo com o número átomos de carbono que apresentam no anel lactona. No primeiro grupo estão aqueles que possuem 14 átomos, pertencem a este grupo a eritromicina (ERI), a claritromicina (CLA) e a roxitromicina (ROX). No segundo grupo está a azitromicina (AZI), macrolídeo que apresenta 15 átomos no anel lactona. E no terceiro grupo estão a espiramicina (ESP), josamicina (JOS), tilmicosina (TIL) e tilosina (TILO), os quais possuem 16 átomos no grupo lactona [22].

A atuação dos antibióticos macrolídeos baseia-se no fato de que esses, em geral, inibem a síntese proteica bacteriana (efeito bacteriostático), fazendo com que proteínas essenciais ao crescimento destes microrganismos deixem de ser sintetizadas, impedindo sua proliferação. Estudos comprovam que além da atividade antimicrobiana, alguns macrolídeos apresentam propriedades antivirais e anti-inflamatórias [23–25].

A eficiência dessa classe de antibióticos no controle de bactérias e por sua atividade anti-inflamatória faz com que esse grupo de medicamentos seja amplamente utilizado na medicina humana e veterinária, sendo prescritos no tratamento de doenças como: infecções no trato

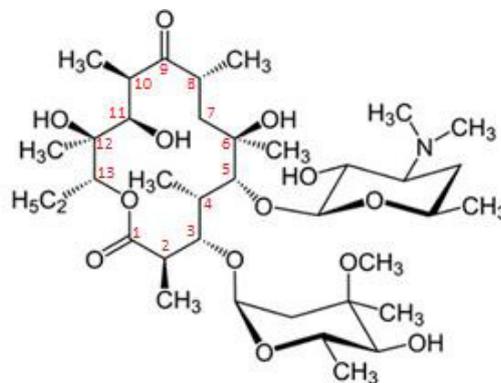
respiratório, tosse convulsa, legionelose, asma, doenças sexualmente transmissíveis, entre outras [25–27]. Dentre todos os antibióticos macrolídeos, os mais utilizados na medicina humana são a eritromicina (ERI), a azitromicina (AZI), a claritromicina (CLA) e a roxitromicina (ROX) [28,29].

Por apresentarem efeito anti-inflamatório e imunomodulador, antibióticos macrolídeos como AZI, CLA e ERI têm sido propostos para tratar infecções respiratórias virais que apresentam uma base inflamatória, incluindo a COVID-19, doença cujo patógeno responsável é o SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2) [30]. Até o presente momento não há evidências suficientes que levem à uma prescrição em massa de azitromicina, bem como de nenhum dos demais antibióticos macrolídeos, para tratamento da COVID-19, estudos mais estruturados devem ser realizados em relação à sua eficácia e aos riscos causados pelo uso desses medicamentos [31].

### 2.1.1. Eritromicina (ERI)

Sendo o primeiro antibiótico pertencente à classe dos macrolídeos a ser identificado e disponibilizado comercialmente, a ERI (Figura 1) foi isolada da cepa *Streptomyces erythreus* no ano de 1952. Esse composto é a principal alternativa às penicilinas, no caso de pacientes que apresentem reações alérgicas a este grupo de medicamentos [27,32,33].

**Figura 1** - Estrutura química da eritromicina.



Fonte: Habibi, B. et al. (2019)

A ERI, cuja nomenclatura de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é (3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 11R, 12R, 13S, 14R) -6 - {[ (2S, 3R, 4S, 6R) -4 - (dimetilamino) -3-hidroxi-6-metiloxano -2-il] oxi } -14-etil-7,12,13-tri-hidroxi-4 {[ (2R, 4R, 5S, 6S) -5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il] oxi } -3,5,7,9,11,13-hexametiloxaciclotetradecano-2,10-diona, possui fórmula molecular C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub>, (733,93 g mol<sup>-1</sup>) e sua estrutura química é Veloso, William B. (2021)

formada por um anel lactona, com 14 membros e 10 centros quirais (assimétricos), ligado à duas moléculas de açúcar, como pode ser observado na Figura 1. Essas características estruturais atribuem à ERI algumas propriedades químicas e físicas, tais como: baixa solubilidade em água ( $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), solubilidade em solventes orgânicos; possui caráter básico (pKa igual 8,88) pela presença da amina terciária; é altamente instável em meio ácido, o que muitas vezes provoca perda de atividade antimicrobiana e diminuição de sua biodisponibilidade [7,34–36].

A capacidade desses compostos de impedir a síntese proteica nos ribossomos bacterianos faz com que a ERI esteja na lista dos medicamentos mais eficazes, seguros e necessários aos sistemas de saúde de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) [37,38]. Esta têm sido amplamente utilizada no tratamento de doenças como infecções no trato respiratório e pele [37], infecções sexualmente transmissíveis como clamídia e sífilis [34], além de sua ampla utilização na medicina veterinária, principalmente na prevenção de infecções e auxílio no crescimento de aves e peixes [39].

A administração de ERI via oral faz com que esta, ao entrar em contato com o suco gástrico, sofra uma reação de desidratação imediatamente, levando à conversão em seu produto de degradação (ERI desidratada) causando a perda de sua propriedade antimicrobiana. Essa interação, entre o grupo OH ligado ao C<sub>6</sub> e o O ligado ao C<sub>9</sub> da molécula de ERI, leva à formação do enoléter e do espirocetal, os quais não possuem atividade antibacteriana [40,41].

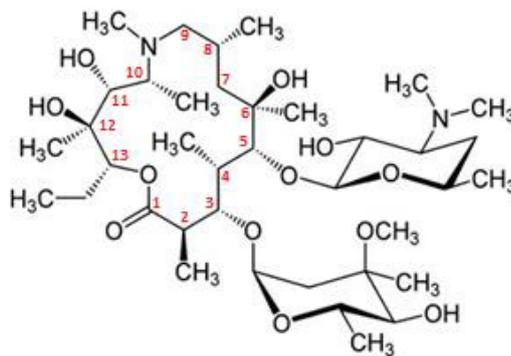
Essa instabilidade por parte da ERI levou ao desenvolvimento de seus congêneres semissintéticos, sendo eles: azitromicina (AZI), claritromicina (CLA) e roxitromicina (ROX). As mudanças estruturais na molécula de ERI resultaram em compostos mais estáveis, com maior duração de efeito e melhor atividade antibacteriana [4].

### **2.1.2. Azitromicina (AZI)**

A AZI pertence ao segundo grupo dos macrolídeos por apresentar 15 átomos no anel lactona, com nomenclatura IUPAC sendo (2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R)-2-etil-3,4,10-trihidroxi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-15-oxo-11-[[3,4,6-trideoxi-3-(dimetilamino)-β-D-xilo-hexopiranosil] oxo]-1-oxa-6-azaciclopentadec-13-il-2,6-didesoxi-3-C-metil-3-O-metil-α-L-ribo-hexopiranosídeo, fórmula molecular C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> (748,99 g mol<sup>-1</sup>), é considerado um macrólido de “geração avançada” quando comparada à ERI [7].

A AZI difere-se quimicamente da ERI pela ausência do oxigênio do grupo ceto na posição C<sub>9</sub> e por apresentar na posição C<sub>10</sub> um grupo amino substituído com um radical metil, como apresentado na Figura 2 [42]. Essa conformação estrutural atribuiu à AZI atividade antibacteriana 15 vezes maior do que a ERI, além disso, melhorou a estabilidade em meio ácido, bem como aumentou a biodisponibilidade, diminuindo a necessidade de maiores dosagens, e agregando melhor efeito terapêutico [42,43].

**Figura 2** - Estrutura química da azitromicina.



Fonte: Habibi, B. et al. (2019)

A AZI atua nos organismos impedindo o crescimento bacteriano por meio do bloqueio da síntese de proteínas essenciais à vida desses microrganismos, aliviando inflamações e dores. Medicamentos à base de AZI têm sido empregados no tratamento de infecções no trato respiratório superior e inferior, no sistema urinário, infecções intestinais, na pele e sexualmente transmissíveis [43,44].

Após ingestão, a AZI permanece no organismo por um período considerado longo, com tempo de meia-vida plasmática de aproximadamente 68 horas. Altos níveis de concentração se acumulam nos tecidos oculares e cerca de 10% de todo o antibiótico administrado é excretado na urina em sua forma inalterada [45].

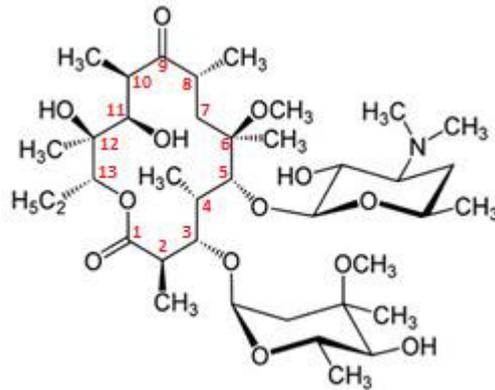
### 2.1.3. Claritromicina (CLA)

A CLA, assim como a ERI, pertence ao grupo 1 dos macrolídeos, ou seja, aqueles que apresentam 14 átomos no anel lactona. Tem como nomenclatura oficial pela IUPAC (3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 11R, 12R, 13S, 14R) -6-[[[(2S, 3R, 4S, 6R) -4-(dimetilamino) -3-hidroxi-6-metilte- trahidro-2H-piran-2-il] oxi] -14-etil-12,13-dihidroxi-4-[[[(2R, 4R, 5S, 6S)-5-hidroxi-4-me-toxi-4,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]oxi] -7-metoxi-3,5,7,9,11,13 hexametiloxaclo-tetradecano-2,10-diona e fórmula molecular C<sub>38</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>13</sub> (747,96 g mol<sup>-1</sup>) [7].

Veloso, William B. (2021)

A síntese da CLA é realizada a partir da molécula de ERI, por meio da substituição do grupo hidroxila por um grupo metoxi na posição C<sub>6</sub> do anel lactona, essa modificação pode ser observada na estrutura química da CLA representada na Figura 3 [4,7].

**Figura 3** - Estrutura química da claritromicina.



Fonte: Habibi, B. et al. (2019)

Diferentemente da ERI, a CLA é estável em meio ácido e apresenta tempo de meia-vida relativamente curto (3-4h) compatível com administração duas vezes ao dia, além disso a biodisponibilidade da CLA é mais que o dobro se comparada com a ERI [33,46]. É amplamente empregada no tratamento de infecções respiratórias, de pele e em tecidos moles, além disso auxilia no tratamento de infecções em pacientes HIV positivos e, em combinação com métodos convencionais, atua no tratamento de diversos tumores [47,48].

#### 2.1.4. Roxitromicina (ROX)

Assim como a ERI e a CLA, a ROX pertence ao grupo de macrolídeos que apresentam um anel lactona formado por 14 átomos (grupo 1). Sua nomenclatura de acordo com a IUPAC é (3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 10E, 11S, 12R, 13S, 14R) -6 - {[ (2S, 3R, 4S, 6R) -4- (dimetilamino) -3-hidro- xy- 6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il] oxi} -14-etil-7,12,13-trihidroxi-4- {[ (2R, 4R, 5S, 6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il] oxi} -10- {[ (2-metoxietoxi) metoxi] imino} -3,5,7,9,11,13-hexametiloxaci-clotradecano-2-1, sendo sua fórmula molecular C<sub>41</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub> (837,06 g mol<sup>-1</sup>). Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 4 [4].

A estrutura química desse antibiótico é semelhante à estrutura da ERI, havendo apenas uma modificação na qual adicionou-se uma cadeia lateral de eteroxima na posição C<sub>9</sub>, a fim de agregar maior estabilidade ao composto e impedir que este perca sua atividade antimicrobiana, quando em meio ácido [4,49]. Uma das principais vantagens da ROX frente aos demais

Veloso, William B. (2021)

antibióticos macrolídeos é que este atinge concentrações intracelular mais elevadas, o que permite intervalos posológicos mais prolongados [50].

**Figura 4** - Estrutura química da roxitromicina.



Fonte: Vajdle, O. et al. (2017)

A ROX é amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, como por exemplo, infecções no trato respiratório superior e inferior, doenças sexualmente transmissíveis, infecções bacterianas no estômago, úlceras intestinais e infecções na gengiva [51–53].

### **2.1.5. Determinação dos antibióticos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX**

Nas últimas duas décadas houve um crescimento no consumo de medicamentos, principalmente de antibióticos, o que tem causado preocupação em relação à proteção ambiental e à saúde humana em nível global [54]. Os macrolídeos estão atualmente entre os quatro medicamentos antimicrobianos mais utilizados no mundo, e por atuarem no tratamento de uma ampla gama de infecções na medicina humana e veterinária, merecem cuidados especiais, pois a presença desses compostos em concentrações inadequadas podem desencadear uma série de problemas diretos, como reações alérgicas em indivíduos sensíveis, e de forma indireta, com o surgimento de cepas de bactérias resistentes [55,56].

Diante disso, uma série de métodos clássicos e modernos são empregados na determinação de antibióticos macrolídeos tanto pela indústria farmacêutica, para garantia do controle de qualidade desses medicamentos, quanto por agências de fiscalização ambiental e de produtos alimentícios, uma vez que esses medicamentos são eliminados nos esgotos em sua forma metabolizada e inalterada através de excreções humanas e de animais, bem como pela indústria de produção desses medicamentos [7,54].

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o método oficial para determinação de ERI em amostras farmacêuticas baseia-se em um ensaio microbiológico por difusão em ágar [57], ensaios biológicos também foram utilizados para determinação de ERI em medicamentos veterinários [58] e plasma humano [59]. Métodos espectrofotométricos [60], cromatográficos [61,62], por eletroforese capilar [63], por espectroscopia na região do infravermelho [64] e eletroquímicos [39,47,65] também são reportados na literatura para determinação de ERI em amostras comerciais de fármaco e biológicas.

O método oficial para determinação de AZI, tanto em cápsulas quanto em pó para suspensão oral desse medicamento, descrito pela Farmacopeia Brasileira, baseia-se em um ensaio microbiológico por difusão em ágar [57]. Métodos espectrofotométricos [66–68] e cromatográficos [69–71] também são amplamente descritos na literatura para determinação de AZI em fármacos e amostras biológicas. Dentre os métodos eletroquímicos utilizados para essa finalidade, destacam-se aqueles empregando eletrodos modificados com nanomateriais, pois estes apresentaram boa seletividade, elevada sensibilidade e estabilidade quando comparados aos demais [72,73]. Sensores eletroquímicos construídos a partir de polímeros molecularmente impressos (MIP's) também têm se mostrado eficiente na determinação de AZI em amostras biológicas e ambientais [45,74,75].

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (HPLC-UV) é o método oficial descrito pela Farmacopeia Brasileira para determinação de CLA em amostras deste fármaco tanto em comprimido quanto em suspensão oral [57]. Esses métodos também são reportados na literatura para determinação de CLA em amostras de plasma [76] e sangue [77], esse último empregando Espectrômetro de Massas como detector, porém é preferível a utilização de detectores eletroquímicos na determinação em amostras com baixa concentração de CLA [7]. Métodos eletroquímicos também estão disponíveis na literatura para determinação analítica desse antibiótico em diversas matrizes [4,78].

Não há na Farmacopeia Brasileira, até o presente momento, método oficialmente regulamentado pela ANVISA para determinação de ROX em amostras de medicamentos, porém alguns métodos são descritos na literatura para determinação desse composto, tanto em amostras de fármacos quanto em diversas outras matrizes, dentre os principais métodos estão: ensaios microbiológicos [5]; métodos eletroquímicos, explorando a oxidação da ROX sobre eletrodos de carbono vítreo modificado [79], ouro limpo [80] e modificado [81]; além dos

métodos cromatográficos desenvolvidos para determinação deste antibiótico em amostras de tecido muscular [82] e plasma de aves [50].

## 2.2. Técnicas Eletroanalíticas

A Eletroanalítica compreende um ramo da Química que se encontra na interface entre ciência analítica e eletroquímica, sendo esta última, de modo mais abrangente, o estudo de reações que envolvem corrente e potencial elétrico. Ela abrange o desenvolvimento, aplicação, validação, entendimento e caracterização de métodos de análise química explorando fenômenos eletroquímicos [83].

As técnicas eletroanalíticas fornecem uma série de informações intrínsecas dos compostos analisados, principalmente no que se refere às características dos processos de oxirredução e mecanismos de transferência de elétrons, possibilitando a quantificação de espécies com elevada sensibilidade. O campo de aplicação dessas técnicas é extremamente amplo, principalmente em relação a medidas de concentração de espécies eletroativas empregando sensores amperométricos, voltamétricos e potenciométricos [84].

Diante disso, as técnicas eletroanalíticas apresentam-se como uma ótima alternativa para análises de compostos farmacêuticos, pois além de serem simples, de baixo custo e portáteis, apresentam elevada sensibilidade e baixos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), além de permitirem a realização de análises em amostras sem que haja a necessidade de pré-tratamento, e quando necessário trata-se de procedimentos simples [85].

Ao longo do tempo, o desenvolvimento de novas instrumentações analíticas vem acompanhado de um crescimento na utilização das técnicas eletroanalíticas como sistema de detecção, como por exemplo: voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ) e amperometria (AMP). Essas técnicas, em sua maioria, apresentam resultados comparáveis aos de sistemas cromatográficos com detecção espectrofotométrica [86].

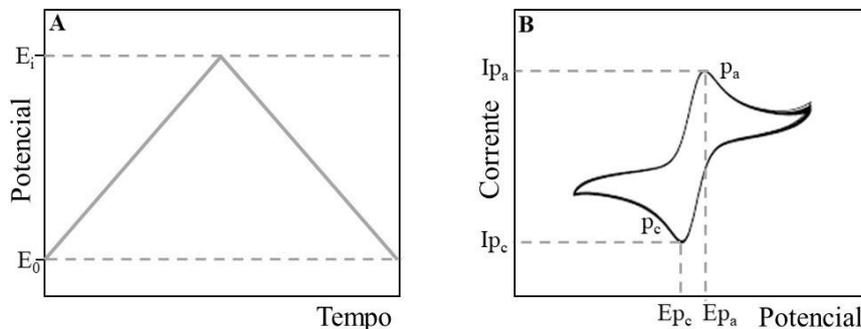
### 2.2.1. Voltametria Cíclica

A técnica de Voltametria Cíclica (VC), embora não seja empregada com frequência em análises quantitativas, é amplamente utilizada quando se deseja conhecer o comportamento eletroquímico do(s) analito(s) de interesse. Por meio dela é possível estudar reações redox de forma mais detalhada, detectar possíveis intermediários de reações, acompanhar reações

envolvendo formação de produtos de adsorção e caracterizar superfícies de eletrodos modificados [85,87].

A execução da técnica consiste na aplicação de potenciais elétricos ao eletrodo de trabalho que variam com o tempo dentro de uma faixa pré-estabelecida, essa aplicação ocorre no formato de onda triangular, como mostrado na Figura 5A. Variando de forma linear, a varredura de potencial parte de um ponto  $E_0$  chegando até um potencial de inversão ( $E_i$ ), processo denominado de varredura direta. Posteriormente a varredura se desenvolve no sentido inverso, até atingir um potencial final, que pode ou não coincidir com o  $E_0$ , processo denominado varredura inversa [85]. A definição da faixa de potencial a ser utilizada deve compreender o(s) potencial(is) de oxidação e/ou de redução dos analitos em estudo e o sentido da varredura pode ser anódico ou catódico.

**Figura 5 - A:** Esquema de varredura de potencial em voltametria cíclica. **B:** Voltamogramas obtidos pela relação entre corrente e potencial.



Fonte: autor

A varredura anódica, na qual se parte de potenciais menos positivos para mais positivos, favorecem a oxidação de espécies próximas à superfície do eletrodo de trabalho (camada de difusão), e conseqüentemente, um aumento de corrente no sistema, o valor máximo de corrente, neste caso, é denominado corrente de pico anódico ( $I_{p_a}$ ) e o potencial neste ponto é denominado potencial de pico anódico ( $E_{p_a}$ ). A varredura catódica, onde se parte de potenciais mais positivos para menos positivos, favorece a redução de espécies na camada de difusão, e conseqüentemente uma diminuição da corrente total do sistema, o valor mínimo de corrente é denominado corrente de pico catódico ( $I_{p_c}$ ), e o potencial nesse ponto é denominado potencial de pico catódico ( $E_{p_c}$ ), como pode ser observado na Figura 5B [85].

