Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Mestrado

Síntese e Caracterização do Dispositivo Eletroquímico Baseado em Nanopartículas de Prata Suportadas sobre Grafeno para Análise de Antibióticos em Efluentes

Mestrando: Diego Luiz Cavaretti Golinelli

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

São Carlos

2015

Diego Luiz Cavaretti Golinelli

Síntese e Caracterização do Dispositivo Eletroquímico Baseado em Nanopartículas de Prata Suportadas sobre Grafeno para Análise de Antibióticos em Efluentes

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em

acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

Aos meus pais, Rui e Maria pelo apoio em todas

as etapas de minha vida....

A minha noiva Lia e minha Irma Danielli

por sempre me apoiarem....

Agradecimentos

Aos meus pais Rui e Maria, e minha Irmã Danielli pelo carinho, compreensão e por saber que sempre posso contar com eles quando eu precisar.

Aos meus familiares, pelo apoio durante toda minha vida.

À minha noiva Lia (S2), meus cunhados Leandro e Vivian, ao meu sogro Claudio e minha sogra Eliana por todo apoio e compreensão durante todos esses anos.

À minha orientadora Profa. Dra. Ivana Cesarino e ao, Prof. Dr. Sérgio Antônio Spínola Machado, pela orientação, além de todo o conhecimento fornecido, ideias e oportunidades.

Aos técnicos João Tiengo e Marcelo Calegaro pela ajuda durante todo este tempo.

Aos amigos, Arnaldo, Betão, Di (gordinho), Fabinho, Giovane, Jorge, Lucas, Mica, Pipi, Piti, Ramon, Wilian, Wilson, pelo apoio durante todo esse tempo.

Aos companheiros de GMEME, Camila, Codorna, Dyovani, Érica, Fernanda, Fernando, Ivana, Jaqueline, Lívia, Naiza, Paulo Leão, Paulo Raymundo, Pollyana, Tiago Prado, Tiago (Brutão), Vanessa, pela amizade e ajuda profissional em todos os momentos.

À USP e ao IQSC por fornecer toda estrutura necessária.

Obrigado!

Resumo

Um dispositivo eletroquímico foi desenvolvido para a determinação simultânea de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP), utilizando voltametria de pulso diferencial e um eletrodo de carbono vítreo (GC) modificado com o compósito óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanopartículas de prata (AgNPs), sintetizados por dois métodos: químico e o eletroquímico. A morfologia e o comportamento eletroquímico dos eletrodos GC modificados com os compósitos rGO/AgNPs (método químico) e rGO-AgNPs (método eletroquímico) foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons (FEG-SEM) e voltametria cíclica (CV). Essas técnicas demonstraram que, nos dois métodos utilizados, o óxido de grafeno (GO) foi modificado com as AgNPs, e que o compósito sintetizado pelo método eletroquímico apresentou uma melhor dispersão das nanopartículas, resultando em um aumento da área superficial quando comparado ao compósito rGO/AgNPs. Assim, o eletrodo GC/rGO-AgNPs foi avaliado e otimizado na determinação simultânea de SMX e TMP e atingiu limites de detecção de $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o SMX e $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o TMP. O dispositivo eletroquímico proposto, GC/rGO-AgNPs, foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de SMX e TMP em águas residuárias.

Abstract

An electrochemical device was developed for the simultaneous determination of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) using differential pulse voltammetry, and a glassy carbon electrode (GC) modified with the reduced graphene oxide composite (rGO) and silver nanoparticles (AgNPs), synthesized by two methods: chemical and electrochemical. The morphology and the electrochemical behavior of the GC electrode modified with composite rGO/AgNPs (chemical method) and rGO-AgNPs (electrochemical method) were characterized by scanning electron microscopy coupled to an electron gun (FEG-SEM) and cyclic voltammetry (CV). These techniques demonstrated that, in both methods, the graphene oxide (GO) was modified with AgNPs, and the composite synthesized by the electrochemical method showed a better dispersion of the nanoparticles, resulting in an increased surface area when compared to the composite rGO/AgNPs. Thus, the GC/rGO-AgNPs electrode was evaluated and optimized for simultaneous determination of SMX and TMP and achieved detection limits of $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ to SMX and $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ for the TMP. The proposed electrochemical device, GC/rGO-AgNPS, was successfully applied for the simultaneous determination of SMX and TMP in wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bases das formas de grafite.....	16
Figura 2 - Estrutura sulfametoxazol.....	24
Figura 3 - Estrutura trimetoprim.....	25
Figura 4 - Célula Eletroquímica Convencional.....	29
Figura 5 - A oxidação do grafite em meio ácido libera muito calor (reação exotérmica); por isso, deve ser realizada em banho de gelo e com agitação.	31
Figura 6 - Micrografias FEG-SEM para os nanomateriais: (A) GO, (B) rGO e (C) compósito rGO-AgNPs.eletroless (D) compósito rGO-AgNPs.coloidal No detalhe: espectros de Raman para: (A) GO e (B) rGO.....	36
Figura 7 - Caracterização eletroquímica em solução 0,5 mol L ⁻¹ KCl com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO-AgNPs eletroless e (c) GC/rGO-AgNPs coloidal	38
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO-AgNPs eletroless e (c) GC/rGO-AgNPs coloidal em 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆] e K ₄ [Fe(CN) ₆], com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	39
Figura 9 - Imagem dos vários tipos de grafeno dispersos em água (1,0 mg do material para 1,0 mL de água): a) GO, b) rGO e c) compósito rGO/AgNPs	40
Figura 10 - Varreduras CV do eletrodo compósito GC/rGO-AgNPs em 0,1 mol L ⁻¹ BR pH 8,0, na ausência (linha pontilhada preta) e na presença (linha sólida vermelha) de 50,0 µmol L ⁻¹ , dos antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol com velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	41

Figura 11 - Efeito do pH no potencial de pico (■) e na corrente de pico (●) para **A)** oxidação do SMX e **B)** oxidação do TMP no eletrodo GC/rGO-AgNPs utilizando solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ contendo 10,0 μmol L⁻¹ de cada antibiótico. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV.....42

Figura 12 - Efeito do potencial de pré-tratamento sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV.44

Figura 13 - Efeito do tempo de pré-tratamento sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV45

Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial utilizando diferentes amplitudes de pulso em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,65 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e potencial e tempo de pré-tratamento de -1,2 V por 120 s. No detalhe: Efeito da amplitude de pulso sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■).....46

Figura 15 - Efeito da quantidade de nanopartículas de prata sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,65 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e potencial e tempo de pré-tratamento de -1,2 V por 120 s.....47

Figura 16 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os parâmetros otimizados descritos na Tabela 3 em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 75,0 μmol L⁻¹ de SMX e TMP para os seguintes eletrodos: GC/GO (curva a), GC/rGO-AgNPs (curva b) e GC/rGO-AgNPs (curva c).....49

Figura 17 - Curva analítica usando DPV realizada com o eletrodo GC/rGO-AgNPs em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 para concentrações de SMX: (a) 1,0; (b) 3,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0; (f) 8,0 e (g) 10,0 µmol L⁻¹ e para concentrações de TMP: (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0; (f) 8,0 e (g) 10,0 µmol L⁻¹. (A) Dependência linear das correntes de pico com as concentrações de SMX e (B) Dependência linear das correntes de pico com as concentrações de TMP..... 51

Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido para o eletrodo de GC/rGO-AgNPs na detecção de SMX e TMP em águas residuárias sintética simulando efluente de suinocultura **S)** amostra; **a)** amostra adicionada com 2,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP; **b)** amostra adicionada com 4,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP, e **c)** amostra adicionada com 6,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações médias de sulfametoxazol e trimetoprim detectados em ambientes aquáticos.....	23
Tabela 2 - Constituição da água residuária sintética simulando efluente de suinocultura.....	35
Tabela 3 - Parâmetros otimizados por DPV para determinação simultânea de SMX e TMP usando eletrodo de GC/rGO-AgNPs.....	48
Tabela 4 - Efeito dos interferentes E2, E3 e carbaril no processo de oxidação do SMX e TMP com as condições otimizadas por DPV, quando comparado com a solução que não contem o interferente.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(AgNPs)	nanopartículas de prata
(DPV)	voltametria de pulso diferencial
(FEG-SEM)	microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons
(GO)	óxido de grafeno
(LMR)	limite máximo de resíduo
(rGO)	óxido de grafeno reduzido
(rGO-AgNPs)	óxido de grafeno reduzido modificado com nanopartículas de prata pelo método eletroquímico
(rGO/AgNPs)	óxido de grafeno reduzido modificado com nanopartículas de prata pelo método químico
(SMX)	sulfametoxazol
(STZ)	sulfatiazol
(SMZ)	sulfametazina
(SDM)	sulfadimetoxina
(TMP)	trimetoprim
(VC)	voltametria cíclica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Grafeno.....	16
1.2 Nanopartículas de Prata.....	20
1.3 Antibióticos	22
1.3.1 Sulfametoxazol.....	24
1.3.2 Trimetoprim	25
1.3.3 Contaminação de efluentes.....	26
2. OBJETIVO	28
3. METODOLOGIA.....	29
3.1 Instrumentação e Métodos.....	29
3.2 Síntese do óxido de grafeno.....	30
3.3 Preparação do GO modificado com AgNPs pelo método químico...	33
3.4 Preparação das AgNPs pelo método coloidal.....	33
3.5 Preparação dos eletrodos de carbono vitreo (CG) modificado com os compósitos	33
3.6 Otimização dos parâmetros para análise simultânea de SMX e TMP em solução tampão	34
3.7 Preparação da amostra de água residuária sintética para a análise de SMX e TMP	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos compósitos baseados em rGO e AgNPs	36
4.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo GC/rGO-AgNPs no processo de oxidação do SMX e TMP	40
4.3 Parâmetros para a otimização do SMX e TMP em resposta ao eletrodo GC/rGO-AgNPs.....	43
4.4 Comparação do comportamento voltamétrico do SMX e TMP sobre diferentes eletrodos.....	47
4.5 Resposta analítica do SMX e TMP.....	49