Relações entre os principais parâmetros da VC podem trazer informações qualitativas da reação eletroquímica em questão, como por exemplo, a razão entre  $I_{p_a}$  e  $I_{p_c}$  e a diferença de

$E_{pa}$  e  $E_{pc}$  comprovam a reversibilidade ou irreversibilidade da reação. Informações quantitativas também podem ser obtidas por meio dessa técnica, tais como: número de elétrons envolvidos na reação ( $n$ ), área ativa do eletrodo de trabalho ( $A$ ), coeficiente de difusão das espécies envolvidas na reação ( $D$ ). Isso é possível estabelecendo-se a relação linear entre valores de  $i_p$  em diferentes velocidades de varredura ( $v$ ), à uma concentração conhecida ( $c$ ), de acordo com equação de Randles-Sevcik [85]:

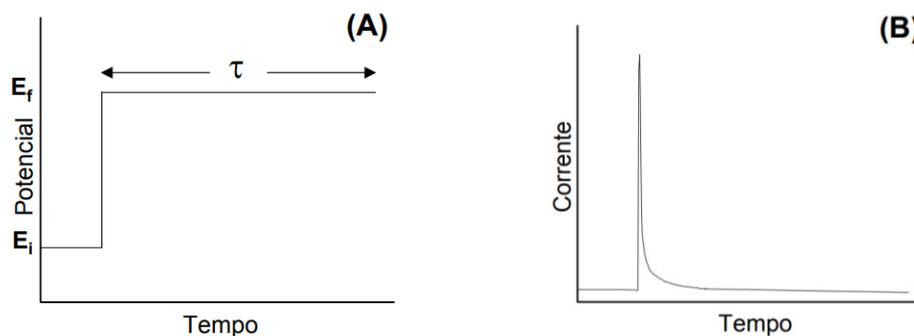
$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação (1)}$$

As técnicas de varredura de potencial, como VC, são normalmente empregadas em sistemas estacionários, mas também pode ser utilizada em sistemas hidrodinâmicos. Seu principal uso tem sido na identificação de espécies presentes na solução e em análises semiquantitativas de velocidades de reação [84].

### 2.2.2. Amperometria

A amperometria (AMP) pode ser definida como um experimento voltamétrico onde se trabalha em potencial constante [84]. Essa técnica consiste na aplicação de um único degrau de potencial, como pode ser observado na Figura 6A. A corrente medida atinge um determinado valor máximo proporcional à concentração do analito, caindo posteriormente com o tempo (Figura 6B) [88].

**Figura 6** – (A) Perturbação aplicada em AMP. (B) Resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.



Fonte: Quintino (2003).

A AMP tem sido amplamente utilizada em eletroanálises, principalmente em aplicações envolvendo sensores amperométricos. Esses dispositivos apresentam maior sensibilidade quando comparados com alguns detectores voltamétricos, isso porque a corrente residual desenvolvida no sistema apresenta valores extremamente baixos, pois uma vez que o potencial

do eletrodo de trabalho é mantido fixo, a corrente capacitiva torna-se constante, virtualmente igual a zero [84].

Essa técnica torna-se ainda mais atrativa quando associada a sistemas que empregam análises em alta velocidade como Análise por Injeção em Fluxo (FIA – do inglês *Flow Injection Analysis*) e Análise por Injeção em Batelada (BIA – do inglês *Batch Injection Analysis*). Nesse caso, o sinal analítico baseia-se em picos transientes de corrente proporcionais à concentração do analito. Em análises envolvendo AMP associada a sistemas hidrodinâmicos é necessário a realização de um estudo prévio utilizando técnicas de análise por varredura de potencial, como por exemplo VC, para definição do potencial de oxidação ou redução adequado ao sistema [88].

Uma limitação dessa técnica é a baixa seletividade, principalmente ao se trabalhar com potenciais extremamente positivos ou negativos, pois em tais situações será promovida a oxidação ou a redução, respectivamente, de uma grande quantidade de espécies eletroativas que possam estar presentes nas amostras analisadas. Esse problema pode ser minimizado desenvolvendo-se alternativas de análise em potenciais mais próximos de zero, como por exemplo, a utilização de modificantes no eletrodo de trabalho, que possam catalisar a reação eletroquímica.

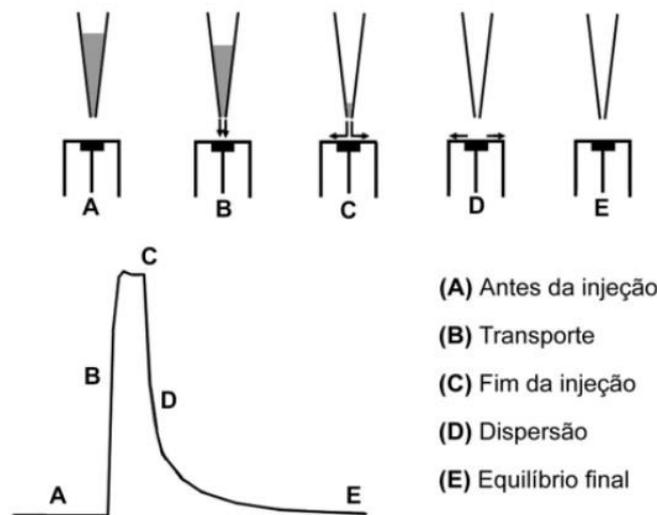
### **2.3. Análise por Injeção em Batelada (BIA)**

O sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA) foi desenvolvido em 1991 por Joseph Wang e Ziad Taha como uma variação dos Sistemas de Análise em Fluxo (FIA) [88]. No sistema BIA as alíquotas de soluções padrão ou amostras são injetadas com o auxílio de uma micropipeta e levados até à superfície do detector, o qual permanece imerso em um grande volume da solução eletrolítica denominada “branco” em agitação mecânica. Por se tratar de um sistema de detecção eletroquímica, o detector consiste em um eletrodo, por meio do qual se aplica perturbações elétricas ao sistema [89].

O sinal registrado pelo detector em sistemas BIA consiste em picos transientes, e a magnitude do sinal reflete a concentração do analito injetado na superfície do eletrodo. Essas características atribuem ao sistema BIA desempenho analítico semelhante ao sistema FIA, como: alta velocidade, sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade. A ausência da necessidade de utilização de bombas e tubulações, faz com que o sistema BIA seja ainda mais simples e de fácil portabilidade quando comparado a sistemas FIA [89].

A aquisição do sinal analítico no processo de injeção pode ser dividida em cinco etapas, como apresentado na Figura 7. Na etapa imediatamente antes da injeção (A), observa-se um valor de corrente constante, resultado da ausência de espécies eletroativas no meio, e conseqüentemente, a ausência de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. No exato momento da injeção da substância eletroativa, etapa denominada de transporte (B), observa-se uma variação repentina da corrente, fenômeno decorrente da oxidação ou redução dessa espécie. Um valor de corrente máximo é atingido ao término da injeção (etapa C), e esse valor é proporcional à concentração da espécie eletroativa. Após essa etapa há uma queda gradual do sinal analítico, devido à mudança do processo de transferência de massa que passa de convectivo para difusional, na qual a espécie oxidada ou reduzida se difunde para o seio da solução (etapa D), atingindo o equilíbrio existente antes da injeção (etapa E).

**Figura 7** - Etapas de injeção em Sistema BIA.



Fonte: Quintino e Angnes (2004).

A associação de sistemas BIA com eletrodos impressos, os chamados *screen-printed electrodes* (SPEs), tem favorecido ainda mais a portabilidade desses sistemas, além de permitirem a utilização de alíquotas ainda menores, tanto de soluções padrão quanto das amostras, com velocidades controladas por meio do auxílio de micropipeta automática [90]. Esse sistema foi inicialmente proposto por Tormin e colaboradores para análises de fármaco, peróxido de hidrogênio e metais [91].

A maior parte dos trabalhos reportados na literatura empregando sistema BIA associados a eletrodos impressos destinam-se à determinação de compostos farmacêuticos. Guedes e dos

Santos (2018) desenvolveram um kit baseado em um sistema BIA-SPE para controle de qualidade de 10 medicamentos de índice terapêutico estreito (aminofilina, carbamazepina, clindamicina, colchicina, minoxidil, prazosina, procainamida, teofilina, varfarina e verapamil) empregando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos. O método destaca-se por sua elevada sensibilidade, baixo LD ( $< 0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e rapidez, permitindo a realização de até 215 determinações por hora [92]. Sistemas semelhantes a este foram empregados na determinação de outros compostos farmacêuticos, como: levamisol [93], omeprazol [94] e citrato de sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) [95].

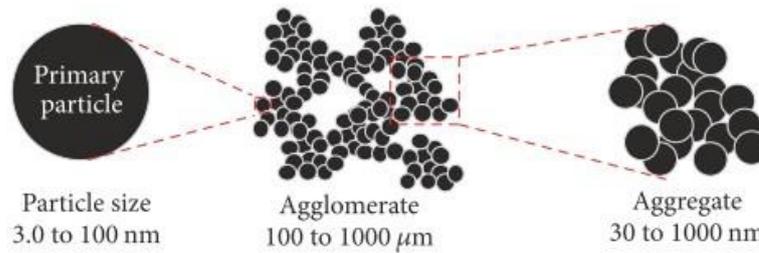
A utilização de sistemas BIA associados a eletrodos impressos para análises especificamente de antibióticos ainda é pouco explorada, havendo, até o presente momento, apenas dois trabalhos reportados na literatura nesse sentido. O primeiro foi desenvolvido por Stefano e colaboradores (2016) para determinação de ciprofloxacina utilizando SPE modificado com nanotubos de carbono de múltiplas paredes [96]. O segundo foi desenvolvido por Veloso e colaboradores (2020) no qual foi desenvolvido um método analítico para determinação de ampicilina em formulações farmacêuticas empregando eletrodos impressos de cobre obtidos por meio de placas de circuito impresso deste metal [8]. Em ambos os casos se obteve ótimas figuras de mérito, como: LD's inferiores a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ampla faixa linear e alta velocidade de análise, com valores de frequência analítica (FA)  $> 80$  determinações  $\text{h}^{-1}$ .

#### **2.4. Nanomateriais de Carbono**

Desde os primeiros relatos das propriedades de materiais nanoestruturados de carbono, ocorrido no início da década de 90 com a síntese dos nanotubos de carbono por Iijima [97], tem aumentado o interesse nesse tipo de material por parte das mais diversas áreas, como no ramo da medicina, alimentício e ambiental. Isso deve-se ao fato dessas estruturas apresentarem características importantes, como alta área superficial e eletrocatalise [98].

O carbon black (CB) é um dos tipos de nanoestruturas de carbono amorfo pertencente à fuligem pura, podendo ser obtido por meio da queima incompleta de materiais carbonáceos, por exemplo, na combustão de derivados do petróleo [11]. As partículas primárias desse material possuem tamanhos que variam entre 3 e 100 nm e uma de suas características é a formação de nanoestruturas de agregados. Como pode ser observado na Figura 8, esses agregados, por sua vez, formam aglomerados com tamanho médio entre 100 e 1000  $\mu\text{m}$ .

**Figura 8** - Representação esquemática da morfologia do CB em escala nanométrica.



Fonte: Silva *et al.* (2017).

Os diversos tipos de CB são classificados de acordo com a forma como são produzidos, os mais conhecidos são: HP 160, HS20, MTN 990, N115, N375, N660, PL6, Super P, XE2B, Vulcan XC72R, dentre outros. Esse material possui uma gama de aplicações, dentre elas, serve como reforço para borracha, em tintas de impressão, e etc. Já em eletroquímica, as maiores aplicações desses tipos de CB tem sido no armazenamento de energia, como por exemplo, no preparo de baterias de sódio e lítio e em células combustíveis [10,99].

Atualmente, CB tem se mostrado uma poderosa alternativa na obtenção de diversos dispositivos eletroquímicos, especialmente sensores e biossensores. A possibilidade do uso deste material sem que haja a necessidade de qualquer tipo de pré-tratamento, aprimoramento em termos de transferência de elétrons, resistência à incrustações e redução do potencial aplicado para determinação de alguns analitos, tornam esse tipo de material ainda mais interessante no que se refere à sua utilização como modificantes em eletrodos [11]. Suas características como nanomodificador mostraram-se eficientes mesmo quando comparados aos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e grafeno [100,101].

Apesar de todos os benefícios apresentados pelos diversos tipos de CB's, a utilização desses materiais como modificantes para sensores eletroquímicos na determinação de compostos em solução ainda é muito pequena. Não há na literatura relatos do emprego desses materiais como modificantes em SPE's para determinação de antibióticos. Até o presente momento, sua utilização está restrita ao estudo do comportamento eletroquímico de alguns compostos, a saber, epinefrina, ácido ascórbico, benzoquinona, cisteína, catecol e ácido cafeico [11], tampouco foi utilizado no desenvolvimento de métodos analíticos para determinação desses compostos empregando sistemas hidrodinâmicos como FIA e BIA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver um método eletroanalítico para quantificação de quatro antibióticos macrolídeos (ERI, AZI, CLA e ROX) individualmente, empregando eletrodo impresso de carbono modificado com Carbon Black Super P (CBSP) em sistema de Análise por Injeção em Batelada com detecção Amperométrica (BIA-AMP).

#### 3.2. Objetivos específicos

- ✓ Preparo do modificante à base de CB Super P e otimização da concentração e volume a serem utilizados na modificação;
- ✓ Realização de caracterizações física e eletroquímica do modificante;
- ✓ Comparação da resposta eletroquímica do antibiótico macrolídeo ERI sobre o eletrodo de carbono vítreo antes e após modificação com CB Super P;
- ✓ Investigação do comportamento eletroquímico da ERI sobre o eletrodo modificado empregando a técnica de voltametria cíclica;
- ✓ Otimização dos parâmetros referente ao meio reacional (eletrólito de suporte e pH do meio);
- ✓ Otimização dos parâmetros referente à técnica de Análise por Injeção em Batelada com detecção Amperométrica (BIA-AMP);
- ✓ Avaliação do método proposto com base nas figuras de mérito (linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, repetibilidade, frequência analítica, reprodutibilidade e limites de detecção e quantificação);
- ✓ Aplicação do método proposto na determinação dos quatro antibióticos, de forma não-simultânea, em amostra ambiental e farmacêutica.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Instrumentação

As medidas eletroquímicas envolvendo os antibióticos macrolídeos (ERI, CLA, ROX e AZI) foram realizadas utilizando um potenciostato portátil Ivium CompactStat.h (Ivium Technologies<sup>®</sup>, Eindhoven, Holanda) conectado a um computador habilitado com o software IviumSoft e à uma célula eletroquímica composta por três eletrodos, a saber: um eletrodo de trabalho (ET), um eletrodo de referência (ER) e um eletrodo auxiliar (EA).

Para dissolução dos reagentes e amostras sólidas foi utilizado agitador de tubos tipo Vortex (Fisatom Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil) com velocidade fixa de 2800 rpm e um banho ultrassônico USC 1400 (Unique, São Paulo, Brasil). Para o preparo das soluções tampão foi utilizado um pHmetro de bancada (Kasvi, Paraná, Brasil).

### 4.2. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada em sistema de purificação Milli-Q da Millipore (resistividade  $\geq 18\text{M}\Omega\text{ cm}$ ) (Bedford, Massachussets, Estados Unidos) e os reagentes empregados eram de grau analítico. Na Tabela 1 estão descritos todos os reagentes utilizados na realização dos experimentos, bem como suas respectivas procedências.

**Tabela 1** - Lista de reagentes utilizados e suas respectivas procedências.

Reagente	Fórmula química	Procedência
Ácido acético	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Merk S. A.
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Isofar
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Merk S. A.
Ácido fosfórico	$\text{H}_3\text{PO}_4$	Isofar
Álcool etílico	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Quimex
Azitromicina	$\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12}$	Sigma-Aldrich
CB Super P	C	Alfa Aesar
Claritromicina	$\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{NO}_{13}$	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio	KCl	Merk S. A.
Dimetilformamida	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$	Merk S. A.
Eritromicina	$\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{13}$	Sigma-Aldrich
Ferricianeto de potássio	$\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$	Merk S. A.

Fosfato dissódico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Isofar
Fosfato monopotássico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Isofar
Hidróxido de sódio	$\text{NaOH}$	Isofar
Quitosana	$(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n$	Merk S. A
Roxitromicina	$\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{15}$	Sigma-Aldrich

As soluções padrão dos antibióticos macrolídeos foram preparadas diariamente antes de cada experimento a fim de se evitar possíveis processos de degradação desses compostos. Solução padrão de ERI foi preparada pela dissolução do sólido em solução etanol-água (50/50; v/v), soluções padrão de AZI e CLA foram preparadas pela dissolução dos respectivos reagentes em solução etanol-água (70/30; v/v), já as de ROX foram preparadas pela dissolução dos sólidos em solução etanol-água (80/20; v/v), seguidos de banho ultrassônico durante 5 minutos e posteriormente eram diluídos no eletrólito de suporte para a concentração desejada.

O tampão Britton-Robinson foi utilizado como eletrólito de suporte nos testes voltamétricos iniciais, o qual foi preparado por meio da mistura equimolar ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico aferindo-se até o pH desejado com solução de hidróxido de sódio  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Um estudo de eletrólito de suporte foi realizado utilizando outras soluções eletrolíticas, como: tampão fosfato, tampão Sørensen, tampão McHvaine e cloreto de potássio as quais foram preparadas conforme descrito na literatura [102].

#### 4.3. Preparo do eletrodo modificado com carbon black Super P

O preparo da suspensão de carbon black Super P, utilizada para modificar o eletrodo de trabalho, foi realizado tomando por base uma metodologia já reportada na literatura com algumas alterações [11]. Primeiramente pesou-se 7,0 mg de CB Super P (CBSP) em balança analítica e em seguida adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (DMF), 400  $\mu\text{L}$  de solução de quitosana (CT) 0,1% e 300  $\mu\text{L}$  de água deionizada. A mistura foi mantida em banho ultrassônico durante 2 horas. A suspensão foi identificada como CBSP-CT.

Antes da modificação do eletrodo de carbon vítreo (GCE) este era previamente polido utilizando papel de filtro umedecido com suspensão de diamante  $1\mu\text{m}$  (Kemet, China). Já o processo de limpeza do eletrodo de carbono impresso (SPE) era realizado apenas com leves jatos de água destilada antes e após a realização das medidas.

A modificação foi realizada gotejando-se na superfície do eletrodo de trabalho 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de CB Super P, o qual era mantido posteriormente sob fluxo de ar, a 34° C, durante 10 minutos. Esse procedimento era realizado em duas etapas de 5  $\mu\text{L}$  de suspensão, a fim de se garantir que o modificante permanecesse apenas na superfície do carbono, e no caso do SPE, não atinja os eletrodos de referência e auxiliar. Os eletrodos de GCE e SPE após modificação com suspensão de CB Super P foram identificados como CBSP-CT/GCE e CBSP-CT/SPE, respectivamente.

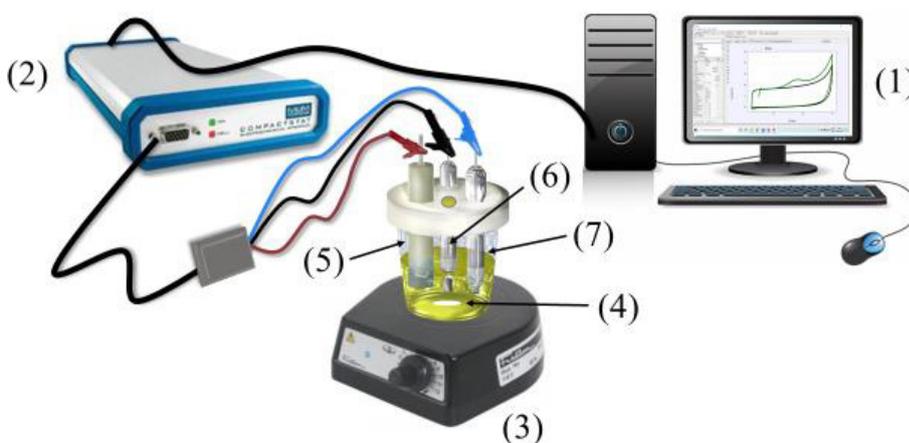
#### 4.4. Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em células adequadas para cada sistema, na presença de oxigênio e à temperatura ambiente. Foram utilizadas basicamente três técnicas eletroquímicas durante todo o desenvolvimento do trabalho: voltametria cíclica (VC), amperometria (AMP) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

##### 4.4.1. Análises Voltamétricas

As medidas por VC foram realizadas utilizando uma célula eletroquímica convencional de vidro com 15 mL de capacidade, uma tampa de teflon perfurada para inserção dos eletrodos e uma barra magnética no seu interior para agitação antes de cada medida, como apresentado na Figura 9.