4.6 Determinação seletiva de SMX e TMP em interferentes.....	52
4.7 Análise simultânea de SMX e TMP em águas residuárias sintética	53
5. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

O uso de técnicas eletroquímicas para monitorização de substâncias, tanto de interesse ambiental, como biológico conduz ao desenvolvimento de novos sensores e biossensores. A busca contínua de parâmetros analíticos ideais, tais como, limite de detecção, seletividade e reprodutibilidade estimula o desenvolvimento de materiais avançados para análise dessas amostras ambientais e biológicas.

Atualmente, um dos materiais mais utilizados no desenvolvimento destes novos dispositivos eletroquímicos é o grafeno. O grafeno é uma monocamada plana de átomos de carbono em um retículo bidimensional (2D), resultando muito naturalmente no tipo de rede cristalina (rede hexagonal e planar). Foi uma novidade completa na Física dos materiais, e estimulou muitos trabalhos teóricos, que revelaram surpresa atrás de surpresa, devido suas propriedades elétricas e óticas. Um exemplo é a absorção de luz na gama do visível que é quase independente da frequência, e tem um valor determinado apenas por constantes fundamentais: a carga do elétron, a constante de Planck e a velocidade da luz. A combinação dessa transparência com a capacidade de sustentar correntes elétricas muito elevadas, como os metais, é uma associação muito singular, que o torna muito promissor como material, seja para *displays*, sendo este o interesse de especialistas da Samsung, ou como sensores em células solares.

Além dessas características, o grafeno tem atraído grande atenção em diversas áreas do conhecimento, devido suas propriedades únicas, tais como: rede bidimensional estendida com átomos de carbono hibridizados sp^2 [1], alta mobilidade eletrônica ($200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [2], grande área superficial específica ($2.630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [3], excelentes propriedades químicas, térmica, mecânicas [4], e alta condutividade elétrica ($10^3\text{-}10^4 \Omega \text{ m}^{-1}$). Essas propriedades permitem que o grafeno tenha grandes campos de aplicações, sendo uma delas, a fabricação de novos sensores e biossensores eletroquímicos [5].

Muitas vias de fabricação, tais como a esfoliação micromecânica do grafite [6], deposição de vapor químico (crescimento epitaxial) [7], e o método de solução química [8], têm sido usados na preparação do grafeno. Entre eles, o produto químico da oxidação do grafite para formar o óxido de grafeno (GO) e a sua

subsequente redução, é uma das rotas de síntese mais favorável devido à sua alta eficiência e baixo custo [9].

Em particular, óxido de grafeno reduzido (rGO) revestido com nanopartículas de prata (rGO/AgNPs) é um híbrido promissor devido suas propriedades ópticas, [10], propriedades eletroquímicas [11], bem como sua alta atividade catalítica [12-13]. No entanto, ainda existem muitos desafios para superar a síntese de compósitos baseados em rGO e nanopartículas de metálicas. Por exemplo, a maioria dos métodos necessitam de redutores fortes, tais como NaBH_4 , formaldeído, hidrazina [14-15]. Adicionalmente, o uso de surfactantes ou agente estabilizador, que são introduzidos, algumas vezes, ficam fortemente absorvidos na superfície das nanopartículas metálicas, resultando em uma diminuição do desempenho dos compósitos rGO-nanopartículas metálicas [16]. Assim, novos métodos de síntese estão sendo constantemente estudados e introduzidos na literatura. Sendo assim, dois métodos de síntese foram avaliados, sendo um deles, o método electroless, e o outro, o método de eletrodeposição de AgNPs coloidal, para a determinação de antibióticos em efluentes.

Os antibióticos podem ter duas utilizações: podem atuar como promotores de crescimento ou para propósitos terapêuticos. Esses compostos apresentam-se em baixas concentrações (ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$) em afluentes e efluentes de tratamento de esgotos.

As indústrias farmacêuticas além de contribuírem com a fabricação dos antibióticos para uso em tratamentos de humanos e de animais descartam resíduos que, futuramente, serão encontrados em sistemas naturais de água devido ao descarte industrial. Além do mais, uma vasta quantidade de antibióticos vem sendo utilizada indiscriminadamente pela pecuária como promotores de crescimento. Cerca de 60% dos antibióticos ingeridos por humanos e animais são excretados através da urina e das fezes diretamente no sistema de esgotos, por esta razão, uma grande quantidade desses fármacos é descartada no meio ambiente, seja no solo ou nos corpos hídricos.

Diante desse cenário, metodologias de tratamento desses efluentes e estratégias analíticas adequadas, com o objetivo da determinação de antibióticos em baixos níveis de concentração nessas amostras complexas são extremamente importantes. Assim, foram desenvolvidos e caracterizados dispositivos eletroquímicos baseados em rGO modificado com AgNPs para a determinação de duas classes de

antibióticos, sulfonamidas e pirimidinas, e monitoramento de águas de efluentes utilizando os sensores propostos.

1.1 Grafeno

A estrutura do grafeno foi concebida teoricamente há mais de 60 anos, desde o estudo do grafite por cristalografia de raios-X. Mas, somente em 2004 foi desenvolvido um método para isolar os planos de grafeno individuais sobre uma superfície de óxido de silício por um grupo de cientistas liderados pelo Professor Geim da Universidade de Manchester, Inglaterra. Esse grupo obteve sucesso na obtenção de folhas de grafeno com propriedades eletrônicas elevadas através da esfoliação mecânica do grafite por um tipo de fita adesiva [17].

O grafeno é formado por uma única camada de carbono em sua rede bidimensional [18], que contrasta com a estrutura tridimensional lamelar do grafite como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Bases das formas de grafite [19].

Fonte: A.K. Geim, 2007, p. 183.

Como o grafeno apresenta hibridização do tipo sp^2 seus orbitais s combinam com dois orbitais p para formar 3 orbitais planares formando ângulos de 120° . Cada um desses orbitais tem um elétron, e nada o faria mais energeticamente estável do que juntar-se com outro semelhante, por exemplo, com um dos 3 orbitais sp^2 de outro átomo de carbono. Assim, os átomos de carbono se organizam em uma estrutura planar formada por hexágonos regulares, cujos vértices são ocupados por um átomo: o carbono. Cada ligação tem dois elétrons, o que torna a estrutura muito plausível. Isso resulta em ótimas propriedades mecânicas devido a estabilidade das ligações planares C–C da folha de grafeno, e da quase ausência de defeitos nesses cristais; os defeitos reduzem drasticamente a resistência dos materiais. Mas, foram sobretudo as propriedades eletrônicas desse material que o tornaram uma estrela da ciência.

Na descrição da formação dos orbitais sp^2 , um orbital p é deixado em cada átomo de carbono, com a formação dos três orbitais sp^2 , sobrando um orbital: aquele em que a densidade de carga eletrônica se concentra na direção perpendicular ao plano de grafeno, o orbital pz, no qual cada orbital pz tem um elétron. A hibridização pz-pz dá origem a $N/2$ orbitais ligantes e $N/2$ orbitais antiligantes, em que N é o número total de átomos de carbono. Como cada orbital tem dois estados de spin, no estado de mais baixa energia os N elétrons ocupam os orbitais ligantes. Os N orbitais do cristal têm energias diferentes, formando duas “bandas” quase contínuas (N é muito grande); os estados ligantes constituem a banda de valência e os antiligantes a banda de condução. Isso não é específico do grafeno, mas uma descrição geral da formação dos estados eletrônicos em um cristal a partir de um conjunto de orbitais atômicos. Quando as bandas estão separadas por uma energia finita, “gap”, o material é um isolante. Os elétrons na banda de valência não podem mover-se, porque todos os estados estão ocupados; é necessária uma energia finita para excitar um elétron para a banda de condução, que pode então mover-se no cristal. O estado vazio da banda de valência também permite movimento de carga. Se as duas bandas se sobrepõem, os elétrons são móveis e o sistema é metálico. Para entender as propriedades eletrônicas do grafeno, com mais detalhe, deve-se discutir a natureza dos estados das bandas de valência e condução.