**Figura 9** - Sistema eletroquímico utilizado para medidas voltamétricas. (1) computador, (2) potenciostato, (3) agitador magnético, (4) barra magnética, (5) eletrodo de trabalho, (6) eletrodo auxiliar e (7) eletrodo de referência.



Fonte: autor

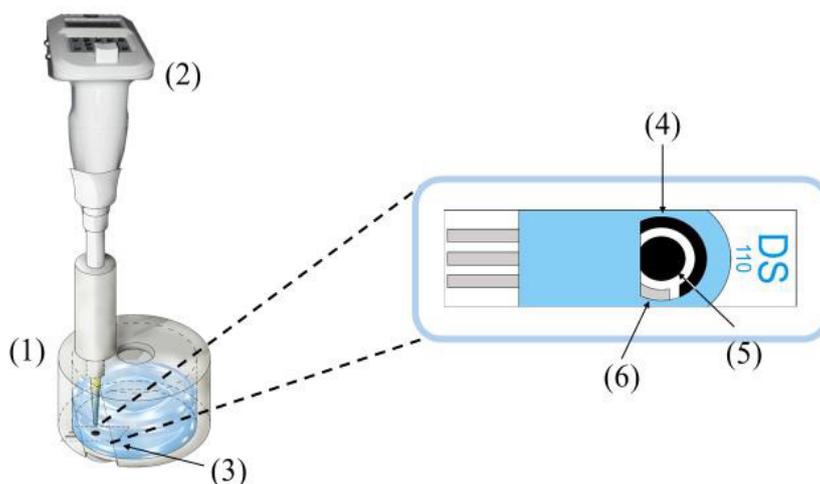
Como eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo ( $\Phi = 3,0 \text{ mm}$ ) modificado com CB Super P. O eletrodo de referência empregado nas medidas voltamétricas

tratava-se de um eletrodo de Ag/AgCl,  $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$  construído no próprio laboratório tomando-se um fio de Ag com sal de AgCl eletrodepositado na superfície, o qual é inserido em uma pipeta de Pasteur adaptada para essa finalidade. Tendo previamente vedada a parte inferior da pipeta com um separador de bateria, preencheu-a com solução saturada de KCl e, em seguida, inseriu-se o fio de Ag/AgCl, esta metodologia foi descrita por Pedrotti e colaboradores [103]. Como eletrodo auxiliar utilizou-se um fio de platina em formato de espiral, fixo em uma pipeta de Pasteur adaptada. Este processo também foi realizado no próprio Laboratório de Eletroquímica da UFMA (LELQ).

#### 4.4.2. Sistema BIA

A célula eletroquímica empregada no sistema BIA foi produzida em impressora 3D e doada pelo Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A célula BIA consiste em um cilindro de ABS (acrylonitrile butadiene styrene), uma resina termoplástica oriunda do petróleo, com um suporte inferior e uma tampa do mesmo material. No suporte inferior há um compartimento para acomodação do SPE, o qual permanece em contato com a solução eletrolítica por meio de um orifício na parte inferior da célula e um “O-ring” limitando o contato apenas com a região dos três eletrodos (ET, EA e pseudo-ER). A tampa da célula possui um compartimento cilíndrico para acomodação da micropipeta eletrônica, a qual é posicionada na configuração *wall-jet*, oposta ao eletrodo, como apresentado na Figura 10.

**Figura 10** - Sistema de Análise por Injeção em Batelada como detecção Amperométrica (BIA-AMP). (1) célula BIA, (2) micropipeta eletrônica, (3) SPE, (4) eletrodo auxiliar de carbono, (5) eletrodo de trabalho de carbono modificado com CB Super P, (6) pseudoreferência de Ag.



Fonte: Autor

Uma micropipeta eletrônica monocanal Rainin (Woburn, MA, USA) modelo EDP3-Plus foi utilizada para realizar as injeções das soluções padrão e amostras diluídas, a qual permite injetar volumes que variam entre 10 e 200  $\mu\text{L}$  e velocidades de dispensa que variam entre 19 e 100  $\mu\text{L s}^{-1}$ . As injeções foram realizadas em sistema sob agitação com o auxílio de uma barra magnética e um agitador magnético modelo 751 da Fisaton Equipamentos Científicos Ltda.

#### **4.4.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)**

As medidas de EIE foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302N da EcoChemie – Metrohm, acoplado ao módulo de impedância FRA2.

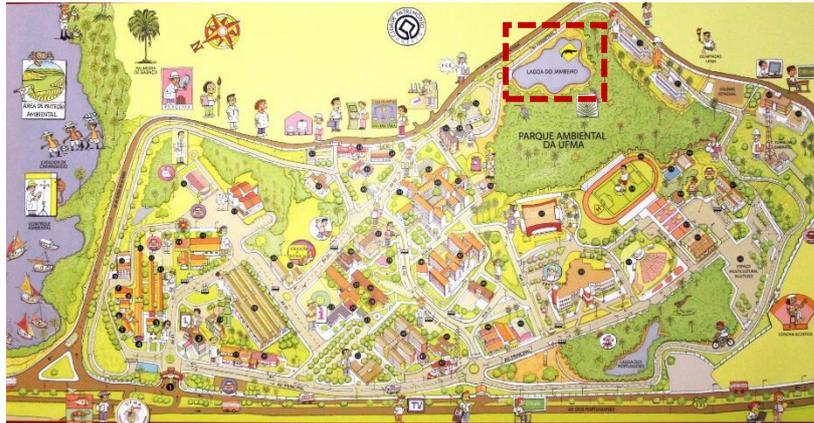
Para realização dos experimentos utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, semelhante à utilizada nas medidas voltamétricas, tendo como eletrodo de trabalho o eletrodo de carbono vítreo modificado com CB Super P, um eletrodo de Ag/AgCl,  $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$  como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Para controle do equipamento e aquisição dos dados utilizou-se um computador com software NOVA (2.1.1) empregando valores de frequência de 0,1 a 100 KHz com um sinal de amplitude 5,0 mV e frequência por década de 10 pontos.

### **4.5. Obtenção e preparo de amostras**

O método desenvolvido foi empregado na determinação dos antibióticos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX em amostra ambiental, e de AZI e CLA em amostras farmacêuticas. A determinação foi realizada de forma direta com base no sinal analítico gerado pelas amostras em relação à curva analítica construída com os respectivos padrões. Testes de adição e recuperação também foram realizados na presença das matrizes, a fim de verificar a exatidão do método proposto.

#### **4.5.1. Amostra ambiental**

A amostra ambiental consistiu em água coletada em uma lagoa localizada no território da Universidade Federal do Maranhão campus São Luís (-2.562377; 44.308190), a lagoa é popularmente conhecida como *Lagoa do Jambeiro* por ficar próxima a uma comunidade que leva este nome, como pode ser observado na região destacada na Figura 11. A amostra foi coletada em um frasco âmbar de 100 mL, a qual estava à uma temperatura de 29 °C e pH 5,5. Após a coleta a amostra foi acondicionada sob refrigeração até o dia seguinte, dia da análise.

**Figura 11** - Mapa da Universidade Federal do Maranhão campus São Luís.

Fonte: Portal UFMA.

Embora possuindo uma certa turbidez e a presença de partículas em suspensão, a análise da amostra de água foi realizada sem nenhum tipo de pré-tratamento, sendo apenas diluída 5 vezes no eletrólito de suporte antes das injeções.

#### 4.5.2. Amostras de fármacos

Amostras farmacêuticas contendo AZI e CLA como princípio ativo foram analisadas empregando o método proposto, com a finalidade de verificar se a massa do antibiótico por cápsula corresponde ao valor descrito no rótulo do medicamento. Os dois medicamentos foram adquiridos em farmácia local, sendo eles: azitromicina di-hidratada (500 mg), uma caixa contendo 6 comprimidos revestidos, medicamento genérico produzido pelo Laboratório Prati Donaduzzi; e claritromicina (500 mg) uma caixa contendo 10 comprimidos revertidos, medicamento genérico produzido pelo Laboratório Medley.

As soluções de cada uma das amostras dos medicamentos, tanto dos comprimidos de azitromicina quanto de claritromicina, foram preparadas da seguinte forma: três comprimidos foram pesados em balança analítica e, com o auxílio de almofariz e pistilo, foram macerados, em seguida pesou-se a massa média de um único comprimido. Essa massa foi solubilizada em 50 mL de solução etanol-água (70:30; v/v) e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, em seguida foi aferido até o menisco com a mesma solução etanólica e levado a banho ultrassônico durante 20 minutos. Por fim, foi realizada uma filtração convencional da solução e realizadas as diluições nas concentrações desejadas em eletrólito de suporte.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

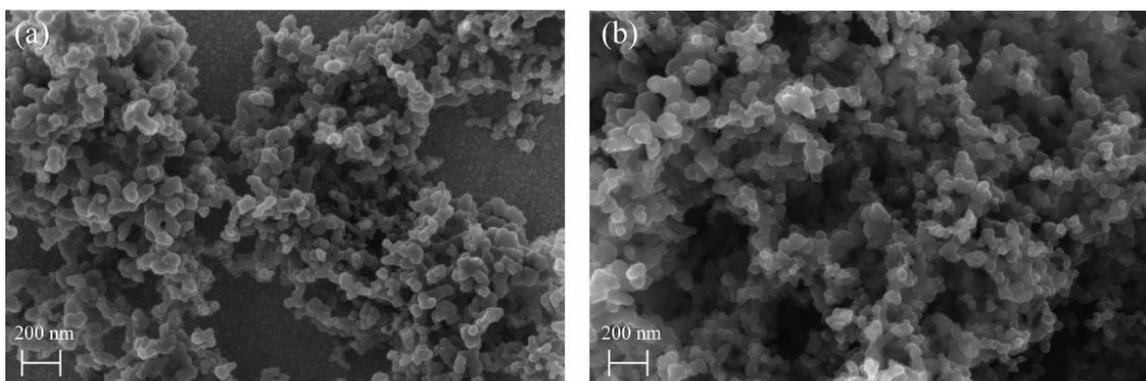
### 5.1. Estudo do modificante CBSP-CT

A seguir, estão apresentados os resultados de caracterização física e eletroquímica do modificante proposto (CBSP-CT). Além disso, para que se obtivesse melhor desempenho da metodologia foi realizada uma etapa de otimização da concentração de CBSP na suspensão e do volume a ser utilizado na modificação dos eletrodos.

#### 5.1.1. Caracterização física

A fim de avaliar propriedades morfológicas e estruturais do material a ser utilizado como modificante, foram realizadas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tanto do material bruto (CBSP), ou seja, da forma como é adquirido comercialmente, quanto após o preparo da suspensão para modificação dos eletrodos de trabalho (CBSP-CT). Na Figura 12 estão apresentadas as imagens obtidas nessas análises.

**Figura 12** - Imagens obtidas por MEV para o (a) CBSP e para o (b) CBSP-CT.

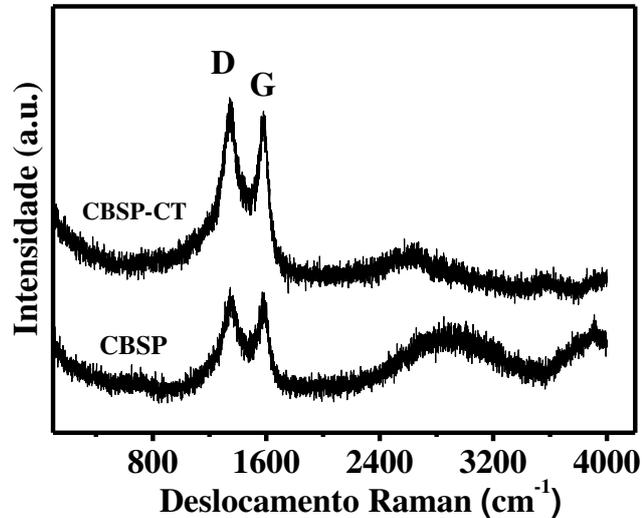


A partir dos resultados obtidos pôde-se notar que esse material é formado por nanopartículas quase esféricas com tamanhos que variam entre 40 e 100 nm (a), tal qual é descrito na literatura para a estruturas de CB's [11]. Além disso, quando se compara os resultados obtidos antes após o preparo da suspensão à base de CB e quitosana (imagem b) é observada a formação de uma camada mais contínua de nanopartículas, proporcionando um melhor recobrimento da superfície do eletrodo.

Em processos eletródicos na superfície de materiais carbonáceos, a transferência de elétrons, e possíveis processos catalíticos, ocorrem em regiões de maior incidência de defeitos na estrutura do carbono [104]. Dessa forma, com o intuito de avaliar o grau de desordem e

imperfeições de material proposto, utilizou-se a técnica de espectroscopia Raman, e os resultados obtidos para o CBSP e CBSP-CT estão apresentados na Figura 13.

**Figura 13** - Espectros Raman para o CBSP e CBSP-CT.



Os resultados obtidos mostram que ambos os materiais apresentaram dois sinais vibracionais principais, em 1580 e 1350  $\text{cm}^{-1}$ , os quais são esperados para esse tipo de material. A banda D pode ser associada à presença de defeitos e hibridização de tipo  $\text{sp}^3$ , enquanto a banda G é atribuída à presença de carbono  $\text{sp}^2$  [105]. A intensidade relativa dessas bandas ( $I_{\text{D}}/I_{\text{G}}$ ) é um parâmetro conveniente para analisar o nível de desordem desse tipo de carbon black. Os dados numéricos estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Posições das bandas D e G ( $\text{cm}^{-1}$ ) e razão  $I_{\text{D}}/I_{\text{G}}$  obtidos para o CBSP e CBSP-CT.

	D ( $\text{cm}^{-1}$ )	G ( $\text{cm}^{-1}$ )	$I_{\text{D}}/I_{\text{G}}$
<b>CBSP</b>	1346,45	1571,7	1,6
<b>CBSP-CT</b>	1346,54	1582,0	1,9

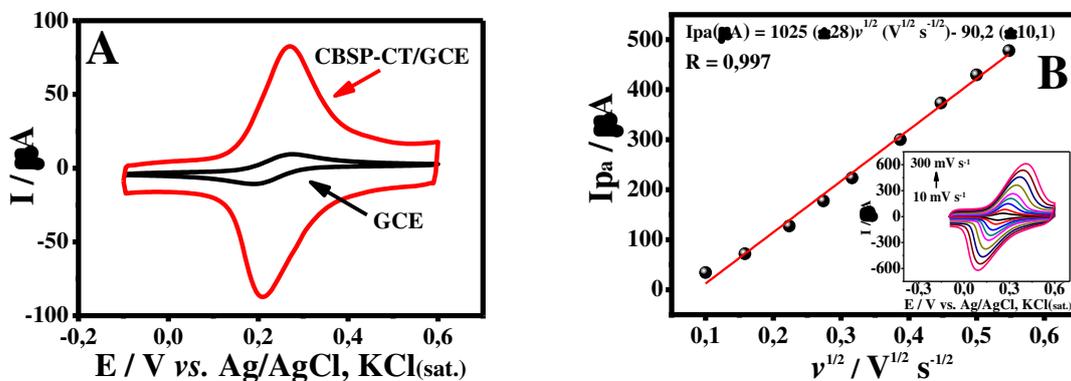
A razão  $I_{\text{D}}/I_{\text{G}} = 1,6$  mostra uma desordem excelente para o SPCB, uma característica interessante para alcançar um aumento na capacidade de corrente. Notavelmente, o filme preparado a partir de carbono black Super P e quitosana (CBSP-CT) apresentou uma razão  $I_{\text{D}}/I_{\text{G}}$  igual a 1,9 indicando uma maior incidência de defeitos estruturais, e conseqüentemente, melhor desempenho eletroquímico. Esse valor mostrou-se superior aos de outros materiais carbonáceos reportados na literatura, como: nanofibras de carbono (0,96) [106], nanotubos de

carbono (0,54) [107], óxido de grafeno (0,23) [108] e CB N220 (0,97) [109]. Diante disso, optou-se por utilizar o filme de CBSP-CT como modificante em eletrodos de carbono vítreo (CBSP-CT/GCE) e eletrodos impressos (CBSP-CT/SPE) na realização dos estudos posteriores.

### 5.1.2. Caracterização eletroquímica

Em seguida, realizou-se a caracterização eletroquímica do eletrodo CBSP-CT/GCE empregando a técnica de voltametria cíclica na presença da sonda eletroquímica  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  e comparando-o com o eletrodo de carbono vítreo não-modificado (GCE). A Figura 14A apresenta os voltamogramas cíclicos para o GCE e CBSP-CT/GCE na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  em  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  à velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ . Em ambos os casos se observa a formação de picos bem definidos, característicos da sonda eletroquímica utilizada, e separação entre os potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) de  $85 \text{ mV}$  para o GCE e de  $60 \text{ mV}$  para o CBSP-CT/GCE. Além disso pode-se observar um nítido aumento de  $I_p$  quando se compara os eletrodos antes e após modificação, as quais foram de  $9,26 \mu\text{A}$  e  $8,30 \mu\text{A}$  ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , respectivamente) para o GCE e de  $73,0 \mu\text{A}$  e  $71,3 \mu\text{A}$  ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , respectivamente) para o CBSP-CT/GCE. Essas características evidenciam o efeito eletrocatalítico que o eletrodo modificado com CBSP-CT pode proporcionar.

**Figura 14** – (A) Voltamogramas cíclicos do  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  sobre o GCE (—) e CBSP-CT/GCE (—).  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Dependência da  $I_p$  com  $v^{1/2}$  obtido a partir do estudo de variação da velocidade de varredura; **Inserido:** Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura ( $10 - 300 \text{ mV s}^{-1}$ ).



A determinação da área eletroativa dos eletrodos antes e após a modificação foi realizada por meio de um estudo empregando a técnica de VC em diferentes velocidades de varredura ( $10 - 300 \text{ mV s}^{-1}$ ) na presença do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ . Os voltamogramas cíclicos obtidos, bem como a relação entre as correntes de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) estão apresentados na Figura 14B. Observou-se que essa relação obedece uma

linearidade, comportamento característico de sistemas cujo transporte de massa é controlado por difusão, com coeficiente de correlação (R) igual a 0,997 e equação de reta  $I_{p_a}(\mu A) = 1025 (\pm 28)v^{1/2}(V^{1/2} s^{-1/2}) - 90,2 (\pm 10,1)$ .

O cálculo da área eletroativa foi realizado por meio da Equação de Randles-Sevcik (Equação 1, p.29). Sabendo-se que  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 1$ ,  $C = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$  e tomando-se o valor do coeficiente angular obtido a partir da relação de  $I_{p_a}$  e  $v^{1/2}$ , foi possível calcular a área eletroativa dos eletrodos, substituindo esses valores na Equação 1. A Tabela 3 apresenta os valores de coeficiente angular referentes à curva de  $I_{p_a}$  em função de  $v^{1/2}$  e a área eletroativa obtida para os eletrodos GCE e CBSP-CT/GCE, nela é possível observar um aumento da área eletroativa de aproximadamente 33 vezes quando se compara o eletrodo limpo com o modificado.

**Tabela 3** - Valores de coeficiente angular equivalentes à curva de  $I_{p_a}$  em função de  $v^{1/2}$  e área eletroativa do GCE e CBSP-CT/GCE.