Em mecânica quântica os estados eletrônicos são ondas; para um elétron livre, sem forças de atração nucleares, o estado mais simples é uma onda plana, que

enche todo o espaço; o elétron não tem preferência por nenhum ponto particular, pois não existem variações de energia potencial. Tal onda descreve um elétron com momento linear de módulo dado pela fórmula de Broglie, $p = h/\lambda$, com a direção e sentido de propagação da onda. A energia do elétron é puramente cinética:

$$E = mv^2/2 \text{ ou } E = p^2/2m \quad (1)$$

Onde λ é o comprimento da onda associada à partícula de massa m que se move a uma velocidade v , h é a constante de Plank. O produto mv é também o módulo do vetor p ou quantidade de momento da partícula.

No grafeno, o elétron não é livre, pois só tem um orbital disponível em cada átomo de carbono, mas também não tem preferência por qualquer um deles. As ondas que descrevem os orbitais ligantes e antiligantes são semelhantes a ondas planas, no sentido que são hibridizações de todos os orbitais p_z do cristal, e, além disso, são caracterizados por uma grandeza semelhante ao momento linear (Momento de Bloch), que determina como a fase da onda varia de orbital para orbital. Contudo, a relação entre a energia do estado e o respectivo momento, chamada relação de dispersão, é muito diferente quer seja de um elétron livre, quer seja dos materiais (metais, semicondutores ou isoladores):

- a) As bandas não se sobrepõem em energia, mas o “gap” é nulo; o topo da valência e a base de condução coincidem. Podemos excitar elétrons da banda de valência para a de condução sem custo de energia. Por esta razão o grafeno é um semi-metal.
- b) Próximo da energia onde as bandas se tocam, os estados eletrônicos têm a seguinte relação entre energia e momento:

$$E(p) = \pm u_F p \quad (2)$$

Onde: u_F é a velocidade da partícula

(+ para os estados de condução e – para os de valência; energia medida em relação ao estado em que as bandas se tocam).

Esta dependência linear entre energia e momento é a mesma que a de um fóton. Com efeito, das relações de Einstein, $E = hu$, e de Broglie, $p = h/\lambda$, resulta $E(p) = cp$ (para a luz $c = \lambda u$, onde c : velocidade da luz). Isto significa que para os estados eletrônicos que correspondem a excitações de baixa energia, os elétrons do

grafeno são partículas sem massa, que se movem com uma velocidade fixa, u_F , independente da sua energia (v_F é cerca de 300 vezes inferior à velocidade da luz). O grafeno é ainda impermeável. A malha é pequena para permitir a passagem de moléculas de água, sendo a distância entre carbonos vizinhos, ao lado do hexágono, de apenas 1,42 Å.

No entanto, existe a forte tendência das folhas individuais do grafeno se aglomerarem devido às fortes interações π - π e interações de van der Waals [20], podendo ter um efeito prejudicial significativo sobre as propriedades do material final. Logo, inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a dispersão do grafeno, limitar sua reaglomeração e melhorar sua sensibilidade. As metodologias existentes envolvem tanto processos químicos quanto físicos para separar as folhas de grafeno, seguido por modificações da superfície, para perturbar a reformação das interações π - π e interações de van der Waals.

Uma variação interessante do grafeno é a utilização de sua forma oxidada, GO, a qual tem sido preparada pelo método modificado de Hummers [21], sendo a maioria do grafeno utilizado em eletroquímica produzido por esse método. Grafeno obtido a partir do GO reduzido, que também é chamado de folhas de grafeno funcionalizadas ou óxido de grafeno quimicamente reduzido, geralmente tem defeitos estruturais abundantes [22,23] e grupos funcionais [24], que são vantagens para aplicações eletroquímicas.

Uma abordagem elegante para aplicação do GO que vem ganhando espaço no meio científico consiste em sua modificação com nanopartículas metálicas, a qual tem demonstrado excelentes resultados em seu uso como sensores eletroquímicos e na imobilização de biomoléculas. Como exemplo, Liu *et al.* [25] imobilizaram nanopartículas de platina e glicose oxidase sobre folhas de GO para avaliar a sua aplicação como biossensor na determinação de glicose alcançando um limite de detecção de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Neste caso a Pt atuou como um espaçador mecânico entre as folhas de grafeno, o que acarretou em sua separação e aumentou a área superficial, ao mesmo tempo em que mantinha a atividade biocatalítica da enzima devido às nanopartículas metálicas serem biocompatíveis.

Gu *et al.* [26], desenvolveram um biossensor utilizando GO, quantum dots de CdTe-CdS, nanopartículas de ouro e glicose oxidase para determinar glicose, reportando uma faixa linear de resposta de $1,0 \times 10^{-11}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} com um limite de detecção de 3,0 pmol L^{-1} . O sensor mostrou-se extremamente sensível e

estável mantendo uma resposta de 95% do valor original para uma concentração de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$, por um período de 26 semanas.

Cincotto e colaboradores [27] utilizam oxido de grafeno modificados com telureto de cádmio e quantum dots para a determinação eletroquímica em desreguladores endócrinos. As medições eletroquímicas demonstraram o alto desempenho a resposta do composto na presença de uma fonte de luz. A Voltametria de Pulso diferencial permitiu o desenvolvimento de um método para determinar os níveis de 17β -estradiol entre $0,2$ e $4,0 \text{ mmol de L}^{-1}$. Assim o compósito GO / CdTe mostrou-se muito sensível com um limite de detecção de $2,8 \text{ nmol L}^{-1}$ ($0,76 \mu\text{gL}^{-1}$).

1.2 Nanopartículas de prata

Há um crescente interesse no ramo da nanociência no que se refere às intrigantes mudanças nas propriedades físicas de determinados sólidos, quando suas dimensões são reduzidas à escala nanométrica e, também, à possibilidade de controle sobre os componentes estruturais de materiais e dispositivos em escalas de tamanho bem inferiores às aquelas convencionais [28-29]. Parte do fascínio que permeia o assunto é atribuído às inúmeras aplicações dadas a nanopartículas metálicas, tais como, fabricação de sensores, microeletrônica, catálise, ação bactericida, células fotovoltaicas [30] entre outras, devido às suas propriedades intrínsecas ópticas, eletrônicas, magnéticas e catalíticas [31].

O principal objetivo da nanotecnologia é usar as propriedades características desses materiais, como o aumento da área superficial. Estes dispositivos, muitas vezes, não possuem tamanho nanométrico, mas contêm em sua composição diversas estruturas nanométricas, o que resulta nas diversas propriedades e aplicações de interesse. Alguns materiais nanoestruturados mais destacados na literatura são os nanotubos de carbono, os derivados de fulereno, as membranas poliméricas, o óxido de zinco (ZnO), as nanoestruturas de ouro, prata, o óxido de ferro (Fe_3O_4), o óxido de titânio (TiO_2), o óxido de silício (SiO_2), os *quantum dots* (QDs), entre outros [32].

Nanopartículas metálicas coloidais, como por exemplo, as que são formadas a partir de platina, ouro, prata e cobre, são o foco de uma grande área de interesse para a sua utilização em uma variedade de aplicações, incluindo a detecção de

biomoléculas e imunoenaios, armazenamento de dados, catálise, eletromagnetismo, entre outros.

Soluções coloidais de metais como prata e ouro são sistemas em nanoescala particularmente interessantes, devido à facilidade com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente. Um exemplo seria os eletrodos modificados com nanopartículas metálicas coloidal que mostram uma melhora significativa na sensibilidade eletroquímica devido à sua grande área superficial específica e maior superfície de energia livre [33].

Alguns óxidos metálicos e compostos metálicos, tais como, nanopartículas de óxido de cobalto, ouro e platina têm sido relatados para modificações de eletrodos. No entanto, esses eletrodos, exibem baixa eficiência e sofrem interferência de outros íons metálicos que dificultam suas aplicações comerciais [34]. Entre as várias nanopartículas metálicas, as AgNPs oferecem desejável substrato para a preparação de eletrodos modificados quimicamente, isso devido às características quânticas de diâmetro de pequenos grânulos, grande área superficial específica, bem como a capacidade de transferência rápida de elétrons [35].

A prata existe em várias formas no ambiente e em organismos vivos, tais como, metais, iônicos, complexos e coloidais. As AgNPs possuem tamanho pequeno e grande superfície, o que leva, química e fisicamente, a diferenças nas suas características, incluindo propriedades mecânicas e biológicas, atividade catalítica, condutividade térmica e elétrica, absorção óptica. Essas propriedades em potencial fazem com que as AgNPs sejam utilizadas em materiais antibacterianos, sensores, e espectroscopia.