<b>Eletrodo</b>	<b>Coeficiente angular (<math>A V^{-1/2} s^{1/2}</math>)</b>	<b>Área eletroativa (<math>cm^2</math>)</b>
<b>GCE</b>	$3,09 \times 10^{-5}$	0,042
<b>CBSP-CT/GCE</b>	$1,02 \times 10^{-3}$	1,380

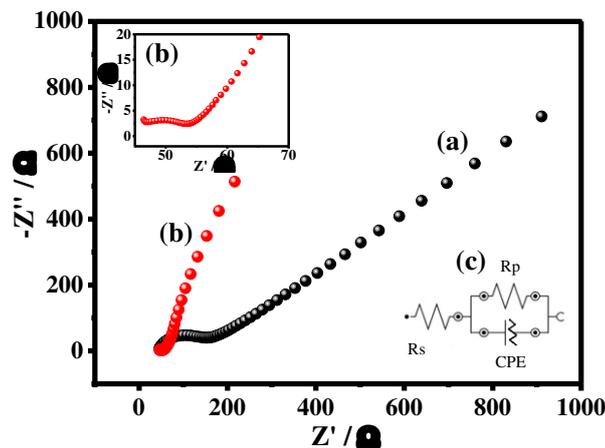
Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foram realizadas com o GCE e CBSP-CT/GCE a fim de estudar o efeito dos diferentes materiais com relação à resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução. Os experimentos foram executados na presença do par redox  $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  variando-se a frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e em potencial de circuito aberto. A Figura 15 apresenta o diagrama de Nyquist empregando-se o GCE e o CBSP-CT/GCE. Ao se analisar o espectro de impedância para o GCE observa-se a formação de um semicírculo bem definido na região de altas frequências, e que diminui substancialmente quando se utiliza o CBSP-CT/GCE, indicando uma melhor transferência eletrônica sobre a superfície do eletrodo modificado.

Valores de resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) representam numericamente a dificuldade de transferência de elétrons entre a sonda eletroquímica utilizada neste estudo e o eletrodo. Os dados obtidos mostraram uma melhora significativa na transferência eletrônica quando se compara o  $R_{ct}$  para o eletrodo GCE ( $121 \Omega$ ) com o CBSP-CT/GCE ( $12,6 \Omega$ ). A partir desses valores pôde-se calcular a constante de transferência heterogênea de elétron ( $k^0$ ), por meio da equação 2.

$$k^0 = \frac{RT}{F^2 R_{CT} A C} \quad \text{Equação (2)}$$

onde, R é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T é a temperatura termodinâmica ( $298,15 \text{ K}$ ), F é a constante de Faraday ( $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $R_{ct}$  é a resistência à transferência de carga ( $\Omega$ ), A é a área geométrica do eletrodo ( $0,0707 \text{ cm}^2$ ) e C é a concentração das espécies ( $\text{mol cm}^{-3}$ ). Os valores de  $k^0$  obtidos foram de  $6,22 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  para o GCE e de  $0,0610 \text{ cm s}^{-1}$  para o CBSP-CT/GCE. A diminuição da resistência, e conseqüentemente, o aumento na transferência de carga estão relacionados à excelente condutividade do material [110].

**Figura 15** - Diagrama de Nyquist para o (a) GCE e (b) CBSP-CT/GCE em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . (c) Circuito eletroquímico proposto para o CBSP-CT/GCE.



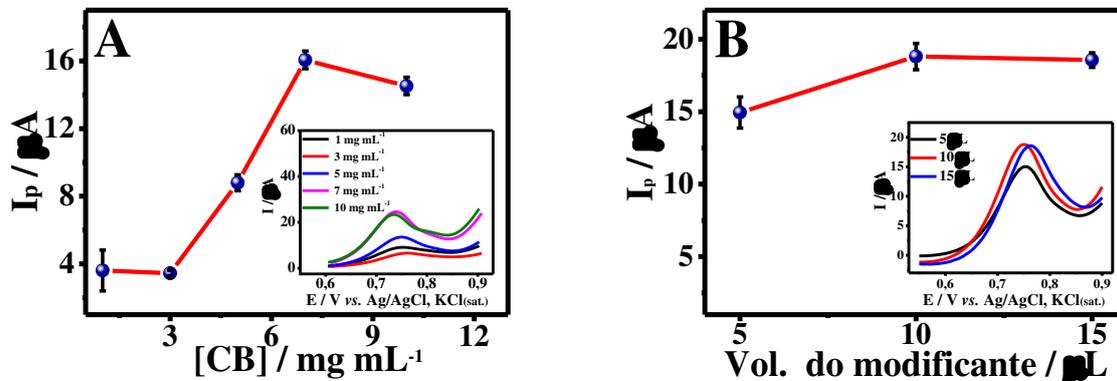
### 5.1.3. Otimização do modificante CBSP-CT

Primeiramente foi avaliada a influência da concentração de CB Super P na obtenção do sinal analítico, para isso foram preparadas suspensões em diferentes concentrações de CB ( $1 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), em seguida registrou-se os voltamogramas cíclicos para cada uma das suspensões na presença de  $79,8 \text{ μmol L}^{-1}$  de ERI sobre o eletrodo CBSP-CT/GCE.

A Figura 16A apresenta a relação entre a concentração de CB Super P na suspensão e os valores de  $I_p$ , na qual estão inseridas as varreduras diretas dos voltamogramas cíclicos obtidos em cada um dos experimentos, sendo estes realizados em triplicata ( $n = 3$ ). Nela pode-se observar um aumento dos valores de  $I_p$  à medida em que se aumenta a concentração de CB na suspensão até  $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , esse efeito já era previsto pois o aumento da concentração de CB

tem como consequência o aumento da área eletroativa do sensor, portanto, essa foi a concentração de CB escolhida para o preparo da suspensão modificante.

**Figura 16** - Efeito da variação da (A) concentração (1 – 10 mg mL<sup>-1</sup>) e (B) do volume (5 – 15 µL) do modificante CBSP-CT sobre a resposta eletroquímica da ERI (79,8 µmol L<sup>-1</sup>). Eletrólito de suporte: tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0);  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{step}}$ : 5,0 mV; Eletrodo: CBSP-CT/GCE.



Um outro parâmetro referente ao modificante foi o volume a ser gotejado na superfície do eletrodo no momento da modificação. Neste teste variou-se o volume do modificante entre 5 e 15 µL. A Figura 16B mostra um aumento do sinal analítico quando o volume do modificante passa de 5 para 10 µL, já nos testes realizados empregando 15 µL do modificante não observou aumento do sinal. Além disso, no voltamograma referente ao teste com 15 µL observa-se um leve deslocamento de  $E_p$  para valores mais positivos, dessa forma, o volume de 10 µL foi escolhido como sendo ideal para modificação do eletrodo.

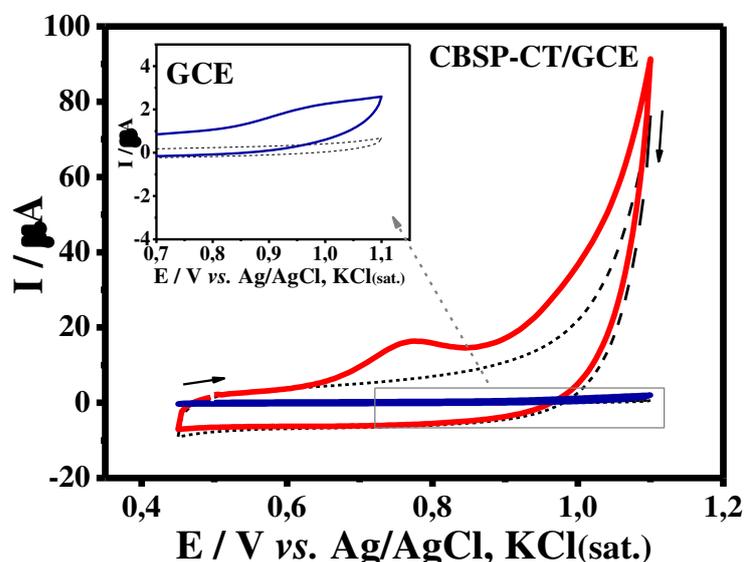
## 5.2. Comportamento Voltamétrico da Eritromicina (ERI)

A fim de avaliar o perfil voltamétrico da ERI sobre o eletrodo limpo (GCE) e após modificação da superfície com carbon black Super P (CBSP-CT/GCE), um teste comparativo preliminar foi realizado empregando a técnica de VC em célula eletroquímica convencional, na ausência e após a adição 40 µmol L<sup>-1</sup> desse composto, os resultados obtidos neste teste estão apresentados na Figura 17.

Na varredura realizada empregando o GCE na presença de 40 µmol L<sup>-1</sup> de ERI (voltamograma em azul) observa-se um pico anódico que se inicia em 0,85 V e atinge valor máximo de corrente em 0,95 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>(sat.)</sub>, esse processo refere-se à oxidação da ERI. A ausência de sinal quando a varredura é invertida indica a irreversibilidade desse

processo, esse resultado é semelhante aos de outros trabalhos reportados na literatura que investigam a oxidação da ERI [34,111].

**Figura 17** - Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (GCE) e modificado com CB Super P (CBSP-CT/GCE) em tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) na ausência (linhas pontilhadas) e na presença (linhas contínuas) de ERI (40 μmol L<sup>-1</sup>). **Inserido:** Voltamograma obtido apenas com o GCE.  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ .



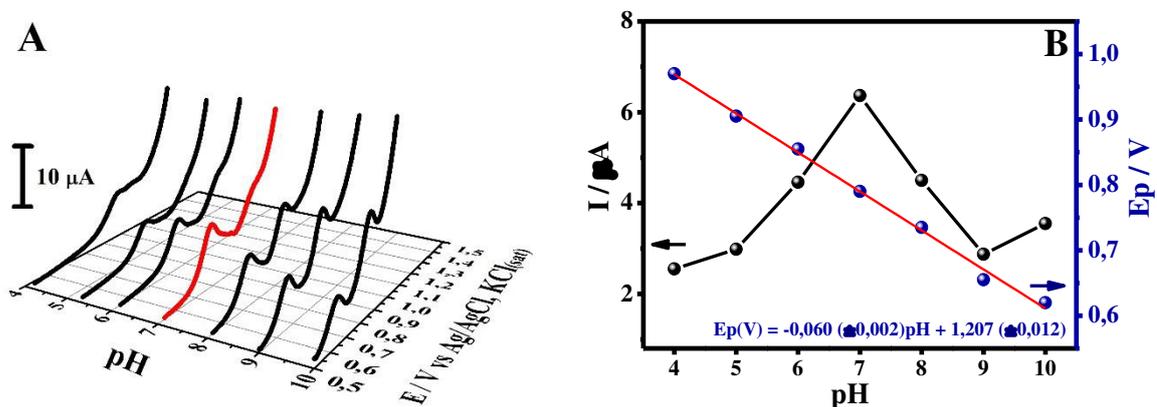
No perfil voltamétrico obtido com o CBSP-CT/GCE (voltamograma em vermelho), nas mesmas condições experimentais utilizadas no teste anterior, pode-se observar um pico anódico com intensidade de corrente visivelmente maior do que aquele obtido empregando o eletrodo limpo, mostrando eficiência do modificante CBSP-CT como mediador no processo de transferência eletrônica, e conseqüentemente, agregando sensibilidade ao sensor. Além disso, há um deslocamento de potencial de pico de aproximadamente 175 mV para valores menos positivos ( $E_p = 0,775 \text{ V}$ ), indicando que o modificante apresenta efeito catalítico frente a reação de oxidação da ERI.

### 5.2.1. Estudo de pH

Um estudo do comportamento voltamétrico da ERI sobre o CBSP-CT/GCE foi realizado em diferentes valores de pH, para isso utilizou-se tampão BR 0,1 mol L<sup>-1</sup> em uma faixa de pH entre 4,0 e 10,0. A delimitação dessa faixa de pH baseou-se em estudos previamente reportados na literatura a respeito dos produtos de degradação da ERI, nos quais observou-se que esse composto apresenta relativa estabilidade em valores de pH > 4,0 e pH < 10,0, e torna-se cada vez mais instável em meios onde o pH é < 3,0 [112].

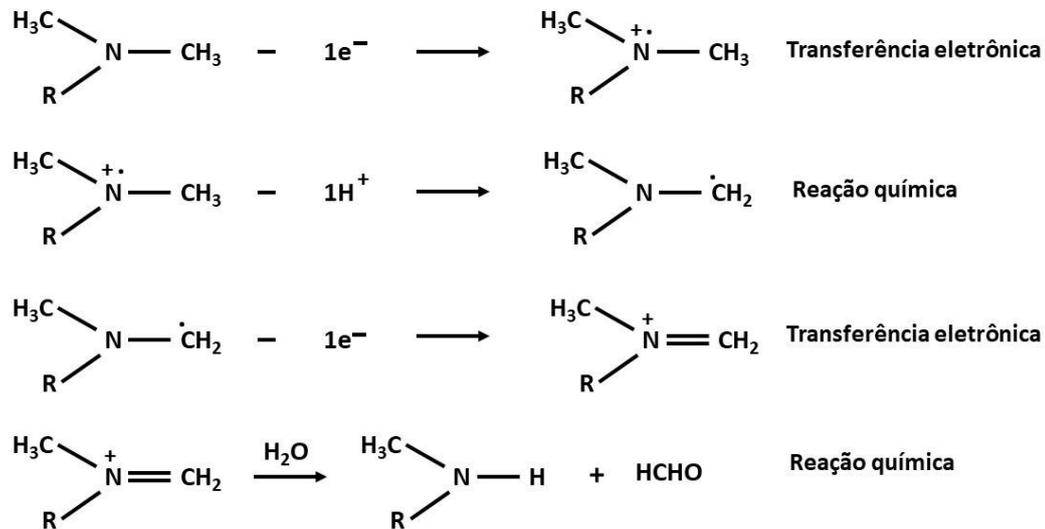
A Figura 18A apresenta os voltamogramas de varredura linear no sentido anódico (uma vez que não se observou picos no sentido catódico) obtidos em cada um dos valores de pH. Como pode ser observado, há o aparecimento de um pico de oxidação não muito bem definido em pH 4,0, esse pico ganha intensidade de corrente e definição à medida que se aumenta o pH do meio, atingindo um valor máximo em pH 7,0. Em pH > 7,0 há um decréscimo dos valores de corrente (Figura 18B) e o surgimento de um segundo processo de oxidação, que se dá em valores de potenciais mais elevados.

**Figura 18 - (A)** Voltamogramas de varredura linear obtidos com o CBSP-CT/GCE na presença de ERI ( $79,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes valores de pH (4 – 10). **(B)** Dependência da corrente ( $I_p$ ) e potencial de pico ( $E_p$ ) com o pH do meio.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ .



De acordo com trabalhos reportados na literatura que estudam reações de oxidação da ERI [112,113], o primeiro processo pode ser atribuído à remoção de um elétron do átomo de nitrogênio ligado a um dos fragmentos de açúcar que formam a molécula desse composto, e consequentemente, à formação de um radical amino, uma vez que as dialquilaminas são oxidáveis levando à formação de radical pela perda de um dos seus elétrons livres [114]. O radical formado é uma espécie altamente instável e reage rapidamente com o meio para formar produtos mais estáveis. O segundo processo de oxidação refere-se à perda de um elétron pelo produto da reação química do radical cátion amínio, tendo uma enamina como intermediário. A última etapa é a reação de desmetilação da enamina e formação de amina secundária correspondente, como pode ser observado na série de reações apresentadas na Figura 19.

Figura 19 - Reações propostas para oxidação da ERI.



Fonte: (Song et al. 2014)

Outras informações importantes podem ser obtidas a partir do estudo de pH por meio da relação entre este e o potencial de pico ( $E_p$ ). Como pode ser observado na Figura 18B, o  $E_p$  desloca-se para valores menos positivos à medida em que se aumenta o pH do meio, esse comportamento sugere a participação de prótons na reação geral do eletrodo. Além disso esse deslocamento dá-se à uma taxa de  $0,060\text{V pH}^{-1}$ , dado obtido por meio da Equação 3, a qual representa a regressão linear da curva pH vs  $E_p$ :

$$E_p(\text{V}) = -0,060 (\pm 0,002)\text{pH} + 1,207 (\pm 0,012); R = 0,998 \quad \text{Equação (3)}$$

Essa informação implica que o número de prótons envolvidos no processo redox é igual ao número de elétrons, levando-se em consideração a relação pré-estabelecida de  $0,0592 (h/n)$   $\text{V pH}^{-1}$ , onde  $h$  e  $n$  representam o número de prótons e elétrons, respectivamente, envolvidos na reação [115]. Todos esses resultados estão de acordo com o mecanismo apresentado.

### 5.2.2. Estudo do efeito da velocidade de varredura

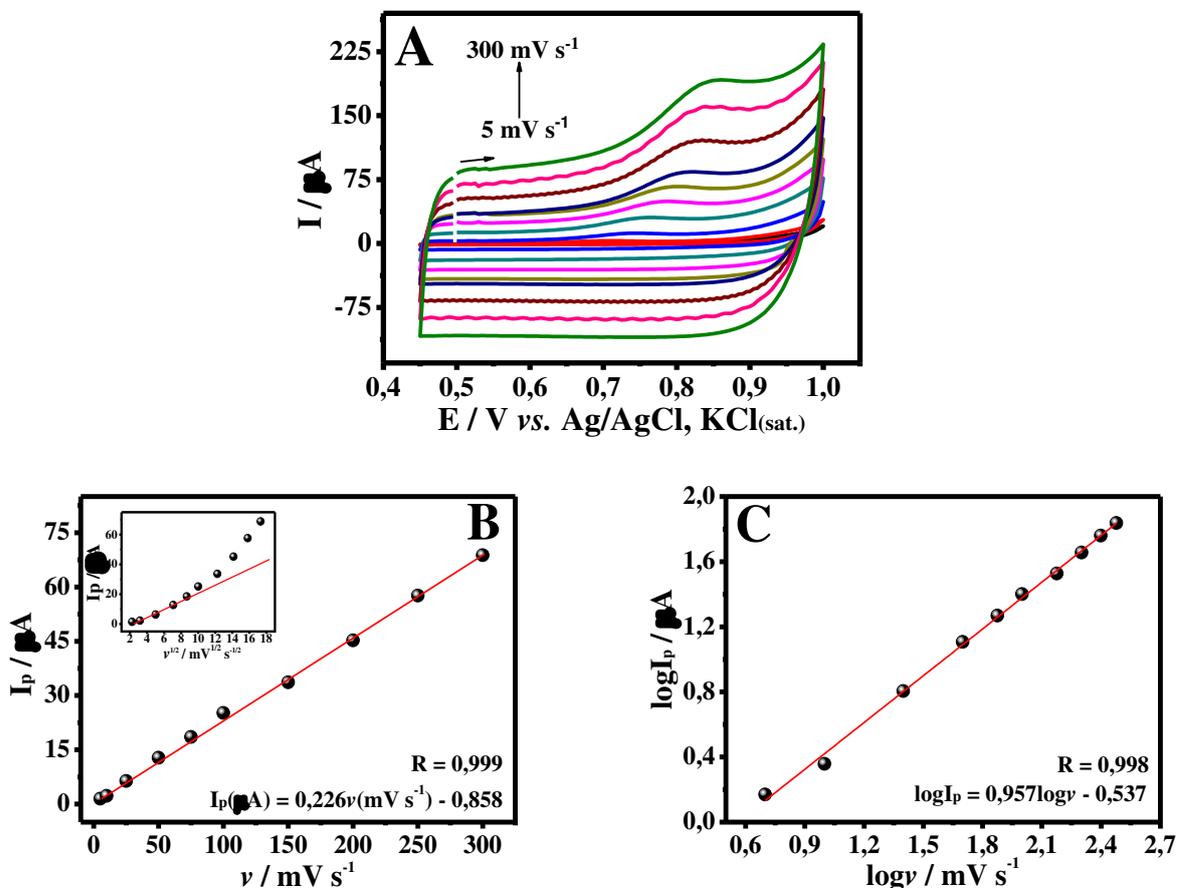
Com o objetivo de verificar o tipo de transporte de massa predominante na reação de eletrooxidação da ERI, foi realizado um estudo do efeito da velocidade de varredura ( $\nu$ ) por VC. Os testes foram executados empregando o CBSP-CT/GCE na presença de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI em tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0), variando-se a velocidade de varredura em um intervalo entre 5 e  $300 \text{ mV s}^{-1}$ . Conforme pode ser observado na Figura 20A, a ausência de pico na varredura catódica e o fato de que à medida em que se aumenta o valor de  $\nu$  ocorre um

Veloso, William B. (2021)

deslocamento do  $E_p$  para valores mais positivos, permitem sugerir que a reação de oxidação da ERI sobre o eletrodo CBSP-CT/GCE é um processo completamente irreversível [116].

Ao se avaliar o comportamento da  $I_p$  em função da  $v$ , dado apresentado na Figura 20B, observa-se uma relação linear entre eles e a equação da reta correspondente é dada por  $I_p = 0,226v \text{ (mV s}^{-1}\text{)} + 0,858$  e o coeficiente de correlação é igual a 0,999. Esse mesmo fenômeno não é observado quando se relaciona os valores de  $I_p$  com a  $v^{1/2}$  (gráfico inserido na Figura 20B), indicando que o processo de oxidação da ERI na superfície do CBSP-CT/GCE é controlado por adsorção [117].

**Figura 20** – (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo CBSP-CT/GCE na presença de ERI  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura ( $5 - 300 \text{ mV s}^{-1}$ ). (B) Dependência da  $I_p$  com a velocidade de varredura e com a raiz quadrada da velocidade de varredura (inserido). (C) Dependência do log da velocidade de varredura com o log da corrente de pico.



Além disso, a relação linear entre o  $\log I_p$  e o  $\log v$  (Figura 20C), descrita pela equação  $\log I_p = 0,957 \log v \text{ (mV s}^{-1}\text{)} - 0,537$  e cujo coeficiente de correlação é igual a 0,998, apresenta um valor de inclinação próximo ao valor teórico para processos controlados por adsorção [118], confirmando os resultados obtidos na análise anterior.

Ainda utilizando os dados obtidos por meio do estudo da velocidade de varredura, é possível calcular o número de elétrons envolvidos na reação global de oxidação da ERI, esse número pode ser obtido por meio da diferença entre o potencial de pico ( $E_p$ ) e o potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) para as diferentes velocidades de varredura, aplicando-se à equação 4 [119,120].

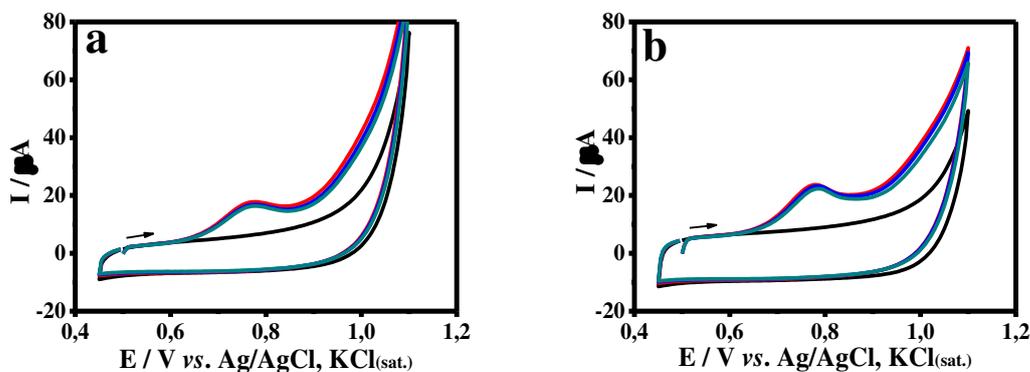
$$| E_p - E_{1/2} | = \frac{48}{\alpha n} \quad \text{Equação (4)}$$

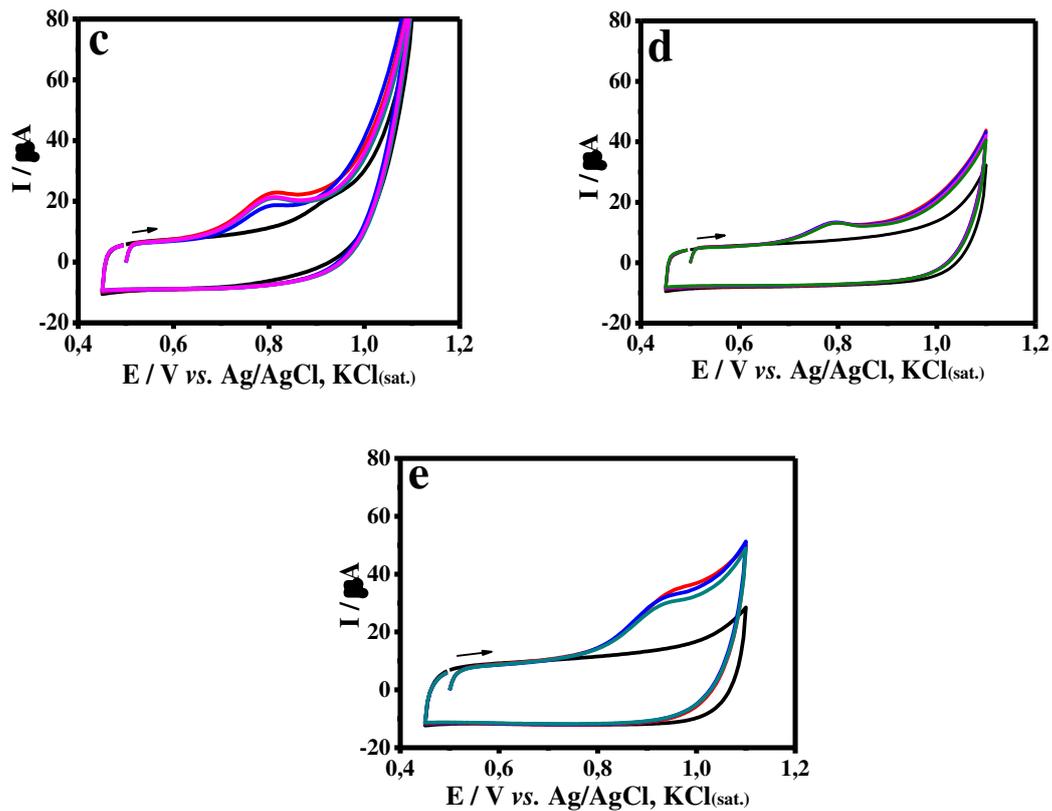
Considerando-se  $\alpha = 0,5$  (valor médio geralmente atribuído à moléculas orgânicas), o valor obtido para  $E_p - E_{1/2}$  foi de 45 mV e o número de elétrons ( $n$ ) calculado foi de 2,13, valor bem próximo de 2, o qual é o número de elétrons apresentado no mecanismo de oxidação da ERI disposto na literatura [113].

### 5.2.3. Estudo do eletrólito de suporte

Um estudo da composição do eletrólito de suporte foi realizado utilizando-se soluções eletrolíticas com mesma concentração ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e pH (7,0), valor próximo daquele escolhido anteriormente, para isso foram utilizadas as seguintes soluções: tampão BR, tampão Sørensen, tampão McIlvaine, tampão fosfato e KCl. Os testes foram realizados registrando-se os voltamogramas cíclicos na ausência e na presença de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI, em três ciclos consecutivos, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.

**Figura 21** - Voltamogramas cíclicos sucessivos do eletrodo de CBSP-CT/GCE na ausência e na presença de ERI ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes eletrólitos de suporte (**a**: tampão BR; **b**: tampão Sørensen; **c**: tampão McIlvaine; **d**: tampão fosfato; **e**: KCl) todos de concentração igual a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0).  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ .



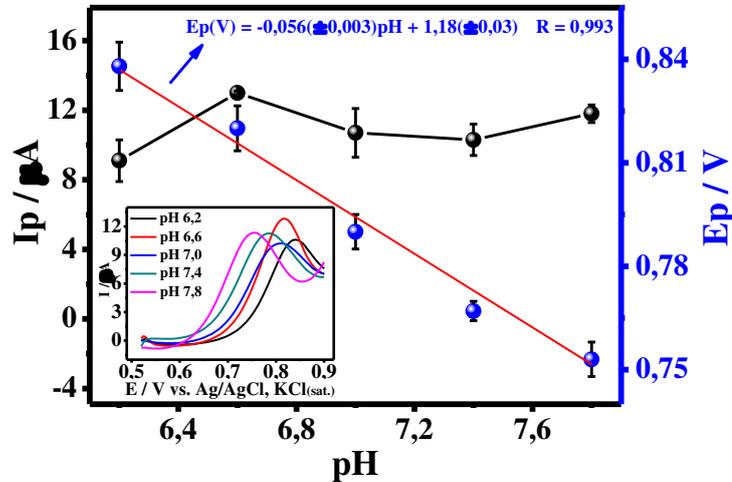


Os resultados mostram que em todos os eletrólitos avaliados há a presença do pico anódico referente à oxidação da ERI, porém os maiores valores de corrente de pico, além de boa estabilidade entre os ciclos, foram obtidos em tampão Sørensen  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0), dados apresentados na Figura 21b. Portanto, este foi escolhido como eletrólito de suporte para realização dos testes posteriores. Nos experimentos realizados em tampão McIlvaine  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  observou-se uma instabilidade no sinal caracterizado pela queda gradativa da corrente de pico ao longo das medidas, inviabilizando o emprego destes como eletrólito de suporte neste caso.

Após a escolha do eletrólito de suporte foi realizado um estudo de pH mais específico, neste caso, utilizando tampão Sørensen  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com valores de pH dentro da faixa tamponante (6,2 – 7,8), a fim de obter melhores condições experimentais. De acordo com a Figura 22 pode-se observar que o pico de oxidação da ERI desloca-se para potenciais menos positivos à medida em que se aumenta o pH, de acordo com a equação de reta  $E_p(\text{V}) = -0,056(\pm 0,003) \text{ pH} + 1,18(\pm 0,03)$  com coeficiente de correlação  $R = 0,993$ . Esses resultados confirmam os obtidos no estudo realizado com tampão BR, e o maior valor de corrente foi obtido em pH 6,6. Como a variação de corrente foi pequena entre os valores de pH estudados,

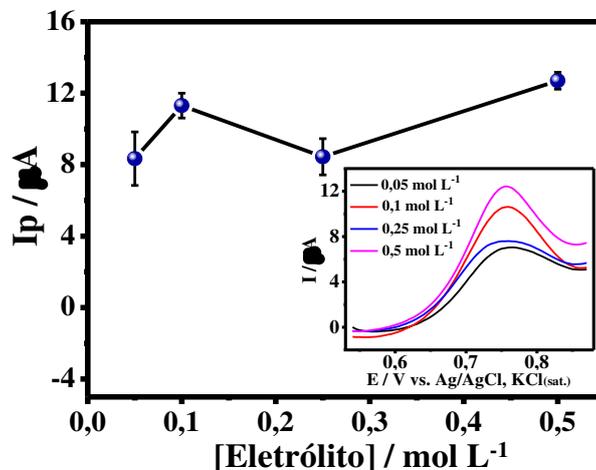
optou-se pela solução de pH 7,8 pois apesar de não possuir maior valor de corrente, permite se trabalhar com menores valores de potencial.

**Figura 22** - Dependência da  $I_p$  e  $E_p$  em função do pH do meio. **Inserido:** Estudo de pH realizado pelo registro de voltamogramas do CBSP-CT/GCE na presença de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI em diferentes valores de pH. ES: tampão Sörensen  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{step}}$ :  $5 \text{ mV}$ ;  $n=3$ .



O efeito da concentração do eletrólito de suporte sobre a oxidação da ERI também foi avaliado, mantendo-se o pH em 7,8 verificou-se a concentração da solução tampão Sörensen na faixa entre  $0,05$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 23** - Dependência da  $I_p$  com a concentração do eletrólito de suporte. **Inserido:** voltamogramas do eletrodo CBSP-CT/GCE na presença de ERI  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes concentrações do eletrólito de suporte ( $0,05 - 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ); ES: tampão Sörensen (pH 7,8)  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



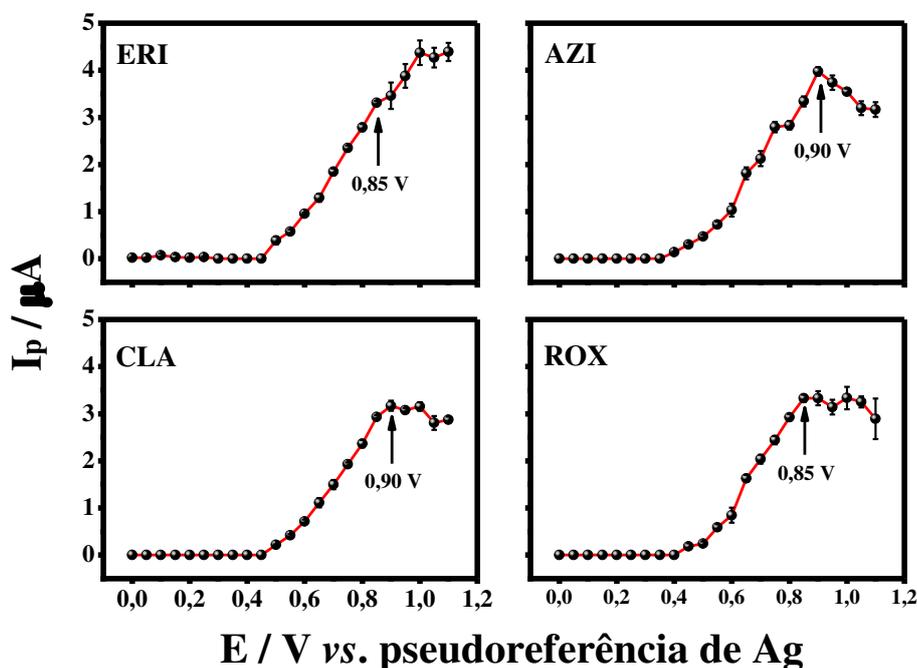
Os resultados obtidos neste teste estão apresentados na Figura 23. Nela observa-se que há um aumento da  $I_p$  à medida em que se aumenta a concentração do eletrólito de suporte. Dessa forma, escolheu-se  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  como a concentração do eletrólito de suporte para os testes posteriores.

### 5.3. Determinação de macrolídeos por BIA-AMP

Informações a respeito do processo de oxidação dos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX também foram obtidas em sistema BIA com detecção amperométrica. Para isso foi construído um voltamograma hidrodinâmico para cada um dos antibióticos, o qual foi obtido por meio da aplicação de potenciais ao eletrodo de trabalho que variaram em intervalos de 50 mV na faixa entre 0,0 e 1,1 V medindo-se a corrente em cada um dos potenciais sob sistema em fluxo. Os voltamogramas hidrodinâmicos para cada um dos compostos estão apresentados na Figura 24, cada ponto representa a média ( $n = 3$ ) da  $I_p$  em cada potencial.

A oxidação eletroquímica dos antibióticos macrolídeos estudados sob condições hidrodinâmicas inicia-se em potenciais próximos de +0,45 V, atingindo valores máximos de  $I_p$  em +0,85 V para ERI e ROX e, em +0,90 V para AZI e CLA. Os potenciais de oxidação obtidos em sistema hidrodinâmico diferem daqueles obtidos em sistema estacionário (item 5.3), isso deve-se, principalmente, ao fato de que nas medidas hidrodinâmicas os potenciais estão em função de um pseudoreferência de Ag, já nas medidas voltamétricas os potenciais então em função de Ag/AgCl, KCl<sub>(sat.)</sub>.

**Figura 24** - Voltamogramas hidrodinâmicos dos antibióticos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX obtidos a partir dos valores de  $I_p$  ( $n = 3$ ) em função dos potenciais aplicados no sistema BIA-AMP. ES: Tampão Sørensen 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,8); [macrolídeo] = 50 μmol L<sup>-1</sup>. Eletrodo: CBSP-CT/SPE.

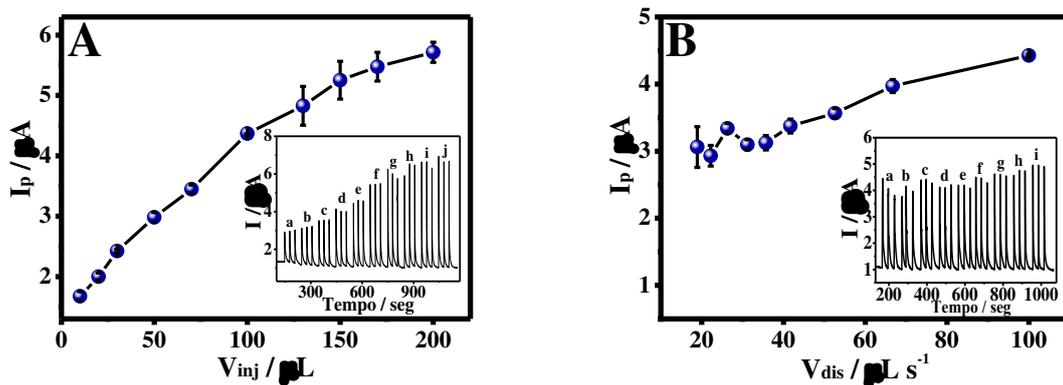


Os potenciais selecionados para as medidas amperométricas afetam diretamente a sensibilidade do método, porém a utilização de potenciais elevados aumenta o risco de possíveis interferentes, dessa forma, os potenciais citados acima foram selecionados para as medidas amperométricas por se tratarem dos menores valores de potenciais nos quais se obteve os maiores valores de  $I_p$  e menores valores de desvio padrão entre as triplicatas.

### 5.3.1. Otimização de parâmetros BIA

Após a escolha do eletrólito de suporte ideal para realização das análises e seleção do potencial a ser utilizado nas medidas amperométricas, a próxima etapa realizada foi a otimização dos parâmetros referente ao sistema BIA, mais precisamente aqueles relacionados à micropipeta eletrônica, sendo eles: volume de injeção ( $V_{inj}$ ) e velocidade de dispensa ( $V_{dis}$ ). Para isso, avaliou-se o sinal obtido a partir de injeções em triplicata ( $n = 3$ ) de solução padrão de ERI  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  variando-se cada um desses parâmetros. Na Figura 25 estão apresentados os resultados obtidos para ambas otimizações.

**Figura 25** – Otimização dos parâmetros do sistema BIA: variação do (A) Volume de injeção (a – j: 10 – 200  $\mu\text{L}$ ) ( $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ ) e (B) Velocidade de dispensa (a – i: 18,9 – 100  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) da micropipeta eletrônica ( $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ). **Inseridos:** Amperogramas obtidos a partir de injeções de solução padrão de ERI  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 3$ ). ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8).



Na otimização do volume de injeção (Figura 25A) pode-se observar um aumento significativo dos valores de  $I_p$  à medida em que se aumenta o volume de injeção, esse efeito é esperado, pois nesse caso, mais espécies chegam à superfície do detector e, conseqüentemente, maior será o sinal analítico. Entretanto, é possível observar também que volumes de injeção acima de 100  $\mu\text{L}$  geram maiores valores de desvio padrão ( $n = 3$ ) o que pode comprometer a precisão de método. Diante disso, o volume de 100  $\mu\text{L}$  foi definido como ideal para as análises posteriores.

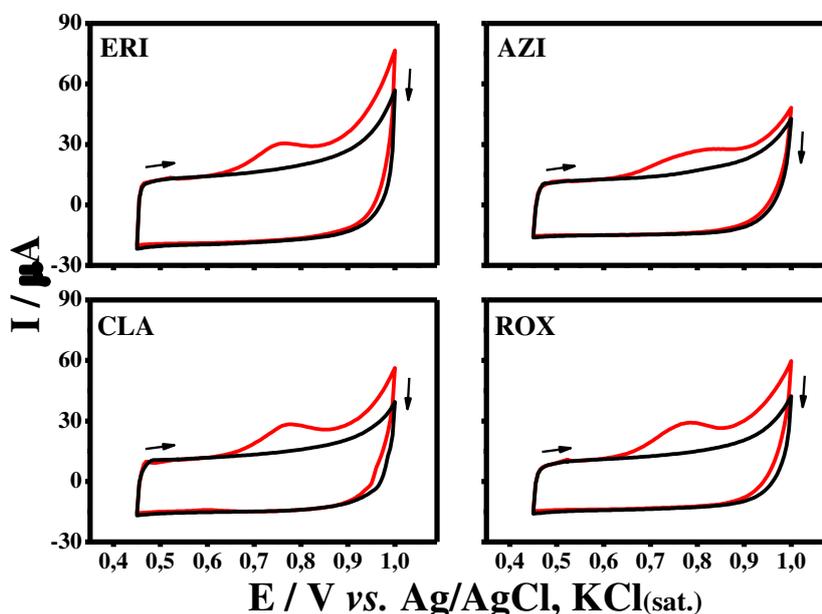
Já no teste de otimização da velocidade de dispensa (Figura 25B), em vazões mais baixas obteve-se menores valores de  $I_p$  com maiores valores de desvio padrão. Em contrapartida, ao se utilizar velocidades mais elevadas pôde-se observar um leve aumento de sinal com menores valores de desvio padrão entre as medidas. O maior sinal foi obtido à uma velocidade de dispensa de  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ . Dessa forma, essa foi a velocidade de dispensa escolhida para as demais análises.