Por exemplo, a atividade antibacteriana e a boa condutividade da Ag são conhecidas desde os tempos antigos e agora estão sendo amplamente investigadas por aplicações reais. Os compostos de Ag têm sido utilizados como agentes antibacterianos de queimadura e tratamento de feridas [36]. Além disso, as AgNPs exibem o efeito de ressonância de superfície (SPR) e forte resistência bacteriana aos antibióticos, tornando-as ideais para aplicações biotecnológicas [37-38].

Para sintetizar AgNPs estáveis, a escolha de solventes para a estabilização e surfactante é significativamente importante, especialmente quando o ambiente requer uma alta concentração de íons metálicos. Por exemplo, Rele et al. [39] relataram que, na ausência de um surfactante, a estabilidade das AgNPs sintetizadas com glicerol é muito maior do que em etileno glicol ou soluções

aquosas. A maior estabilidade das NPs em glicerol se deve à uma viscosidade mais elevada que conduz à difusão lenta. Realizar a síntese de nanopartículas metálicas em meio orgânico é preferível, porque os meios seletivos podem servir para ambos, solventes e agentes de redução, sem a necessidade de adicionar um agente de redução adicional.

Quando essas AgNPs são suportadas sobre superfícies reativas, a sua atividade catalítica é ainda mais eficaz. Consequentemente, para imobilizar essas NPs são utilizados sistemas bifásicos ou suportes sólidos. Recentemente, o GO tem sido mencionado como material viável para esse suporte, devido ao efeito sinérgico que somam o alto poder catalítico AgNPs sem perder nenhuma das propriedades eletrônicas do GO. Assim, dois métodos de síntese para a obtenção do compósito rGO-AgNPs foram avaliados, sendo um deles, o método químico (eletroless), e o outro, o método de eletrodeposição de AgNPs coloidal, para serem utilizados na modificação de sensores e análise de antibióticos em efluentes.

1.3 Antibióticos

Atualmente, cerca de 3.000 diferentes substâncias são utilizadas em formulações farmacêuticas [40]. Consequentemente, uma grande quantidade dessas substâncias bioativas vem sendo encontradas em águas residuárias e têm atingido os corpos d'água. Dentre essas substâncias, os antibióticos causam bastante preocupação, pois sua ocorrência ambiental é um problema eco toxicológico. A exposição prolongada de bactérias diversas às baixas concentrações de antibióticos encontradas no meio ambiente pode levar à seleção de microrganismos resistentes e, eventualmente, à transferência de seus genes de resistência para bactérias de outras espécies, reduzindo, em longo prazo, a eficácia desses compostos.

Existem numerosas classificações dos antibióticos, a mais habitual os agrupa em função de seu mecanismo de ação perante os agentes causadores de infecção, quer dizer, alguns lesionam a parede da célula, outros alteram a membrana celular. A maior parte deles inibe a síntese de ácidos nucleicos, os polímeros constituintes da célula bacteriana. Outra classificação agrupa os antibióticos em função das bactérias contra as quais são eficazes, como por exemplo, estafilococos, estreptococos e escherichia. Também podem ser classificados em função da sua estrutura química,

diferenciando, dessa forma, as tetraciclinas, penicilinas, macrólidos, cefalosporinas, sulfonamidas, lincosamidas, pirimidinas.

Os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim são usadas em combinação de fármacos muito utilizada, sendo que o sulfametoxazol pertence ao grupo das sulfonamidas e o trimetoprim, ao das pirimidinas. A associação de sulfametoxazol e trimetoprim em concentrações definidas (também chamada cotrimoxazol) é uma associação medicamentosa sinérgica, portanto racional, com espectro de atividade antimicrobiana muito extensa abrangendo um grande número de bactérias.

As propriedades farmacocinéticas das duas substâncias são muito semelhantes são bem absorvidos por via oral, e o pico de concentração sérica do trimetoprim é de uma a três horas e do sulfametoxazol é de uma a quatro horas. As meias-vidas dos dois componentes são muito semelhantes (em média de 10 horas para o trimetoprim e 11 horas para o sulfametoxazol). Vale ressaltar que aproximadamente 50-70% da dose de trimetoprim e 10-30% da dose de sulfametoxazol são excretadas inalteradas na urina. Essa combinação é indicada em casos de infecção do trato respiratório (bronquite, sinusite, otite), infecções do trato urinário e renal (cistites agudas e crônicas, uretrites, prostatites), infecções genitais em ambos os sexos, infecções gastrintestinais (*E. coli*) e infecções de pele.

Em consequência do grande consumo e uma enorme produção industrial desses antibióticos, observa-se que esses compostos foram detectados em águas superficiais e subterrâneas como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações médias de sulfametoxazol e trimetoprim detectados em ambientes aquáticos [41].

Fármaco (Classe terapêutica)	Concentração Média ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Matriz
Sulfametoxazol (antibiótico)	0,090	Efluente de ETE/Grécia
	0,010	Efluente de ETE/Itália
	0,020	Efluente de ETE/Suécia
	0,049	Efluente de ETE/Canadá
	0,58	Esgoto bruto/Espanha
	0,25	Efluente de ETE/Espanha
	0,40	Efluente de ETE/Alemanha
	0,41	Água subterrânea/Alemanha
	0,05	Água superficial/EUA
Trimetoprim (antibiótico)	0,070	Efluente de ETE/Itália
	0,065	Efluente de ETE/Canadá
	0,32	Efluente de ETE/Alemanha

Fonte: Melo, S. A. S., 2009, p.188-197.

1.3.1 Sulfametoxazol

O sulfametoxazol (SMX), 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida, como apresentado na Figura 2, é pertencente à classe das sulfonamidas, que são antibióticos que atuam na inibição competitiva na síntese do ácido fólico em microrganismos. Ele é utilizado em medicina humana para o tratamento urinário, particularmente para infecções causadas por *Escherichia coli* [42]. Tem um amplo espectro de atividade antibacteriana contra bactérias aeróbias gram-positivas e gram-negativas, sendo também eficaz contra protozoários [43-44]. No entanto, SMX pode produzir uma variedade de efeitos colaterais que incluem perturbações gastrointestinais, reações de hipersensibilidade, e um número de anormalidades hematológicas, tais como trombocitopenia, agranulocitose, megaloblastose, eosinofilia, e sulfemoglobinemia [45-46]. O SMX apresenta baixa metabolização e, conseqüentemente, uma alta concentração na urina. A dose

comum é 1,5-4 mg em três ou quatro doses por dia. Menos do que 10% dessa quantidade é excretada na forma acetilada inativa. Além de medicina humana, também é aplicado na medicina veterinária para o tratamento curativo.

Figura 2- Fórmula estrutural do sulfametoxazol.

Fonte: Autoria própria

1.3.2 Trimetoprim

Trimetoprim (TMP), 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxybenzil) pirimidina, apresentado na Figura 3, é um agente antibacteriano bem conhecido usado como um potenciador em combinação com várias sulfonamidas, como o SMX, para o tratamento de uma série de infecções bacterianas [47-48]. É um análogo do ácido fólico e como tal o substitui na enzima bacteriana diidrofolato redutase que o sintetiza. É, portanto um antagonista do ácido fólico, inibindo a sua formação pela bactéria. O ácido fólico é essencial para a replicação das bactérias, já que é usado na duplicação do DNA. Esse antibiótico não mata as bactérias, mas inibe a sua multiplicação permitindo ao sistema que as elimine facilmente. O trimetoprim é ativo contra a maioria dos patógenos bacterianos comuns. As sulfonamidas podem potencializar a ação do trimetoprim, pois inibem a mesma via metabólica bacteriana, porém acima do local de ação do diidrofolato redutase. No Reino Unido, seu uso está geralmente restrito ao tratamento da pneumonia pelo *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose e nocardiose. Misturas binárias de TMP e SMX são atuais em preparações farmacêuticas comerciais, como Bactrim (relação 1:5), mas TMP pode também ser fornecido como um único agente.

Figura 3 - Fórmula estrutural do trimetoprim.

Fonte: Autoria própria

1.3.3 Contaminação de efluentes

Muitos fármacos são encontrados em águas de efluente e esses são desenvolvidos pelos laboratórios para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém, 50% a 70% de uma dosagem do fármaco é excretada inalterada e persiste no meio ambiente. O uso desenfreado de antibióticos acarreta dois problemas ambientais: um, é a contaminação dos recursos hídricos e o outro, seria a resistência que alguns microrganismos criam a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e frequentemente fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos. Assim, uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias [49].

Os antibióticos têm sido amplamente discutidos na literatura, devido ao seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente [50-51] e por serem usados em grandes quantidades, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária (crescimento do gado, na aquicultura e produção avícola e suína) [52].

Uma classe desses antibióticos são as sulfonamidas que podem ser encontradas em alimentos de origem animal, tais como mel, leite, ovos, peixes e carnes. A maioria das sulfas apresenta meia-vida relativamente longa, ocasionando sérios problemas para a saúde humana, entre os quais reações alérgicas ou tóxicas. Algumas sulfonamidas podem ser potencialmente carcinogênicas e estima-se ainda que aproximadamente 5% dos pacientes humanos que são tratados com sulfonamidas sofram efeitos colaterais [53]. Por sua vez, o amplo uso de medicamentos veterinários pode ser responsável pelo aparecimento de cepas de bactérias resistentes. O limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pela Comunidade Européia para o total de sulfonamidas em músculo, fígado, rim e leite é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ [54].

As sulfonamidas, bem como outros medicamentos, têm sido administradas ao gado leiteiro, e resíduos dessas substâncias podem ser encontrados no leite. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu um LMR de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, como medida preventiva de saúde pública. Este limite refere-se à soma das concentrações totais de sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ) e sulfadimetoxina (SDM) [55].

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver, caracterizar e aplicar dispositivos eletroquímicos integrados com grafeno e nanopartículas de prata, sendo esse compósito sintetizado por dois métodos distintos, para a determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprim em efluentes. Sendo assim, avaliar qual síntese mais eficaz para a produção do compósito baseado em rGO e AgNPs.

De maneira geral pretendeu-se ampliar os conhecimentos e estratégias para a aplicação da nanotecnologia no monitoramento de antibióticos e fornecer subsídios para futuros estudos de outras classes de fármacos e demais contaminantes emergentes.

3 METODOLOGIA

3.1 Instrumentação e Métodos

Experimentos de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizados utilizando um sistema eletroquímico modelo Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie, Utrecht, Holanda) equipado com software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Holanda). Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (GC), eletrodo GC modificado com óxido de grafeno (GC/GO), eletrodo GC modificado com óxido de grafeno reduzido (GG/rGO) e eletrodo GC/rGO modificado com nanopartículas de prata (AgNPs) como eletrodos de trabalho (diâmetro 3,0 mm), um eletrodo de Ag/AgCl/KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência e uma placa de Pt como eletrodo auxiliar, como exemplificado na figura 4. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

Figura 4 - Célula Eletroquímica Convencional.

A caracterização eletroquímica dos compósitos rGO-AgNPs, sintetizados pelo método químico e pelo método eletroquímico (baseado na eletrodeposição de AgNPs coloidal), foi realizada utilizando CV no intervalo de -0,3 a +0,8 V vs. Ag/AgCl em solução 0,5 mol L⁻¹ KCl (Sigma-Aldrich) com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e, a partir de comparações do perfil voltamétrico dos compósitos na presença do par redox [Fe(CN)₆]³⁺/[Fe(CN)₆]⁴⁺ (Sigma-Aldrich) em solução de HCl (Sigma-Aldrich) 0,10 mol L⁻¹.

As morfologias dos nanomateriais (GO, rGO, rGO-AgNPs eletroless e rGO-AgNPs coloidal) foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons (FEG-SEM), no qual foi utilizado um microscópio FEI Inspect F50 (FEI Company, Hillsboro, USA).

As medidas de massa foram realizadas utilizando uma balança analítica Metler Toledo (modelo AL 204) com capacidade máxima de 210 g, sensibilidade de 0,0001 g. Para a determinação do pH das soluções utilizadas nestes estudos, utilizou-se um pHmetro Qualxtron Modelo 8010 (Hexis Científica, Jundiaí, Brasil) calibrado com soluções padrão de pH 7,00 e 4,00.

3.2 Síntese do óxido de grafeno

O GO foi preparado a partir do pó de grafite (tamanho de partícula <20 µm Sigma-Aldrich) pelo método modificado de Hummers [21].

Na sequência relatam-se todas as etapas da síntese do GO.

- 1) Inicialmente foi pesada uma massa de 12,120 g de grafite a qual foi colocada em um béquer de 250 mL, e acrescentada uma massa de 11,952 g de NaNO₃ (Sigma-Aldrich), que por sua vez ajuda como “catalisador” para a reação de oxidação do grafite, sendo o recipiente reservado à parte;
- 2) Em seguida, adicionou-se 400 mL de H₂SO₄ (Sigma-Aldrich) com o auxílio de uma proveta em um erlenmeyer de 1000 mL, sendo colocado em banho de gelo;
- 3) Transferiu-se, então, a mistura de grafite e catalisador para um kitassato imerso no banho de gelo, sendo ambos os recipientes (erlenmeyer e bacia) colocados sobre um o agitador magnético, conforme apresentado na Figura 5.

- 4) Promoveu-se a agitação magnética da mistura de forma branda, por um período de aproximadamente 30 minutos.

Figura 5 - Primeira etapa da síntese do GO.

Fonte: Autoria própria

- 5) Enquanto se esperava o tempo mencionado anteriormente, foi pesada uma massa de 60,093 g de KMnO_4 (Sigma-Aldrich) em um béquer de 250 mL previamente tarado sobre a balança.
- 6) Decorrido o tempo esperado (~ 30 min.), adicionou-se lenta e cuidadosamente todo o permanganato de potássio à mistura do erlenmeyer, mantida ainda sob agitação e banho de gelo. Outra vez, esperou-se um tempo de aproximadamente 30 min. para a reação de oxidação do grafite ocorrer e, após a liberação total dos vapores originados no processo, vedou-se a boca do erlenmeyer com *parafilm*[®];
- 7) O recipiente foi então colocado na geladeira e deixou-se o mesmo em repouso por um período de 24 horas;

- 8) No dia seguinte, retirou-se o erlenmeyer da geladeira e aqueceu-se a mistura sobre uma chapa de aquecimento com temperatura por volta de 40 °C cerca de 20 minutos – o grafite oxidado é bastante viscoso, por isso, aqueceu-se a mistura com o intuito de torná-la menos densa, ou seja, “mais líquida”;
- 9) Enquanto esperava-se o aquecimento da mistura, preencheu-se completamente uma proveta de 150 mL com H₂O₂ (Synth). Este volume foi então colocado em uma pisseta e, com o auxílio desta, transferiu-se o H₂O₂ aos poucos (utilizando um conta-gotas, quando necessário) no erlenmeyer;
- 10) Após a minimização dos gases desprendidos durante o processo, esperou-se o resfriamento parcial da mistura e dividiu-se a quantidade contida no erlenmeyer (~ 600 mL) ao meio, transferindo-se metade desse volume para outro erlenmeyer;
- 11) A seguir, adicionou-se 500 mL de água ultrapura (*Thermo Scientific – Nanopure*) a ambas as partes, deixando os volumes próximos a 800 mL;
- 12) Esperou-se o completo resfriamento das misturas até a temperatura ambiente e vedou-se ambos os erlenmeyers com *parafilm*® deixando-os em repouso absoluto na geladeira por um período de 4 dias;
- 13) Após este tempo, os sobrenadantes de cada erlenmeyer foram transferidos e reunidos em tubos para posterior centrifugação (os sólidos presentes no fundo dos recipientes, contendo diversas espécies e impurezas oxidadas, foram desprezados);
- 14) Os sobrenadantes foram então centrifugados à rotação de 8.000 rpm por 30 min. Após, lavou-se o sólido resultante primeiramente centrifugando-o com HCl 5% (Synth) e depois utilizando água ultrapura, por várias vezes, até que o pH do sobrenadante encontrava-se próximo a 7. Finalmente, o sólido resultante foi liofilizado. Um sólido marrom foi obtido, o qual foi posteriormente caracterizado como sendo *óxido de grafeno – GO*.

3.3 Preparação do GO modificado com AgNPs pelo método químico

A síntese do compósito rGO/AgNPs foi realizada utilizando dodecilsulfato de sódio (SDS) como surfactante. Assim, uma suspensão contendo uma proporção em massa de 10:4 (GO/SDS), por exemplo, 100 mg de GO e 40 mg de SDS (Sigma-Aldrich), foi preparada em 100 mL de etanol e submetida ao ultrassom durante 20 min. Um excesso de borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich) foi adicionado, e essa suspensão foi sonicada durante mais 20 min. Uma solução contendo 40% de AgNO_3 (Sigma-Aldrich), em relação a quantidade de GO, proporção essa que foi otimizada, foi lentamente adicionada a suspensão de rGO (pois nessa etapa o GO já foi reduzido) e mantida sob agitação constante. Assim, que a reação se completou, o compósito rGO-AgNPs foi disperso utilizando uma sonda ultrassônica durante 1 h. Após, o compósito rGO-AgNPs foi centrifugado por 10 min com rotação de 3000 rpm e lavado por várias vezes com água ultrapura até a solução tornar-se incolor. Finalmente, 5 mL de etanol foi adicionado ao compósito resultante e, então, o rGO-AgNPs foi seco em estufa à 60 °C.

3.4 Preparação das AgNPs pelo método coloidal

As AgNPs foram preparadas a partir da adição gota a gota de 10 mL de uma solução 1,0 mmol L⁻¹ de AgNO_3 em 30 mL de NaBH_4 de concentração 2,0 mmol L⁻¹. A adição de nitrato de prata foi realizada lentamente (uma gota por segundo), sob agitação magnética e em banho de gelo. Inicialmente, a solução se tornou levemente amarela, mas mudou para amarelo brilhante quando todo o volume de AgNO_3 foi adicionado. Após, a mudança de cor a agitação foi finalizada. A solução amarela de AgNPs foi estocada sob refrigeração.