#### 5.4. Perfil voltamétrico dos macrolídeos ERI, AZI, CLA e ROX

Após caracterização eletroquímica do CBSP-CT/GCE, otimização de parâmetros experimentais, bem como o desempenho do sensor proposto no estudo do comportamento eletroquímico do antibiótico macrolídeo ERI, averiguou-se a possibilidade de aplicação deste mesmo material para determinação de mais três antibióticos macrolídeos (CLA, AZI e ROX).

Os antibióticos macrolídeos AZI, CLA e ROX foram sintetizados a partir da ERI e, portanto, possuem estruturas moleculares bem semelhantes, além disso, trabalhos reportados na literatura atribuem o mesmo mecanismo de oxidação com base em estudos voltamétricos realizados com os quatro antibióticos [4,65]. Um comportamento semelhante a este foi observado ao registrar o voltamograma cíclico para esses compostos sobre o CBSP-CT/GCE nas mesmas condições experimentais, previamente otimizadas para a ERI, o qual está apresentado na Figura 26.

**Figura 26** - Voltamogramas cíclicos do CBSP-CT/GCE na ausência (—) e na presença (—) de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI, AZI, CLA e ROX. ES: tampão Sörensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Pode-se observar que, assim como a ERI, os demais antibióticos estudados (AZI, CLA e ROX) apresentam um pico de oxidação na mesma região de potencial, inclusive com algumas semelhanças nos valores de intensidade de corrente, como pode ser melhor analisado na Tabela 4, na qual estão apresentados os valores referentes a  $E_p$ ,  $E_{1/2}$  e  $I_p$  obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos.

**Tabela 4** - Dados experimentais de potencial de pico ( $E_p$ ), potencial de meia-onda ( $E_{1/2}$ ) e corrente de pico ( $I_p$ ) obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos.

	$E_p$ (V)*	$E_{1/2}$ (V)*	$I_p$ ( $\mu$ A)
<b>ERI</b>	0,76	0,69	12,1
<b>AZI</b>	0,79	0,72	10,3
<b>CLA</b>	0,78	0,72	13,1
<b>ROX</b>	0,78	0,71	14,0

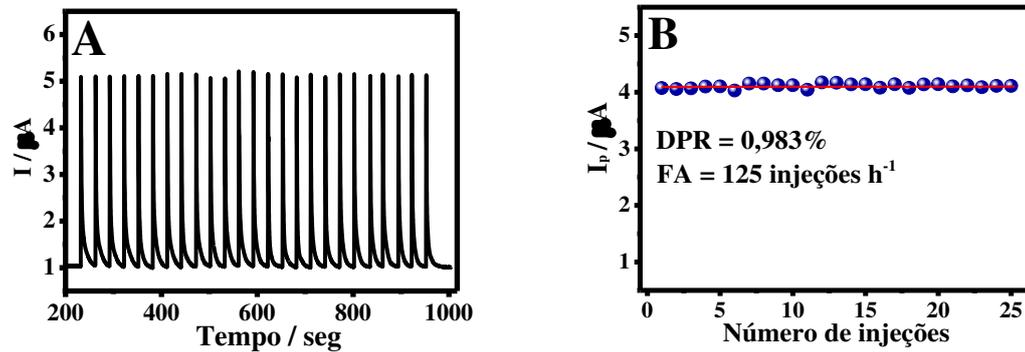
\* vs. Ag/AgCl, KCl<sub>(sat.)</sub>

A semelhança no perfil voltamétrico dos antibióticos analisados podem sugerir a possibilidade de aplicação do método proposto na determinação desses quatro compostos, utilizando as mesmas condições experimentais, em amostras que contenham um dos antibióticos macrolídeos estudados. Neste caso, a determinação desses antibióticos, de forma individual, será realizada empregando um sistema de análise por injeção em batelada com detecção amperométrica (BIA-AMP).

#### **5.4.1. Repetibilidade**

Um estudo de repetibilidade foi conduzido a fim de avaliar a precisão do método proposto na determinação dos macrolídeos (Figura 27). Para isso tomou-se como base o sinal analítico obtido a partir de uma série de 25 injeções consecutivas de solução padrão de ERI 50  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> sob as condições anteriormente otimizadas.

**Figura 27** – (A) Amperograma obtido a partir de injeções sucessivas de ERI  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 25$ ) no sistema BIA.  $E_t = +0,85 \text{ V}$ ; ES: tampão Sörensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Eletrodo: CBSP-CT/SPE. (B) Gráfico de pontos obtido a partir da variação de corrente em cada injeção.



Avaliando-se os resultados apresentados na Figura 27 é possível observar que não há flutuação significativa nos valores e  $I_p$  ao longo de 25 injeções consecutivas de solução contendo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI, fato comprovado pelo baixo desvio padrão relativo da análise ( $< 1,0 \%$ ). A partir desses resultados pôde-se também estimar a frequência analítica (FA) do método a partir do número de injeções realizadas em um dado espaço de tempo. O valor estimado de FA para o método proposto foi de  $125 \text{ injeções h}^{-1}$ , sendo esse extremamente superior aos de métodos cromatográficos reportados na literatura para análises desses compostos [55,82].

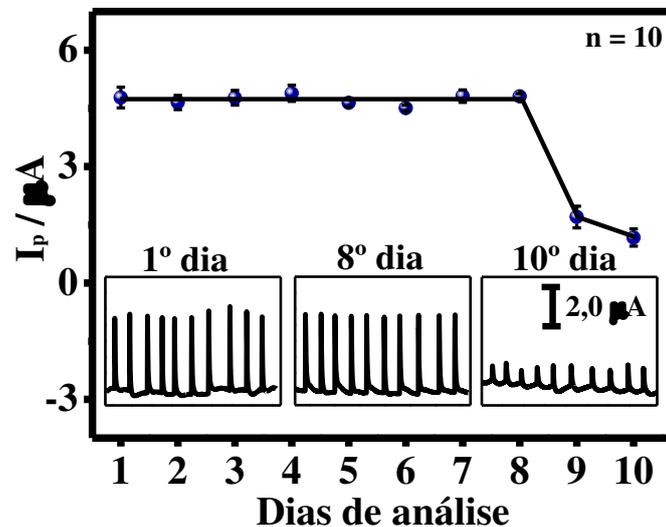
#### 5.4.2. Reprodutibilidade

A fim de avaliar a reprodutibilidade da metodologia proposta, um estudo foi realizado por meio da execução de uma sequência de análises de análises ao longo de 10 dias consecutivos. Nelas, eram injetadas solução padrão com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ERI sob as condições experimentais otimizadas anteriormente, empregando o mesmo SPE o qual era modificando diariamente antes de cada análise. Os resultados obtidos nessa etapa estão apresentados na Figura 28.

Os resultados obtidos mostram a boa reprodutibilidade do sistema até o 8º dia de análise. As várias modificação da superfície do eletrodo apresentaram valores de corrente reprodutíveis, sendo confirmado pelo baixo DPR obtido, o qual foi de  $2,6 \%$  ( $1^\circ - 8^\circ$  dia). Além disso, pôde-se comprovar que os SPE's comerciais empregados, os quais em tese seriam descartáveis, puderam ser reutilizados por pelo menos 8 dias consecutivos sem prejuízos em seu desempenho, isso deve-se ao fato de que ao final de cada análise o modificante era removido sem comprometer a integridade do eletrodo impresso. Após o 8º dia observa-se uma queda

acentuada dos valores de corrente, indicando que a partir de então o SPE necessita ser substituído.

**Figura 28** - Estudo de reprodutibilidade para o CBSP-CT/SPE obtidos por meio da média de 10 injeções de solução de ERI ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ao longo de 10 dias.  $E_t = +0,85 \text{ V}$ ; ES: tampão Sørensen  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ . **Inseridos:** Amperogramas obtidos no 1º, 8º e 10º dia de análise.

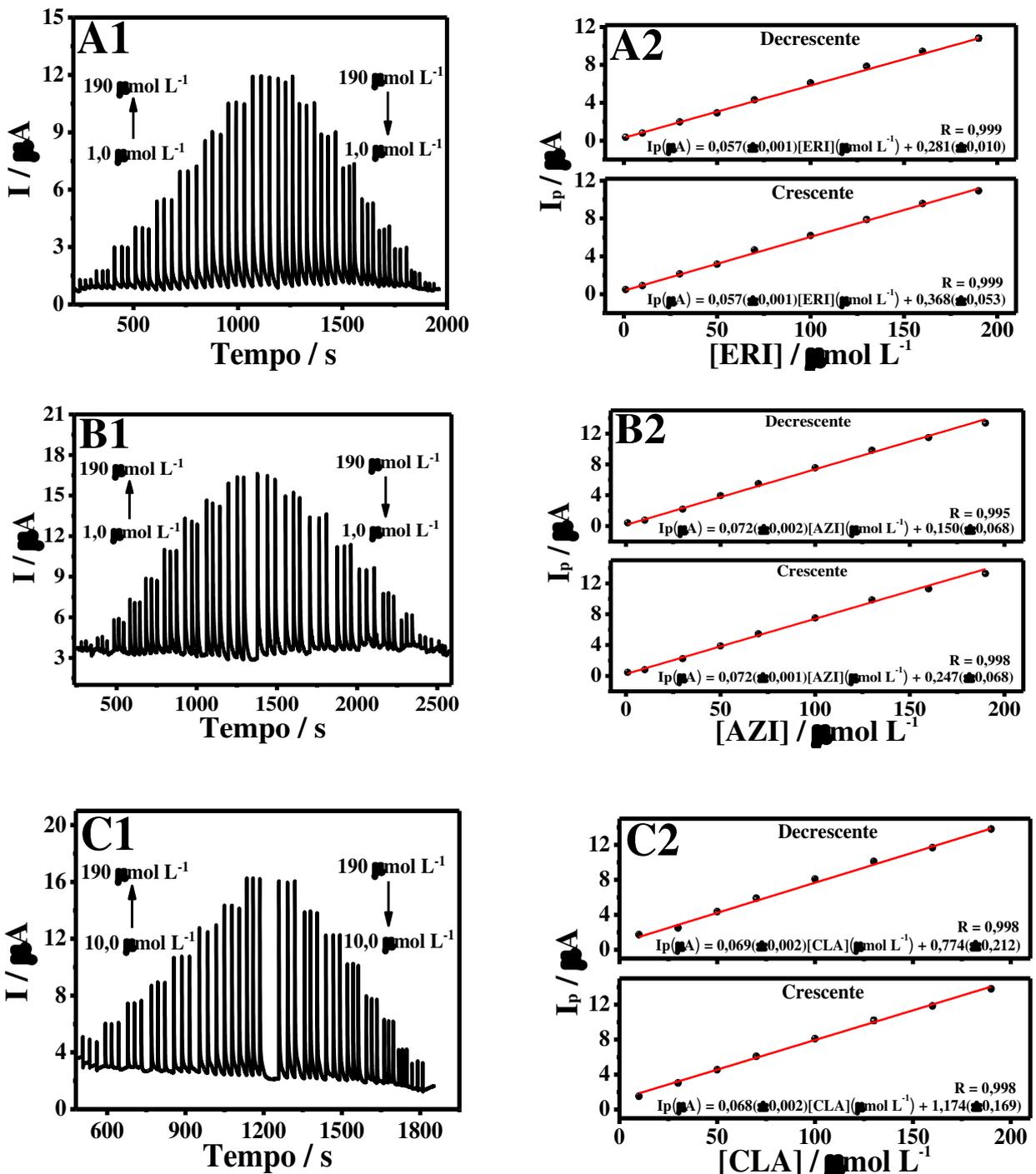


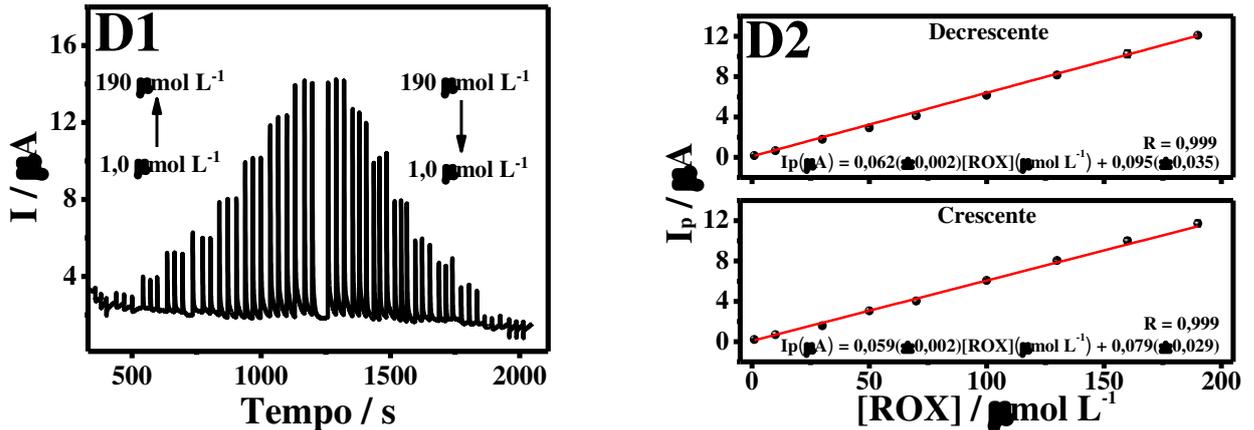
#### 5.4.3. Linearidade

Um teste para avaliar a linearidade da resposta analítica do CBSP-CT/SPE em sistema BIA para os quatro antibióticos (ERI, AZI, CLA e ROX) foi executado por meio da injeção de soluções padrão desses compostos em uma ampla faixa de concentração (Figura 29). As injeções foram realizadas em ordem crescente e decrescente de concentração e em uma faixa que varia entre  $1,0$  e  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados na Figura 29 demonstram o comportamento linear dos quatro antibióticos estudados, sendo caracterizado por valores de coeficientes de correlação próximos da unidade ( $R \geq 0,995$ ). O sistema não apresentou comportamento linear para concentrações mais levadas. Os valores de coeficiente angular para as medidas crescente e decrescente de concentração corroboram entre si, mostrando a não ocorrência de efeito memória ou de contaminação do eletrodo de trabalho.

**Figura 29** – Resposta amperométrica obtida em sistema BIA-AMP por meio de injeções ( $n = 3$ ) de soluções padrão de ERI (A1), AZI (B1), CLA (C1) e ROX (D1) em diferentes concentrações e curvas de calibração obtidas a partir dos valores de  $I_p$  nos sentidos crescente e decrescente de concentração para ERI (A2), AZI (B2), CLA (C2) e ROX (D2). ES: tampão Sörensen 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,8);  $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ ;  $V_{dis} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$ .





A partir dos resultados obtidos por meio do teste de linearidade, pôde-se ainda estimar os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema proposto na determinação de cada um dos antibióticos, de acordo com as regras definidas pela IUPAC, na qual:

$$LD = \frac{3 \times S_b}{a} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10 \times S_b}{a} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

$S_b$  = desvio padrão relativo ao branco;

$a$  = coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do método).

Os valores de sensibilidade ( $a$ ), bem como de LD e LQ obtidos para cada um dos antibióticos macrolídeos estudados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Valores de sensibilidade ( $a$ ), LD e LQ do método proposto.

	$a$ ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
<b>ERI</b>	0,057	0,19	0,63
<b>AZI</b>	0,072	0,15	0,50
<b>CLA</b>	0,068	0,16	0,53
<b>ROX</b>	0,060	0,18	0,60

Os baixos limites de detecção e quantificação obtidos pelo sistema proposto evidenciam as vantagens deste quando comparado a sensores reportados na literatura para determinação de ERI [65], AZI [4], CLA [121] e ROX [122]. Embora alguns dos sensores citados utilizem de metodologias de modificação mais sofisticadas e de maior custo, seus limites de detecção e quantificação são maiores do que os obtidos neste trabalho. Além disso, um único sistema aqui proposto, empregando os mesmos parâmetros, pode ser aplicado na determinação de qualquer

um dos antibióticos estudados, enquanto a maioria dos trabalhos reportados na literatura aplica-se à determinação de um ou dois compostos.

Ao se comparar as figuras de mérito do sistema aqui proposto com métodos de análise em fluxo (FIA) reportados na literatura para determinação de AZI (uma vez que não há referências à determinação dos demais antibióticos macrolídeos utilizando essa metodologia), observa-se que o método desenvolvido neste trabalho apresentou menores valores de LD e LQ, maior sensibilidade e FA mais elevada [68,123].