3.5 Preparação dos eletrodos de carbono vítreo (GC) modificados com os compósitos

Inicialmente foi realizada uma etapa de limpeza e condicionamento do eletrodo GC. A limpeza constituiu-se em polimento do eletrodo em suspensão de alumina 0,5 µm, seguido de banho de ultrassom em etanol por cinco minutos e em água ultrapura por mais cinco minutos. O eletrodo GC polido e limpo foi imerso em

solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0, e foi aplicado um potencial de + 1,5 V por 60s, seguido por aplicação de um potencial -1,55 V vs. Ag/AgCl por 60s. Finalmente, foram feitos voltamogramas cíclicos entre os potenciais de -1,0 V e +1,0 V vs. Ag/AgCl, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} até obter um voltamograma reproduzível.

Após a etapa de limpeza e condicionamento do eletrodo GC, 10 μL da suspensão baseada em 1,0 mg rGO/AgNPs (preparada pelo método químico) e 1,0 mL de água foi gotejada sobre a superfície do eletrodo e o eletrodo GC/rGO/AgNPs foi seco em temperatura ambiente.

Para a eletrodeposição das AgNPs coloidal, o eletrodo GC polido e limpo foi modificado com uma suspensão baseada em 1,0 mg GO e 1,0 mL de água. Após, o eletrodo GC/GO foi imerso em 12 mL de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 8 mL de AgNPs coloidal utilizando cronoamperometria, no qual o potencial de -1,0 V foi aplicado por 420 s [56]. Após esta etapa, o eletrodo GC/rGO-AgNPs foi lavado com água ultrapura e seco em temperatura ambiente.

3.6 Otimização dos parâmetros para análise simultânea de SMX e TMP em solução tampão

A determinação simultânea de soluções padrão de SMX e TMP (Sigma-Aldrich) foi realizada utilizando DPV em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão Britton-Robinson (BR) e pH 8,0. Parâmetros que afetam a corrente de pico como amplitude pulso, incremento de potencial, velocidade de varredura foram variados e otimizados. Após as figuras de mérito foram obtidas.

3.7 Preparação da amostra de água residuária sintética para a análise de SMX e TMP

O eletrodo GC/rGO-AgNPs foi aplicado na determinação simultânea de SMX e TMP em água residuária sintética simulando efluente de suinocultura pré-tratado por lagoa de estabilização, baseada na proposta de Bergmann et al. [57]. A Tabela 2 apresenta a composição da água residuária sintética apresentada por Bergmann e colaboradores.

Tabela 2 - Constituição da água residuária sintética simulando efluente de suinocultura

Espécie química	Concentração/ mg L⁻¹
NH ₄ ⁺	483
NO ₃ ⁻	0,93
PO ₄ ⁻	98
K ⁺	485
Ca ⁺²	122
Mg ⁺²	40
Cl ⁻	301
Fe ⁺²	7,87
S	34
Na ⁺	175
B	0,68
Mn ⁺²	0,88
Zn ⁺²	3,07
Cu ⁺²	1,21
Mo ⁺²	0,02
Co ⁺²	0,02

Fonte: B.A. Bergmann, **2000**, p. 13.

Quantidades conhecidas das soluções padrão de SMX e TMP foram adicionados a uma alíquota de 10 mL de água residuária sintética, preparada de acordo com a Tabela 2, resultando em uma concentração final de 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX e TMP. Esta amostra foi misturada com 10 mL de 0,1 mol L⁻¹ solução tampão BR pH 8,0. Nenhum tratamento adicional da amostra foi feito. A quantidade de SMX e TMP foi determinada por três adições sucessivas de alíquotas das soluções padrão de SMX e TMP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos compósitos baseados em rGO e AgNPs

A morfologia das superfícies do GO, e dos compósitos rGO/AgNPs (método químico e rGO-AgNPs (método eletroquímico) foram caracterizadas por FEG-SEM. Uma gota de uma suspensão etanólica de cada material foi gotejada sobre o substrato de silício e as micrografias FEG-SEM do GO e dos compósitos rGO/AgNPs e rGO-AgNPs são apresentadas na Figura 6. A Figura 6A mostra imagens típicas do GO em que é evidente que o material consiste em uma mistura de camadas únicas e multicamadas de grafeno. O óxido de grafeno como os materiais bidimensionais tendem a empilhar devido as interações π - π , o que provoca o bloqueio dos sítios cataliticamente ativos [58]. Já, a Figura 6B apresenta a imagem do compósito rGO-AgNPs, na qual é possível observar que o rGO foi modificado com um grande número de nanopartículas de prata. Além disso, as folhas do rGO, exibem uma estrutura típica torcida e com muitas ondulações. A redução do óxido de grafeno faz com que as folhas se desempilhem e, conseqüentemente, há o desbloqueio dos sítios ativos. Também é possível observar que as AgNPs estão bem dispersas nas folhas de rGO e apresentam tamanhos que variam entre 5 e 60 nm. A Figura 6C mostra a imagem do compósito rGO/AgNPs, na qual também é possível observar que as folhas de rGO foram modificadas com as AgNPs, porém essas nanopartículas estão mais aglomeradas, ficando mais difícil dimensioná-las.

Figura 6 - Micrografias FEG-SEM para os materiais sintetizados: **(A)** GO, **(B)** compósito rGO-AgNPs (método eletroquímico), **(C)** compósito rGO/AgNPs (método químico).

A presença de AgNPs no compósito também foi caracterizada eletroquimicamente. Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O comportamento eletroquímico do eletrodo GC modificado com GO foi comparado com a resposta voltamétrica dos eletrodos GC/rGO/AgNPs e GC/rGO-AgNPs. Nenhum processo eletroquímico foi observado na resposta voltamétrica usando o eletrodo GC/GO (curva a) como mostrado na Figura 7. No entanto, o eletrodo GC modificado com ambos os compósitos rGO/AgNPs (método químico) e rGO-AgNPs (método eletroquímico) apresentaram processos eletroquímicos referentes às

AgNPs presentes no eletrodo. O eletrodo GC/rGO/AgNPs (curva b) apresentou um pico de oxidação bem definido em +0,36 V. Este processo é atribuído à oxidação de Ag^0 para Ag^+ . Um processo quase reversível em +0,09 V correspondente à redução da Ag^+ também foi observado. O eletrodo GC/rGO-AgNPs (curva c) apresentou o mesmo processo quase reversível, mas nos potenciais de +0,29 V e +0,19 V, aumentando a reversibilidade dos processos de oxidação e redução da Ag. Também observou-se um aumento da corrente capacitiva no voltamograma do composto sintetizado pelo método eletroquímico, provavelmente devido as AgNPs sintetizadas por esse método estarem mais dispersas na superfície do sensor aumentando, assim, sua área superficial. Esses processos eletroquímicos para os picos de Ag na superfície do eletrodo estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura [59,60].

Figura 7 - Caracterização eletroquímica em solução 0,5 mol L⁻¹ KCl com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO/AgNPs (método químico) e (c) GC/rGO-AgNPs (método eletroquímico).

Experimentos de voltametria cíclica na presença do par redox $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN}_6)]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN}_6)]^{4-}$ também foram realizados para a caracterização eletroquímica dos materiais. A Figura 8 apresenta os perfis voltamétricos para os três diferentes eletrodos: a)

GC/GO, b) GC/rGO/AgNPs (método químico) e c) GC/rGO-AgNPs (método eletroquímico) em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ contendo quantidades equimolares de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Os perfis voltamétricos apresentaram picos de oxidação e redução bem definidos para os três eletrodos estudados devido ao par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em potenciais de aproximadamente $+0,41 \text{ V}$ e $+0,34 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente. No entanto, o eletrodo GC/rGO/AgNPs (curva b) apresentou um aumento de 1,4 vezes nas correntes de pico quando comparado com o eletrodo GC/GO (curva a), aumento esse devido à presença de defeitos introduzidos por grupos funcionais além das AgNPs. Já o eletrodo GC modificado com o compósito rGO-AgNPs (curva c) apresentou um aumento ainda maior de 1,7 vezes nas correntes de pico quando comparado com o eletrodo GC/GO e um aumento 1,2 vezes nas correntes de pico em relação ao eletrodo GC/rGO/AgNPs. O aumento nas correntes de pico anódico e catódico observados para ambos os compósitos podem ser atribuídos ao aumento na área superficial do eletrodo devido ao efeito sinérgico do rGO e das AgNPs. Novamente, as maiores correntes de pico observadas no compósito obtido via eletroquímica se devem às AgNPs estarem mais dispersas na superfície desse sensor.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO-AgNPs eletroless e (c) GC/rGO-AgNPs coloidal em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Uma forma de caracterização visual do material para observar se realmente o GO foi obtido e se após a síntese obteve-se a sua redução é pela cor do material. A Figura 9 apresenta as suspensões para a) GO, b) rGO, obtido pelo método químico como descrito na Seção 3.3, porém sem adicionar o AgNO_3 e c) compósito rGO/AgNPs sintetizado pelo método químico. Observa-se que a suspensão do GO obtido pelo método modificado de Hummers apresenta uma cor amarelada (Figura 9a), cor esta característica do óxido de grafeno. Já a Figura 9b apresenta o GO reduzido com borohidreto de sódio resultando em uma suspensão marrom, caracterizando o rGO e quando a redução ocorre na presença de AgNO_3 para formar o compósito rGO/AgNPs a suspensão se torna preta (Figura 9c).

Figura 9 - Imagem dos vários tipos de grafeno dispersos em água (1,0 mg do material para 1,0 mL de água): a) GO, b) rGO e c) compósito rGO/AgNPs.

4.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo GC/rGO-AgNPs no processo de oxidação do SMX e TMP

O comportamento eletroquímico do SMX e TMP no eletrodo GC/rGO-AgNPs (método eletroquímico) foi avaliado em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), contendo de SMX e TMP por voltametria cíclica com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os resultados são apresentados na Figura 10. Nenhum processo eletroquímico foi observado na resposta voltamétrica do eletrodo proposto na

ausência de SMX e TMP (linha preta pontilhada). No entanto, na presença dos compostos (linha vermelha contínua), tanto o SMX quanto o TMP exibiram um pico de oxidação irreversível bem definido em +0,92 V e +1,14 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹), respectivamente. Uma vez que os potenciais de pico anódico para o SMX e TMP são separados por 0,22 V, é possível realizar a determinação simultânea destes dois antibióticos sob tais condições.

Figura 10 - Voltametria cíclica utilizando o eletrodo GC/rGO-AgNPs em 0,1 mol L⁻¹ BR pH 8,0, na ausência (linha pontilhada **preta**) e na presença (linha sólida **vermelha**) de 50,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP com velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

Com o intuito de confirmar o mecanismo de oxidação do SMX e TMP no eletrodo GC/rGO-AgNPs, a dependência do processo de oxidação eletroquímico do SMX e TMP em relação ao pH foi estudada pelos experimentos de DPV variando o pH entre 3,0-9,0 em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ contendo 10,0 µmol L⁻¹ de SMX e 10,0 µmol L⁻¹ de TMP. Os resultados são apresentados na Figura 11, que é um gráfico da corrente de pico anódica (I_{pa}) e o potencial de pico anódico (E_{pa}) obtidos por DPV em função do pH para SMX (Figura 11A) e para TMP (Figura 11B). A variação do E_{pa}

com o pH pode fornecer informações valiosas sobre o processo de oxidação do SMX e TMP. Para ambos SMX e TMP, a redução da concentração de hidrogênio iônico no eletrólito provoca um deslocamento no potencial de pico para valores mais negativos, tal como ilustrado nas Figuras 11A e 11B. Isso é uma consequência da desprotonação no processo de oxidação que é facilitada em valores de pH mais elevados. O E_{pa} vs. pH mostrou uma relação linear, com uma inclinação de 30,7 mV por unidade de pH para SMX e 12,4 mV por unidade de pH para o TMP. Portanto, os processos eletroquímicos não envolvem o mesmo número de prótons e elétrons durante a eletro-oxidação do SMX e TMP.

O gráfico de I_{pa} em relação ao pH para SMX (Fig. 11A) mostra que a corrente de pico anódica apresenta um valor máximo em pH 8,0, diminuindo para ambos os valores de pH mais elevados e mais baixos. Para TMP (Fig. 11B), a maior corrente de pico anódica foi observada em pH 3,0, diminuindo para valores de pH mais elevados. No entanto, como a determinação desses compostos é simultânea e, uma vez que para o SMX em pH 3,0 a corrente de pico anódica tem o menor valor de pico observado e, a corrente observada para a oxidação de TMP em pH 8,0 não é relativamente baixa em relação aos pHs 6,0 e 7,0, uma solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 foi utilizada nos próximos estudos.

Figura 11 - Efeito do pH no potencial de pico (■) e na corrente de pico (●) para **A)** oxidação do SMX e **B)** oxidação do TMP no eletrodo GC/rGO-AgNPs utilizando solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ contendo 10,0 μmol L⁻¹ de cada antibiótico. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV.

4.3 Parâmetros para a otimização do SMX e TMP em resposta ao eletrodo GC/rGO-AgNPs

Para maximizar o sinal analítico por DPV, os efeitos dos parâmetros experimentais (composição do eletrodo, amplitude de pulso, potencial e tempo de limpeza da superfície do eletrodo) foram estudados utilizando eletrodo GC/rGO-AgNPs em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em pH 8,0 contendo 50,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP e velocidade de varredura fixa de 10 mV s⁻¹. O efeito do potencial de pré-tratamento foi avaliado primeiro, pois a detecção eletroquímica do SMX e TMP utilizando o eletrodo GC/rGO-AgNPs foi acompanhada pela adsorção do SMX e TMP ou de seus produtos de oxidação. Assim, existe um envenenamento da superfície do eletrodo e, conseqüentemente, uma diminuição do sinal analítico dos dois antibióticos.

A influência da aplicação do potencial de pré-tratamento foi investigada a fim de limpar a superfície do eletrodo. Utilizando-se DPV, o potencial de pré-tratamento foi aplicado nos seguintes valores: -1,2; -1,1; -1,0; -0,75; -0,5; -0,25, 0; +0,25; +0,35 V e os resultados são mostrados na Figura 12. Uma recuperação média 99,4% da resposta original para ambos os antibióticos SMX e TMP foi obtida no potencial de -1,2 V, visto que para potenciais de limpeza mais positivos as correntes de pico anódica diminuem significativamente. Assim, o potencial de pré-tratamento de -1,2 V foi utilizado nos próximos estudos.

A influência do tempo de pré-tratamento também foi avaliada. Foram feitas variações de 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 s, como apresentado na Figura 13. Observa-se que as correntes de pico anódica para o TMP aumentam no intervalo de 30 a 240 s. Já para o SMX as correntes de pico anódica aumentam no intervalo de 30 a 120 s, e diminuem quando tempos maiores de pré-tratamento são utilizados. Isso acontece, pois, tempos maiores de limpeza faz com que ocorra, além da limpeza, também a pré-concentração do TMP na superfície do eletrodo, aumentando suas correntes de pico e fazendo com que haja uma competição entre o TMP e SMX pelos sítios ativos do eletrodo. Assim, as correntes de pico anódico do SMX diminuem. Portanto, o tempo de pré-tratamento de 120 s foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Figura 12 - Efeito do potencial de pré-tratamento sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV.

Figura 13 - Efeito do tempo de pré-tratamento sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,6 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV.

O próximo estudo realizado foi o da amplitude de pulso, a qual foi variada entre 15 e 100 mV, como apresentado na Figura 14. Os voltamogramas de pulso diferencial também são apresentados na Figura 14, para mostrar que não foi observado nenhum aumento significativo nas larguras dos picos para a oxidação do SMX e TMP, mesmo em amplitudes maiores que 50 mV. Uma vez que as correntes de pico foram proporcionais ao aumento da amplitude de pulso para o TMP e que para o SMX a maior corrente de pico anódica também foi observada em 100 mV, esta amplitude de pulso de 100 mV foi escolhida como a amplitude otimizada por DPV.

Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial utilizando diferentes amplitudes de pulso em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 μmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,65 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e potencial e tempo de pré-tratamento de -1,2 V por 120 s. No detalhe: Efeito da amplitude de pulso sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■).

O último parâmetro avaliado foi o efeito da quantidade de AgNPs na composição do eletrodo GC/rGO-AgNPs. Assim, diferentes concentrações de AgNPs em solução KCl 0,1 mol L⁻¹ foram avaliadas, no qual o potencial de -1,0 V foi aplicado por 420 s para a eletrodeposição das AgNPs utilizando cronoamperometria. Após esta etapa, cada eletrodo GC/rGO-AgNPs contendo diferentes quantidades de AgNPs foi lavado com água ultrapura e seco em temperatura ambiente. Utilizando-se DPV nas condições otimizadas descritas acima, as correntes de pico anódica para ambos antibióticos foram avaliadas como apresentado na Figura 15. As correntes de pico anódica aumentaram tanto para o TMP quanto para o SMX quando a concentração de nanopartículas de prata em solução aumentou de 37,4 µmol L⁻¹ para 100,1 µmol L⁻¹, na qual atingiu os máximos valores de corrente para o TMP e SMX nesse valor. Para concentrações acima de 100,1 µmol L⁻¹ as correntes de pico anódica diminuíram. Portanto, de acordo com esses resultados a concentração de 100,1 µmol L⁻¹ de nanopartículas de prata coloidal em solução foi utilizada para a preparação do eletrodo GC/rGO-AgNPs.