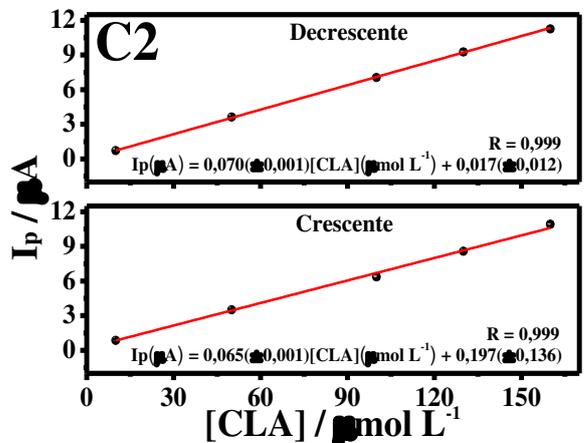
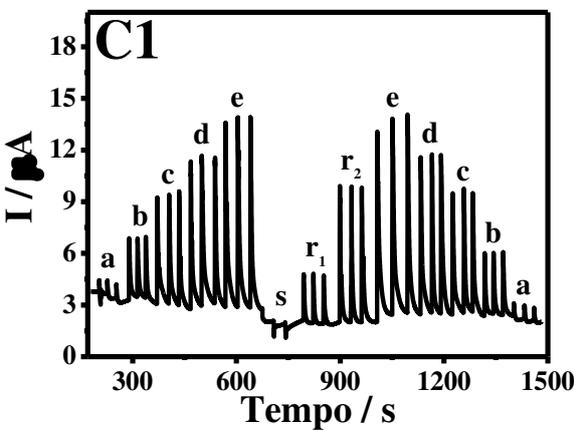
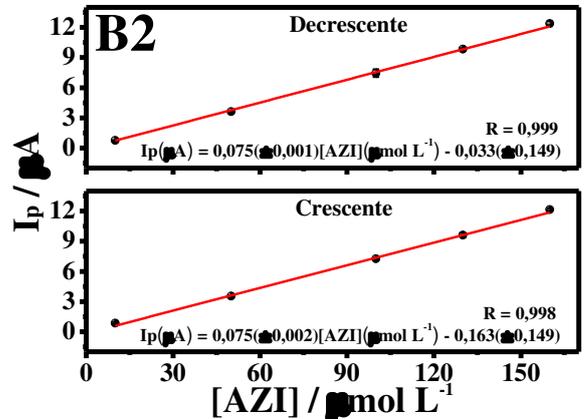
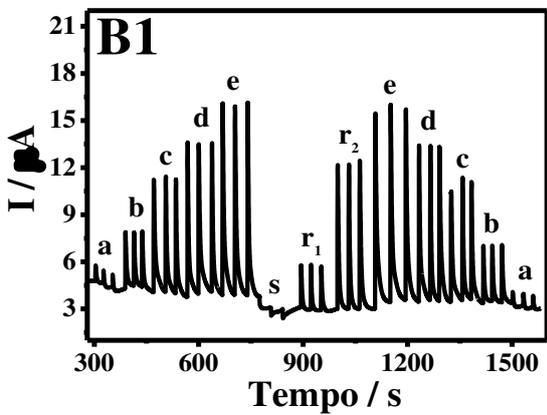
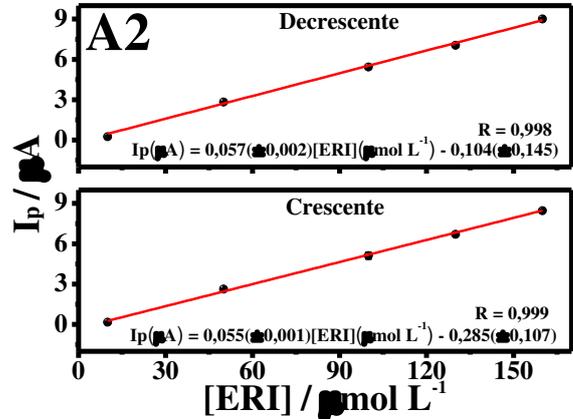
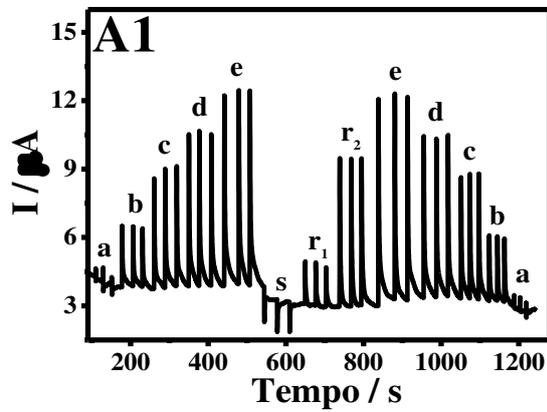
#### ***5.4.4. Determinação dos macrolídeos em amostra ambiental***

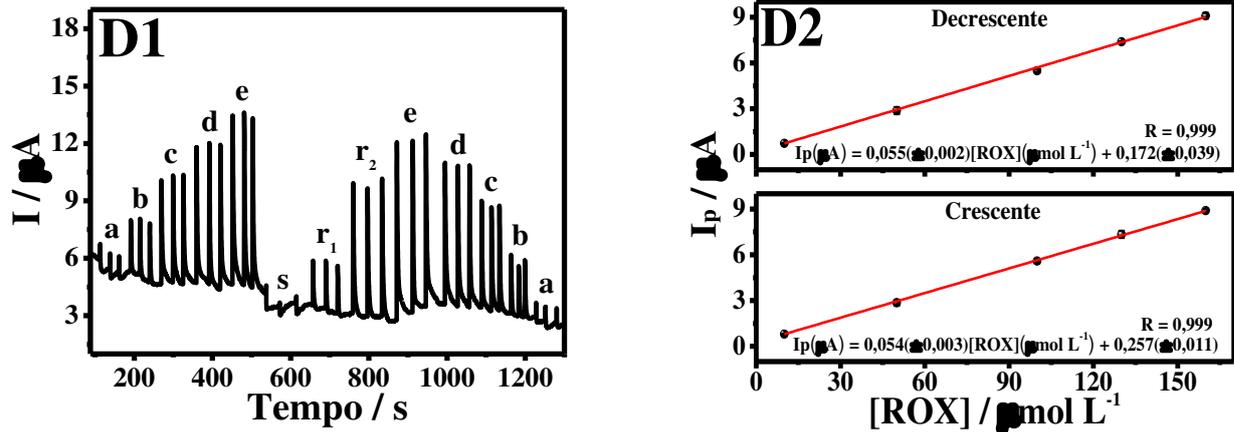
O método proposto foi aplicado na determinação dos quatro antibióticos macrolídeos em amostras de água coletadas na “Lagoa do Jambreiro” localizada no interior da Universidade Federal do Maranhão campus São Luís. Apesar da complexidade da amostra, os testes foram realizados sem que houvesse a necessidade da realização de um pré-tratamento desta, evidenciando uma das vantagens dos métodos eletroanalíticos.

Os testes foram realizados, para cada um dos antibióticos, construindo-se uma curva analítica com soluções padrão destes compostos em ordem crescente de concentração (10 – 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), na sequência realizaram-se injeções da amostra pura, previamente diluída 5 vezes no eletrólito de suporte, seguida de injeções da amostra fortificada com cada um dos analitos em duas concentrações conhecidas ( $r_1$  e  $r_2$ ). Uma nova curva de calibração no sentido decrescente de concentração (160 – 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi construída ao final, para verificar possível ocorrência de efeito memória ou de contaminação do eletrodo. Os resultados obtidos para cada um dos compostos estão apresentados na Figura 30.

Assim como no teste de linearidade, os resultados obtidos nos testes de aplicação em amostra ambiental demonstram o comportamento linear do sistema ( $R \geq 0,998$ ) para injeções das soluções padrão de cada um dos compostos (a – e) e valores de sensibilidade muito próximos daqueles obtidos no teste anterior para os respectivos antibióticos, evidenciando a boa reprodutibilidade do sistema. As análises empregando a amostra de água, injeções identificadas por (s), não detectaram a presença de nenhum dos antibióticos, ou estão presentes em concentrações inferiores ao limite de detecção do método.

**Figura 30** - Amperograma obtido por meio de injeções (n = 3) em sistema BIA de soluções padrão de ERI (A1), AZI (B2), CLA (C1) e ROX (D1) em diferentes concentrações (a – e: 10 - 160 μmol L<sup>-1</sup>), amostra de água (s) e amostra fortificada em duas concentrações dos respectivos padrões (r<sub>1</sub> e r<sub>2</sub>). ES: tampão Sörensen 0,5 mol L<sup>-1</sup>(pH 7,8); V<sub>inj</sub> = 100 μL; V<sub>dis</sub> = 100 μL s<sup>-1</sup>. Curvas de calibração obtidas a partir dos valores de I<sub>p</sub> nos sentidos crescente e decrescente de concentração de ERI (A2), AZI (B2), CLA (C2) e ROX (D2).





A exatidão do método foi avaliada por meio do teste de adição e recuperação utilizando a amostra de água fortificada em duas concentrações diferentes para cada um dos antibióticos, e o valor recuperado, em porcentagem, foi obtido a partir da Equação 6.

$$\% Rec = \frac{[Amostra]_f - [Amostra]_p}{[Fortificação]} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

$[Amostra]_f$  = concentração da amostra fortificada;

$[Amostra]_p$  = concentração da amostra pura, ou antes da fortificação;

$[Fortificação]$  = concentração utilizada na fortificação;

Os resultados obtidos nessa etapa (Tabela 6) demonstram que os valores de porcentagem de recuperação para os quatro antibióticos estão em uma faixa entre 96,01 e 104,7 %, o que mostra a boa exatidão do método e a possibilidade de aplicação do CBSP-CT/SPE acoplado ao sistema BIA para determinação desses macrolídeos em amostras ambientais de água.

**Tabela 6** - Teste de adição e recuperação em amostra ambiental para ERI, AZI, CLA e ROX.

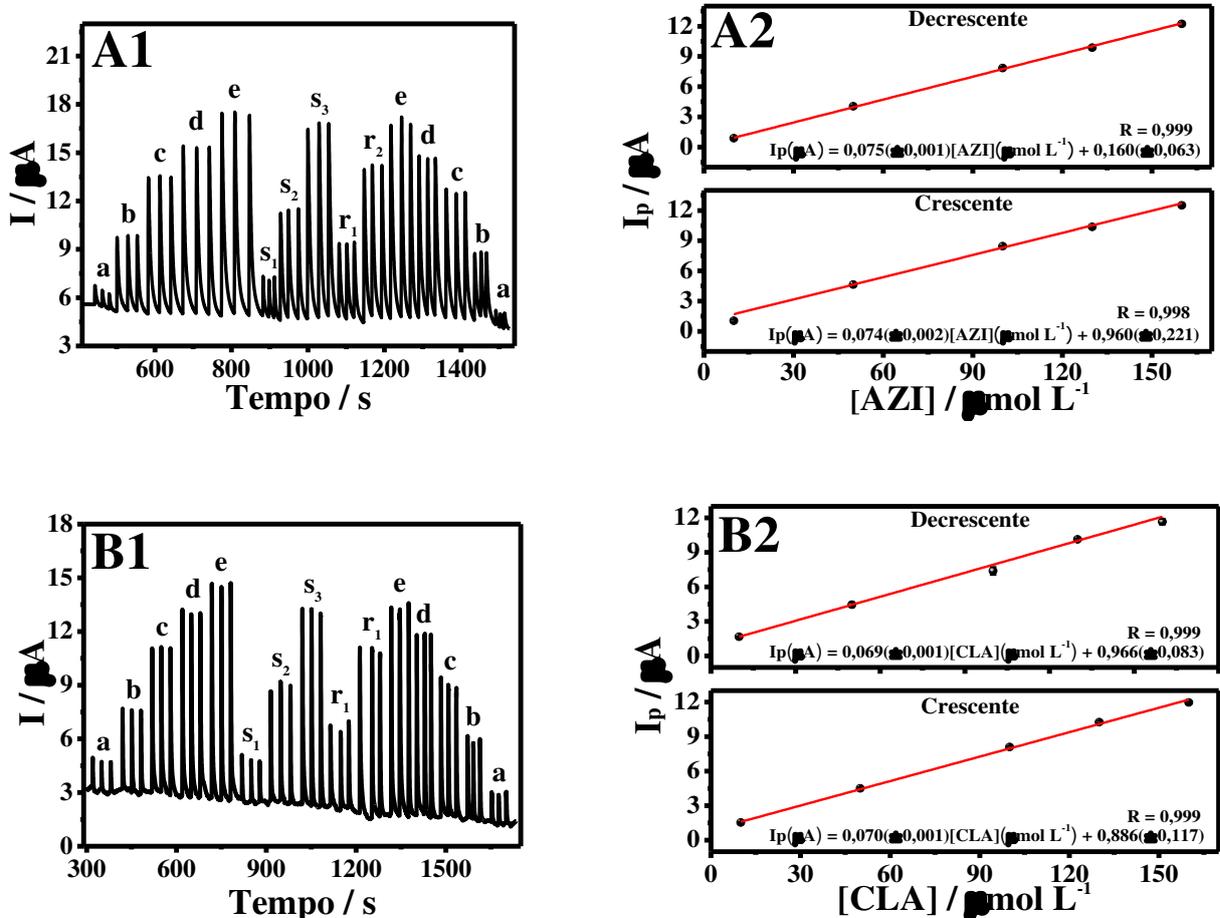
		Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
<b>ERI</b>	<b>s</b>	0	< LD	-
	<b>r<sub>1</sub></b>	40	38,4 ( $\pm$ 1,5)	96 ( $\pm$ 3,8)
	<b>r<sub>2</sub></b>	120	122,8 ( $\pm$ 0,7)	102,3 ( $\pm$ 0,6)
<b>AZI</b>	<b>s</b>	0	< LD	-
	<b>r<sub>1</sub></b>	40	39,2 ( $\pm$ 1,3)	98,1 ( $\pm$ 3,4)
	<b>r<sub>2</sub></b>	120	125,6 ( $\pm$ 2,0)	104,7 ( $\pm$ 1,7)
<b>CLA</b>	<b>s</b>	0	< LD	-
	<b>r<sub>1</sub></b>	40	39,5 ( $\pm$ 1,6)	98,8 ( $\pm$ 4,1)
	<b>r<sub>2</sub></b>	120	117,4 ( $\pm$ 1,7)	97,81 ( $\pm$ 1,3)
<b>ROX</b>	<b>s</b>	0	< LD	-
	<b>r<sub>1</sub></b>	40	39,6 ( $\pm$ 1,2)	99,9 ( $\pm$ 3,0)
	<b>r<sub>2</sub></b>	120	123,2 ( $\pm$ 4,7)	102,6 ( $\pm$ 3,9)

#### 5.4.5. Determinação em amostras de fármacos

O sensor proposto (CBSP-CT/SPE) acoplado ao sistema BIA-AMP também foi empregado na determinação dos antibióticos macrolídeos AZI e CLA em amostras farmacêuticas, as quais consistiram em cápsulas destes medicamentos que, de acordo com o rótulo, contém 500 mg do respectivo composto em cada cápsula. Determinação nos fármacos ERI e ROX não foram realizadas em função da dificuldade na aquisição destes medicamentos.

As curvas de calibração (Figura 31) foram construídas por meio de injeções ( $n = 3$ ) de cada um dos compostos, levando-se em consideração a faixa linear para a AZI e CLA, representados por letras **a – e**. Na sequência foram injetadas três soluções preparadas a partir das cápsulas de cada um dos antibióticos e diluídas em concentrações diferentes, identificadas por: **s<sub>1</sub>**, **s<sub>2</sub>** e **s<sub>3</sub>**. Tomando-se a solução (**s<sub>1</sub>**), foi esta fortificada com padrão do respectivo antibiótico em duas concentrações distintas, para realização do teste de adição e recuperação, e estão representadas por: **r<sub>1</sub>** e **r<sub>2</sub>**.

**Figura 31** - Amperograma obtido por meio da injeção ( $n = 3$ ) em sistema BIA de soluções padrão de AZI (A1) e CLA (A2) (a - e: 10 - 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), soluções de amostra do fármaco ( $s_1$ ,  $s_2$  e  $s_3$ ) e amostra  $s_1$  fortificada em duas concentrações ( $r_1$  e  $r_2$ ). ES: tampão Sørensen 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7,8);  $E = +0,90$  V;  $V_{\text{inj}} = 100$   $\mu\text{L}$ ;  $V_{\text{dis}} = 100$   $\mu\text{L s}^{-1}$ . Curvas de calibração obtidas a partir dos valores de  $I_p$  nos sentidos crescente e decrescente de concentração de AZI (A2) e CLA (B2).



Novamente, não foram observados efeito memória ou de contaminação do eletrodo, mesmo após tantas injeções de soluções padrão e de amostras os sinais obtidos nas injeções em ordem crescente e decrescente de concentração são semelhantes.

Os dados numéricos referentes às determinações em amostras farmacêuticas estão representados na Tabela 7. Com estes resultados observa-se que os valores referentes à massa de AZI e CLA contida em cápsulas desses medicamentos, apesar de próximos, foram inferiores ao valor descrito no rótulo (0,500 g/cápsula), porém todas as amostras analisadas estão dentro da faixa aceitável pela Farmacopeia Brasileira em relação à quantidade declarada no rótulo do medicamento, a qual compreende valores entre 90% e 110% (0,450 – 0,550 g) em massa do medicamento por cápsula para ambos os compostos [57]. O teste de adição e recuperação

mostrou a exatidão do método na determinação de AZI e CLA em amostras farmacêuticas (Tabela 7), fato comprovado por valores de recuperação próximos de 100% para os dois antibióticos.

**Tabela 7** - Determinação de AZI e CLA em amostras farmacêuticas e teste de adição e recuperação.

		Conc. encontrada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Massa encontrada (g/cápsula)	Teste de adição e recuperação			
	<b>S<sub>1</sub></b>	19,7 ± 1,7	0,484 ± 0,04	<b>Adicionado</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>Recuperado</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>Recuperação</b> (%)	
<b>AZI</b>	<b>S<sub>2</sub></b>	77,2 ± 0,3	0,478 ± 0,01	<b>r<sub>1</sub></b>	30	29,9 ± 0,9	99,6 ± 3,0
	<b>S<sub>3</sub></b>	147,8 ± 2,2	0,491 ± 0,01	<b>r<sub>2</sub></b>	100	95,6 ± 1,8	95,6 ± 1,8
	<b>S<sub>1</sub></b>	19,5 ± 1,9	0,487 ± 0,05	<b>Adicionado</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>Recuperado</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>Recuperação</b> (%)	
<b>CLA</b>	<b>S<sub>2</sub></b>	78,8 ± 4,1	0,488 ± 0,02	<b>r<sub>1</sub></b>	30	31,5 ± 3,4	105,1 ± 9,4
	<b>S<sub>3</sub></b>	143,8 ± 1,6	0,479 ± 0,01	<b>r<sub>2</sub></b>	100	100,8 ± 2,3	100,8 ± 2,3

A Tabela 8 apresenta um comparativo das características analíticas do método proposto com alguns dos principais métodos eletroanalíticos e de análise em fluxo publicados na literatura para determinação de ERI, AZI, CLA e ROX.

O sistema proposto nesse trabalho apresentou desempenho analítico superior a ambos os métodos em fluxo (FIA), até o momento desenvolvidos para determinação de AZI, com ganho tanto em sensibilidade quanto em frequência analítica [68,123], já os sensores preparados a partir de polímeros molecularmente impressos (MIP's) desempenharam performance analítica relacionada à faixa linear e LD melhores do que o proposto nesse trabalho [74,121]. Porém, levando-se em consideração que nos processos de preparo dos MIP's há, geralmente, a necessidade da utilização de grandes volumes de solventes orgânicos e longo tempo de preparo, o método proposto nesse trabalho destaca-se frente a esses por serem fáceis de preparar, mínimo consumo de solvente orgânico, baixo custo e rapidez no preparo.

**Tabela 8** - Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos eletroanalíticos e em fluxo para determinação de ERI, AZI, CLA e ROX reportados na literatura.

Analito (s)	Técnica	Detecção	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	FA (análises $\text{h}^{-1}$ )	Amostra (s)	Referência
AZI CLA ROX	VOQ	Hg(Ag)FE	6,42 – 31,1 2,62 – 38,2 1,77 – 30,9	1,92 0,79 0,53	NM	Fármaco	[4]
ERI	FIA	SDS/SPCE	1,36 – 34,1	0,19	NM	Ambiental (água)	[34]
ERI	VOQ	Hg(Ag)FE	6,17 – 40,6	1,85	NM	Fármaco Urina	[47]
ERI	VOQ	DDB	6,8 – 81,1	1,1	NM	Ambiental (água)	[65]
AZI	FIA	UV-Vis $\lambda = 540 \text{ nm}$	$66,7 - 2,14 \times 10^3$	8,81	65	Fármaco	[68]
AZI	VPD	MIP	0,5 – 10,0	0,08	NM	Ambiental (água)	[74]
CLA	PTM	MIP	1 – 5000	0,8	240	Fármaco	[121]
ROX	CCM	SWNT/GC	5 - 100	0,5	NM	Fármaco	[122]
AZI	FIA	UV-Vis $\lambda = 525 \text{ nm}$	5,34 – 26,7	3,94	60	Fármaco	[123]
ERI AZI CLA ROX	AMP	CBSP-CT/GCE	1,0 – 190 1,0 – 190 10,0 – 190 1,0 – 190	0,19 0,15 0,16 0,18	125	Ambiental (água) Fármaco	Este trabalho

VOQ – Voltametria de onda quadrada; Hg(Ag)FE – Eletrodo de filme de amálgama de prata; DDB: Diamante dopado com boro; FIA – Análise por Injeção em Fluxo; SDS/SPCE – Eletrodo impresso de carbono modificado como dodecilsulfato de sódio; MIP – polímero molecularmente impresso; SWNT/GC – Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes simples; UV-Vis – Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível; AMP – amperometria. VPD – Voltametria de pulso diferencial; NM – não mencionado; PTM – Potenciometria; CCM – Cronocoulometria.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado a potencialidade do uso de nanomateriais de carbono, neste caso carbon black Super P, como modificante em eletrodos de carbono impresso, para determinação de quatro antibióticos macrolídeos (ERI, AZI, CLA e ROX) empregando Sistema BIA com detecção amperométrica. Otimizações realizadas tanto no modificante quanto em parâmetros do sistema garantiram melhor desempenho analítico como, baixos limites de detecção e quantificação, ampla faixa linear, alta sensibilidade e elevada frequência analítica. Além disso, permite aplicação do mesmo método, sem grandes alterações, para determinar qualquer um dos quatro compostos, com uma das vantagens do sistema BIA, que é possibilidade de realização de análises “*in situ*”.

O método foi aplicado com sucesso na determinação dos quatro antibióticos macrolídeos em amostra ambiental e farmacêuticas, nos quais os resultados obtidos demonstraram a exatidão do método proposto, possuindo assim, características atraentes para aplicação deste em análises de rotina.

## REFERÊNCIAS

[1] DANNER, M. C. et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. **Science of the Total Environment**, v. 664, p. 793–804, 2019.

[2] JENDRZEJEWSKA, N.; KARWOWSKA, E. The influence of antibiotics on wastewater treatment processes and the development of antibiotic-resistant bacteria. **Water Science and Technology**, v. 77, n. 9, p. 2320–2326, 2018.

[3] AYANKOJO, A. G. et al. Sulfamethizole-imprinted polymer on screen-printed electrodes: Towards the design of a portable environmental sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 320, n. July, p. 128600, 2020.

[4] VAJDLE, O. et al. Voltammetric behavior and determination of the macrolide antibiotics azithromycin, clarithromycin and roxithromycin at a renewable silver – amalgam film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 229, p. 334–344, 2017.

[5] MAHMOUDI, A. et al. Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 285–291, 2015.

[6] MIROSHNYK, I. et al. A new insight into solid-state conformation of macrolide antibiotics. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 232–239, 2008.

[7] SHERAZI, S. et al. Brief Overview of Frequently Used Macrolides and Analytical Techniques for their Assessment. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, p. 324–338, 2019.

[8] VELOSO, W. B. et al. Flow-through amperometric determination of ampicillin using a copper electrode in a batch injection analysis system. **Measurement**, v. 155, p. 107516, 2020.

[9] ALI, M. Y.; ALAM, A. U.; HOWLADER, M. M. R. Fabrication of highly sensitive bisphenol a electrochemical sensor amplified with chemically modified multiwall carbon nanotubes and  $\beta$ -cyclodextrin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 320, p. 128319, 2020.

[10] ARDUINI, F. et al. Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio)sensor design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 156, p. 112033, 2020.

[11] MAZZARACCHIO, V. et al. Inside the different types of carbon black as nanomodifiers for screen-printed electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 317, p. 673–683, 2019.

[12] TALARICO, D. et al. Carbon black as successful screen-printed electrode modifier  
Veloso, William B. (2021)

for phenolic compound detection. **Electrochemistry Communications**, v. 60, p. 78–82, 2015.

[13] ARDUINI, F. et al. Carbon Black-Modified Screen-Printed Electrodes as Electroanalytical Tools. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 743–751, 2012.

[14] ROCHA, D. P. et al. Batch-injection Analysis Better than ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-site Applications. **Electroanalysis**, v. 30, n. 7, p. 1386–1399, 2018.

[15] CAETANO, L. P. et al. Carbon-nanotube Modified Screen-printed Electrode for the Simultaneous Determination of Nitrite and Uric Acid in Biological Fluids Using Batch-injection Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 30, n. 8, p. 1862–1871, 2018.

[16] SILVA, S. C. et al. Reduced graphene oxide/multi-walled carbon nanotubes/prussian blue nanocomposites for amperometric detection of strong oxidants. **Materials Chemistry and Physics**, v. 250, n. March, p. 123011, 2020.

[17] KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, JOSEPH H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koorgan S.A., 1988.

[18] CHANG, X. et al. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1444–1450, 2010.

[19] KEMPER, N. et al. Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. **Agricultural Water Management**, v. 95, n. 11, p. 1288–1292, 2008.

[20] MCARDELL, C. S. et al. Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 24, p. 5479–5486, 2003.

[21] GRUTES, J. et al. Avaliação de diferentes métodos de extração para a identificação de resíduos de macrolídeos em alimentos infantis industrializados à base de carne por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 214–220, 2019.

[22] SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Aspectos Analíticos E Regulatórios Na Determinação De Resíduos De Macrolídeos Em Alimentos De Origem Animal Por Cromatografia Líquida Associada À Espectrometria De Massas. **Química Nova**, v. 36, n.

3, p. 449–461, 2013.

[23] JOHNSTON, S. L. Macrolide antibiotics and asthma treatment. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 6, p. 1233–1236, 2006.

[24] BEIGELMAN, A. et al. Azithromycin Attenuates Airway Inflammation in a Noninfectious Mouse Model of Allergic Asthma. **CHEST**, v. 136, n. 2, p. 498–506, 2009.

[25] DOUGLAS, L. C.; CHOI, J.; ESTEBAN-CRUCIANI, N. Azithromycin treatment in children hospitalized with asthma: a retrospective cohort study. **Journal of Asthma**, v. 57, n. 5, p. 525–531, 2020.

[26] FAN, B. et al. Design , synthesis and structure-activity relationships of novel 15-membered macrolides: Quinolone / quinoline-containing sidechains tethered to the C-6 position of azithromycin acylides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 193, p. 112222, 2020.

[27] SUREKHA, G.; RAMAKRISHNA, N.; NAGAMALLIKA, G. A validated stability indicating RP-UPLC method for determination of erythromycin estolate in pharmaceutical formulation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 12, p. 5287–5293, 2018.

[28] WANG, J. Analysis of macrolides antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 50–92, 2009.

[29] AYANKOJO, A. G. et al. Molecularly imprinted polymer-based sensor for electrochemical detection of erythromycin. **Talanta**, v. 209, n. July 2019, p. 120502, 2020.

[30] VELLANO, P. O.; PAIVA, M. J. M. O uso de antimicrobiano na COVID-19 e as infecções: o que sabemos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 1–9, 2020.

[31] PANI, A. et al. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 2, p. 106053, 2020.

[32] FRANZEN RAMOS, L. et al. Mineralization of erythromycin by UV-based and electro-oxidation processes. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, n. November 2019, p. 101039, 2020.

[33] HABIBI, B. et al. Development and validation of a rapid hplc method for

multiresidue determination of erythromycin, clarithromycin, and azithromycin in aquaculture fish muscles. **Acta Chromatographica**, v. 31, n. 2, p. 109–112, 2019.

[34] VESELI, A. et al. Electrochemical determination of erythromycin in drinking water resources by surface modified screen-printed carbon electrodes. **Microchemical Journal**, v. 148, n. January, p. 412–418, 2019.

[35] KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

[36] CHEMSPIDER. **No Title**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.12041.html?rid=870f20c8-6046-406c-b013-3891923708f2>>. Acesso em: 23 apr. 2020.

[37] MAHMOUDI, A.; BOUKHECHEM, M. S. Simplified HPLC method for simultaneous determination of erythromycin and tretinoin in topical gel form. **Separation Science Plus**, n. November 2019, p. 1–8, 2020.

[38] WHO. **Model List of Essential Medicines (19th List)**. [s.l.] World Health Organization, 2015.

[39] SUN, Y. et al. Preparation of erythromycin imprinted polymer by metal-free visible-light – induced ATRP and its application in sensor. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 23, p. 583–590, 2019.

[40] SEIFRTOVÁ, M. et al. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 2, p. 158–179, 2009.

[41] MAJER, J. In vitro induction of resistance to erythromycin by its metabolite. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 628–633, 1981.

[42] ESTEBAN, S. L.; MANZO, R. H.; ALOVERO, F. L. Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 53–57, 2009.

[43] CAO, X. et al. Solubility determination and correlation for azithromycin monohydrate and dihydrate in solvent mixtures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 301, p. 112398, 2020.

[44] CHAVADA, V. D. et al. Surface plasmon resonance based selective and sensitive colorimetric determination of azithromycin using unmodified silver nanoparticles in pharmaceuticals and human plasma. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 97–103, 2017.

[45] STOIAN, I. A. et al. Biomimetic electrochemical sensor for the highly selective detection of azithromycin in biological samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 155, n. November 2019, p. 112098, 2020.

[46] ÖZTÜRK, A. A.; AYGÜL, A.; ŞENEL, B. Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101240, 2019.

[47] VAJDLE, O. et al. Voltammetric behavior of erythromycin ethylsuccinate at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in urine and in a pharmaceutical preparation. **Electrochimica Acta**, v. 191, p. 44–54, 2016.

[48] AMANI, N.; SHOKRZADEH, M.; SHAKI, F. Clarithromycin effectively enhances doxorubicin-induced cytotoxicity and apoptosis in MCF7 cells through dysregulation of autophagy. **Advances in Medical Sciences**, v. 65, p. 235–243, 2020.

[49] BRYSKIER, A. Roxithromycin : review of its antimicrobial activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 1–21, 1998.

[50] SINGH, R. D. et al. Development and Validation of Ultra High Performance Liquid Chromatographic (UHPLC) Method for the Determination of Roxithromycin in the Broiler Plasma. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 31, n. 6, p. 1–8, 2019.

[51] WANG, J. et al. Capillary electrophoresis with gold nanoparticles enhanced electrochemiluminescence for the detection of roxithromycin. **Talanta**, v. 76, p. 85–90, 2008.

[52] SHERAZI, S. T. H.; ALI, M.; MAHESAR, S. A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n. 1, p. 115–118, 2011.

[53] HANG, T. et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in human plasma by LC-MS / MS. **Clinica Chimica Acta**, v. 382, p. 20–24, 2007.

[54] LICUL-KUCERA, V. et al. A filtration optimized on-line SPE–HPLC–MS/MS method for determination of three macrolide antibiotics dissolved and bound to suspended solids in surface water. **Microchemical Journal**, v. 148, n. January, p. 480–492, 2019.

[55] SONG, X. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 208, p. 169–176, 2016.

[56] GONZÁLEZ DE LA HUEBRA, M. J.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A. R. A multiresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC-ECD). **Analytica Chimica Acta**, v. 517, n. 1–2, p. 53–63, 2004.

[57] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira - volume 2. **6ª Edição**, v. 2, p. 1–1504, 2019.

[58] BERNABÉU, J. A. et al. Microbiological bioassay of erythromycin thiocyanate: Optimisation and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 2, p. 347–353, 1999.

[59] ANDREOTTI, P. E.; MORSE, I. S.; HARTMANN, D. M. Microbioluminometry Assay: Determination of Erythromycin Activity in Plasma or Serum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 12, p. 979–985, 1989.

[60] ASHOUR, S.; BAYRAM, R. Novel spectrophotometric method for determination of some macrolide antibiotics in pharmaceutical formulations using 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 99, p. 74–80, 2012.

[61] BOSSCHE, L. VAN DEN et al. An interlaboratory study on the suitability of a gradient LC-UV method as a compendial method for the determination of erythromycin and its related substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 1, p. 109–112, 2010.

[62] HASSIB, S. T.; FARAG, A. E.; ELKADY, E. F. Liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of erythromycin stearate and trimethoprim in tablets. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 49, n. 2, p. 81–89, 2011.

[63] HA, P. T. T. et al. Investigating the potential of erythromycin and derivatives as

chiral selector in capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 861–870, 2004.

[64] QU, N. et al. Nondestructive quantitative analysis of erythromycin ethylsuccinate powder drug via short-wave near-infrared spectroscopy combined with radial basis function neural networks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 3–4, p. 156–164, 2007.

[65] RADÍČOVÁ, M. et al. Voltammetric determination of erythromycin in water samples using a boron-doped diamond electrode. **Physica Status Solidi (B) Basic Research**, v. 252, n. 11, p. 2608–2613, 2015.

[66] SHARMIN, N.; SHANTA, N. S.; BACHAR, S. C. Spectrophotometric analysis of azithromycin and its pharmaceutical dosage forms: Comparison between spectrophotometry and HPLC. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 171–179, 2013.

[67] BHIMANI, S. et al. Development of the UV Spectrophotometric Method of Azithromycin in API and Stress Degradation Studies. **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 68, p. 48–53, 2016.

[68] RUFINO, J. L.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Flow-injection spectrophotometric determination of azithromycin in pharmaceutical formulations using p-chloranil in the presence of hydrogen peroxide. **Analytical Sciences**, v. 24, n. 7, p. 871–876, 2008.

[69] CHEN, B. M. et al. Quantitative determination of azithromycin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 4, p. 480–487, 2006.

[70] YÜZÜAK, N. et al. Analysis of azithromycin in human plasma by LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 66, p. 115–118, 2007.

[71] FILIST, M. et al. Simplified LC-MS/MS method enabling the determination of azithromycin in human plasma after a low 100mg dose administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 184–189, 2014.

[72] ZHANG, K. et al. Facile synthesis of the necklace-like graphene oxide-multi-walled carbon nanotube nanohybrid and its application in electrochemical sensing of Azithromycin. **Analytica Chimica Acta**, v. 787, p. 50–56, 2013.

[73] ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A. R.; REZAEI, B. A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbon nanotubes decorated with MgCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> for the determination of azithromycin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 468–474, 2013.

[74] REBELO, P. et al. Azithromycin electrochemical detection using a molecularly imprinted polymer prepared on a disposable screen-printed electrode. **Analytical Methods**, v. 12, n. 11, p. 1486–1494, 2020.

[75] ZHOU, T. et al. Fabrication of a selective and sensitive sensor based on molecularly imprinted polymer/acetylene black for the determination of azithromycin in pharmaceuticals and biological samples. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.

[76] LI, W.; JIA, H.; ZHAO, K. Determination of clarithromycin in rat plasma by HPLC-UV method with pre-column derivatization. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 385–390, 2007.

[77] VU, D. H. et al. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 121, p. 9–17, 2014.

[78] JAIN, A.; JAIN, A.; JAIN, A. Sensitive polarographic electrochemical determination of clarithromycin in blood serum. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 2, p. 70–72, 2013.

[79] ZHANG, X.; GU, S.; DING, Y. Simultaneous detection of roxithromycin and dopamine using a sensor platform based on poly(sulfosalicylic acid) and its application in human serum studies. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3316–3321, 2014.

[80] DRLJEVIĆ-DJURIĆ, K. M. et al. Voltammetric and differential pulse determination of roxithromycin. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 1, p. 47–52, 2010.

[81] ZHANG, L. et al. Electrochemical behaviors of roxithromycin at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified gold electrode and its electrochemical determination. **Electrochimica Acta**, v. 72, p. 179–185, 2012.

[82] LAN, C. et al. Determination of Six Macrolide Antibiotics in Chicken Sample by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Based on Solid Phase Extraction. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, p. 1–13, 2019.

[83] ZANONI, M. et al. Panorama Da Eletroquímica E Eletroanalítica No Brasil. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 663–669, 2017.

[84] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. New York: Amedina Coimbra, 1993.

[85] SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. [s.l: s.n.].

[86] SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípio de análise instrumental**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora, 2002.

[87] ROUSHANI, M.; MOHAMMADI, F.; VALIPOUR, A. Electroanalytical sensing of asulam based on nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Journal of Nanostructures**, v. 10, n. 1, p. 128–139, 2020.

[88] QUINTINO, M. DO S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2003. 6–25 f. Universidade de São Paulo. 2003.

[89] WANG, J.; TAHA, Z. Batch Injection Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, 1991.

[90] RIBEIRO, G. A. C. et al. Determination of the catechin contents of bioactive plant extracts using disposable screen-printed carbon electrodes in a batch injection analysis (BIA) system. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1249–1254, 2019.

[91] TORMIN, T. F. et al. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 93–98, 2014.

[92] JESUS GUEDES, T. DE; PIO DOS SANTOS, W. T. Fast and Simple Electrochemical Analysis Kit for Quality Control of Narrow Therapeutic Index Drugs. **Electroanalysis**, v. 30, n. 8, p. 1732–1741, 2018.

[93] STEFANO, J. S. et al. Batch-injection Amperometric Analysis on Screen-printed Electrodes: Analytical System for High-throughput Determination of Pharmaceutical Molecules. **Electroanalysis**, v. 31, n. 3, p. 518–526, 2019.

[94] STEFANO, J. S. et al. Amperometric determination of omeprazole on screen-printed electrodes using batch injection analysis. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 398–403, 2017.

[95] BACKES, R. S. et al. Determinação rápida e simples de citrato de sildenafila (Viagra e genérios) empregando eletrodo impresso de carbono em sistemas FIA e BIA com detecção

amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 752–759, 2017.

[96] STEFANO, J. S. et al. Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Electroanalysis**, v. 28, p. 350–357, 2016.

[97] IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.

[98] SILVA, T. A. et al. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

[99] YOUSSEY, M. et al. Non-aqueous carbon black suspensions for lithium-based redox flow batteries: Rheology and simultaneous rheo-electrical behavior. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 34, p. 14476–14486, 2013.

[100] LO, T. W. B.; ALDOUS, L.; COMPTON, R. G. The use of nano-carbon as an alternative to multi-walled carbon nanotubes in modified electrodes for adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 361–368, 2012.

[101] CINTI, S. et al. Screen-Printed Electrodes Modified with Carbon Nanomaterials: A Comparison among Carbon Black, Carbon Nanotubes and Graphene. **Electroanalysis**, v. 27, n. 9, p. 2230–2238, 2015.

[102] MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança e descarte de produtos químicos**. [s.l: s.n.].

[103] PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.

[104] BANKS, C. E. et al. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: Edge-plane sites and tube ends are the reactive sites. **Chemical Communications**, n. 7, p. 829–841, 2005.

[105] CARDOSO, R. M. et al. 3D-printing pen versus desktop 3D-printers: Fabrication of carbon black/polylactic acid electrodes for single-drop detection of 2,4,6-trinitrotoluene. **Analytica Chimica Acta**, v. 1132, p. 10–19, 2020.

[106] ENRÍQUEZ, E. et al. Conductive coatings with low carbon-black content by adding carbon nanofibers. **Composites Science and Technology**, v. 93, p. 9–16, 2014.

[107] KASTNER, J. et al. Resonance Raman and infrared spectroscopy of carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 221, n. 1–2, p. 53–58, 1994.

[108] SILVA, T. A. et al. Electrochemical behaviour of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide nanocomposite as electrode material. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 114–119, 2014.

[109] DEROCO, P. B. et al. Effect of Different Carbon Blacks on the Simultaneous Electroanalysis of Drugs as Water Contaminants Based on Screen-printed Sensors. **Electroanalysis**, v. 31, n. 11, p. 2145–2154, 2019.

[110] LI, Z.; JONSSON, M. On the reactivity of aqueous radiolysis products towards carbon black used in in-situ radiation-synthesis of catalytic nanoparticles in graphite electrodes. **Carbon**, v. 173, p. 61–68, 2021.

[111] HU, X. et al. Enhanced electrochemical detection of erythromycin based on acetylene black nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 27–31, 2010.

[112] AVRAMOV IVIĆ, M. L. et al. The electrochemical behavior of erythromycin A on a gold electrode. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 2, p. 649–654, 2008.

[113] SONG, B. et al. Selective and sensitive determination of erythromycin in honey and dairy products by molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 183–190, 2014.

[114] GRIMSHAW, J. **Electrochemical reactions and mechanisms in organic chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2000.

[115] BAEZZAT, M. R.; BANAVAND, F.; HAKKANI, S. K. Sensitive voltammetric detection of indomethacin using TiO<sub>2</sub> nanoparticle modified carbon ionic liquid electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 7, n. 1, p. 89–98, 2020.

[116] TABANLIGIL CALAM, T. Voltammetric determination and electrochemical behavior of vanillin based on 1H-1,2,4-triazole-3-thiol polymer film modified gold electrode. **Food Chemistry**, v. 328, n. May, p. 127098, 2020.

[117] TABANLIGIL CALAM, T.; YILMAZ, E. B. Electrochemical determination of 8-hydroxyquinoline in a cosmetic product on a glassy carbon electrode modified with 1-amino-2-naphthol-4-sulphonic acid. **Instrumentation Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–20,

2020.

[118] GAOLATLHE, L. et al. Voltammetric responses of porous Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> spinels supported on MOF-derived carbons: Effects of porous volume on dopamine diffusion processes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. xxxx, p. 113863, 2020.

[119] GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. 43. ed. New York: VCH, 1993.

[120] SILVA, L. P. et al. Carbon black-chitosan film-based electrochemical sensor for losartan. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1827–1834, 2020.

[121] MOHAMOUDI, S.; RASHEDI, H.; FARIDBOD, F. A Molecularly Imprinted Polymer (MIP)-based Biomimetic Potentiometric sensing device for the analysis of Clarithromycin. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 10, n. 12, p. 1654–1667, 2018.

[122] WAN, H. et al. Direct electron transfer and voltammetric determination of roxithromycin at a single-wall carbon nanotube coated glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 427–431, 2011.

[123] PAULA, C. E. R. DE et al. Spectrophotometric determination of azithromycin in pharmaceutical formulations employing the reaction with alizarin. **Revista Virtual de Quimica**, v. 11, n. 4, p. 1081–1096, 2019.