Figura 15 - Efeito da quantidade de nanopartículas de prata sobre as correntes de pico anódica do SMX (●) e TMP (■) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 50,0 µmol L⁻¹ dos antibióticos. Intervalo de potencial: +0,65 a +1,2 V (vs. Ag/AgCl); velocidade de varredura 10 mV s⁻¹ e potencial e tempo de pré-tratamento de -1,2 V por 120 s.

4.4 Comparação do comportamento voltamétrico do SMX e TMP sobre diferentes eletrodos

Os experimentos de DPV foram realizados em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo 75,0 μmol L⁻¹ de ambos os antibióticos, utilizando os parâmetros otimizados descritos na Tabela 3, para os seguintes eletrodos: GC/GO (curva a), GC/rGO/AgNPs (método químico - curva b) e GC/rGO-AgNPs (método eletroquímico - curva c), como mostrado na Figura 16.

Os perfis voltamétricos apresentaram picos em potenciais quase idênticos em aproximadamente +0,79 V (SMX) e +1,04 V (TMP) vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹) para todos os eletrodos estudados. No entanto, o eletrodo GC/rGO-AgNPs apresentou maiores intensidades das correntes de pico anódica para o SMX e TMP em comparação com as correntes observadas para os outros eletrodos. A oxidação do SMX e TMP no eletrodo GC modificado com o compósito rGO-AgNPs pelo método eletroquímico apresentou um aumento por um fator de 1,1 e 1,2, respectivamente, nas correntes de pico, quando comparado com o eletrodo que foi preparado pelo método químico, ou seja, o eletrodo GC/rGO/AgNPs (curva b). Em relação ao eletrodo GC/GO (curva a), um aumento por um fator de 1,2 e 1,6 foi observado para a oxidação do SMX e TMP, respectivamente. O aumento nos valores das correntes de pico anódica reflete o efeito sinérgico do GO e das AgNPs e o aumento da área superficial no eletrodo compósito obtido via eletroquímica. Essas propriedades fazem com que o eletrodo GC/rGO-AgNPs seja promissor na determinação simultânea de SMX e TMP.

Além disso, quando a análise simultânea desses antibióticos foi realizada utilizando um eletrodo compósito de parafina baseado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com nanopartículas de antimônio os perfis voltamétricos para o SMX e TMP foram observados em +0,86 V e +1,11 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹), respectivamente [61]. Esses potenciais são mais elevados comparados aos potenciais obtidos com eletrodos propostos nesse trabalho, mostrando as propriedades eletrocatalíticas do grafeno quando comparado ao MWCNT.

Tabela 3 - Parâmetros otimizados por DPV para determinação simultânea de SMX e TMP usando eletrodo de GC/rGO-AgNPs.

Parâmetros	Valor otimizado
Amplitude de pulso	100 mV
Potencial de pré-tratamento	-1,2 V vs. Ag/AgCl
Tempo de pré-tratamento	120 s
Quantidade de AgNPs em solução	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Eletrólito suporte e pH	0,1 mol L^{-1} tampão BR e pH 8,0

Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os parâmetros otimizados descritos na Tabela 3 em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 8,0 contendo 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX e TMP para os seguintes eletrodos: GC/GO (curva a), GC/rGO/AgNPs (curva b) e GC/rGO-AgNPs (curva c).

4.5 Resposta analítica do SMX e TMP

Utilizando as condições otimizadas por DPV, descritas na Tabela 3, o eletrodo GC/rGO-AgNPs foi aplicado para avaliar a resposta eletroquímica em função da concentração de SMX e TMP. Todas as medidas foram feitas em triplicada. A resposta analítica mostrada na Figura 17 sugere um intervalo linear entre 1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tanto para o SMX quanto para o TMP, de acordo com as seguintes equações:

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,24 (\mu\text{A}) + 0,09 (\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{SMX}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (1)$$

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 1,07 (\mu\text{A}) + 0,10 (\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{TMP}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (2)$$

Com um coeficiente de correlação de 0,996 ($n = 7$) e 0,999 ($n = 7$) para SMX e TMP, respectivamente. O limite de detecção para o SMX foi 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para o TMP foi 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ determinados utilizando 3σ /coeficiente angular; onde σ é o desvio padrão do valor médio de 10 voltamogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC [62].

Ao comparar os resultados do eletrodo GC/rGO-AgNPs com outros métodos eletroquímicos, encontrou-se que o dispositivo potenciométrico de microfluídica (LTCC/ μ POT) apresentou limites de detecção mais elevados ($1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para SMX e $6,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para TMP) [63]. Limites de detecção mais elevados de $1,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ambos para o SMX também foram observados usando um eletrodo de grafite de lápis modificado com polipirrol oxidado [64] e um eletrodo de diamante dopado com boro, respectivamente [65]. Limites de detecção menores ao calculado com o eletrodo proposto, tanto para o SMX quanto para o TMP, foram relatados por Andrade *et al.* [66] utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro.

Atualmente, ainda não há uma normativa brasileira para controlar o limite máximo de resíduo permitido dos antibióticos estudados em efluentes. Apesar do eletrodo proposto não apresentar baixos limites de detecção para os antibióticos estudados, destaca-se a vantagem do eletrodo GC/rGO-AgNPs, sua reprodutibilidade e repetibilidade nos experimentos.

A reprodutibilidade do eletrodo GC/rGO-AgNPs foi medida a partir de cinco experimentos. Cada experimento consistiu em sete voltamogramas de DPV sequenciais. Esses experimentos foram realizados em dias diferentes, nos quais os

eletrodos foram preparados dia-a-dia, ou seja, utilizando filmes diferentes. Os voltamogramas de DPV foram realizados em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0, contendo 10,0 µmol L⁻¹ de SMX e TMP. O desvio padrão calculado foi de 1,8% e 1,5% para o SMX e TMP, respectivamente. Além disso, testes de repetibilidade foram realizados a partir de 10 voltamogramas de DPV dessa mesma solução. O desvio padrão calculado foi de 1,1% e 1,0% para o SMX e TMP, respectivamente.

Figura 17 - Curva analítica usando DPV realizada com o eletrodo GC/rGO-AgNPs em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 para concentrações de SMX: (a) 1,0; (b) 3,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0; (f) 8,0 e (g) 10,0 µmol L⁻¹ e para concentrações de TMP: (a) 1,0; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 5,0; (e) 6,0; (f) 8,0 e (g) 10,0 µmol L⁻¹. (A) Dependência linear das correntes de pico com as concentrações de SMX e (B) Dependência linear das correntes de pico com as concentrações de TMP.

4.6 Determinação seletiva de SMX e TMP em interferentes

A possibilidade de determinar SMX e TMP, na presença de outros compostos orgânicos presentes em água residuária sintética, incluindo interferentes endócrinos e pesticidas foram investigados. Os interferentes endócrinos estudados foram o 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) e o pesticida foi o carbaril. Em todos os experimentos de DPV não foi observado um processo de oxidação dos interferentes E2, E3 e carbaril no intervalo estudado de +0,6 a +1,2 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹).

O efeito do E2, E3 e do carbaril nas correntes de pico de oxidação do SMX e TMP foram avaliados utilizando solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0 contendo uma concentração fixa em 10,0 μ mol L⁻¹ de SMX e TMP, e adições sequenciais de 5,0; 10,0 e 20,0 μ mol L⁻¹ de E2, E3 e carbaril e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito dos interferentes E2, E3 e carbaril no processo de oxidação do SMX e TMP com as condições otimizadas por DPV, quando comparado com a solução que não contem o interferente.

Interferente	Concentração / μ mol L ⁻¹	(%) do sinal SMX*	(%) do sinal TMP*
E2	5,0	94,0	97,0
	10,0	89,3	92,4
	20,0	82,6	87,9
E3	5,0	98,9	98,1
	10,0	98,9	96,4
	20,0	86,7	82,5
Carbaril	5,0	85,3	94,0
	10,0	79,2	86,5
	20,0	75,6	79,2

* em relação a 10,0 μ mol L⁻¹ de SMX e TMP em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0, sem interferente

Fonte: Autoria própria

É possível observar que todos os interferentes estudados diminuem as correntes de pico anódica do SMX e TMP e que maiores supressões nas correntes do SMX e TMP são observadas na presença do pesticida carbaril. Porém, a influência dos interferentes foi constante, ou seja, as correntes de pico anódica do SMX e TMP diminuem conforme as concentrações dos interferentes é aumentada. Desta forma conclui-se que o método é sujeito a interferências, no entanto, as substâncias interferentes estudadas não mudaram significativamente os potenciais de pico de oxidação do SMX e TMP, havendo a possibilidade da determinação simultânea de SMX e TMP nessas amostras usando o procedimento de adição de padrão.

4.7 Análise simultânea de SMX e TMP em águas residuárias sintética

O eletrodo desenvolvido foi utilizado para a quantificação de SMX e TMP em águas residuárias sintética simulando efluente de suinocultura, preparada como descrito no item 3.7 da parte experimental. Determinações do SMX e TMP foram realizadas em triplicada, sem qualquer processo de tratamento, usando o método de adição de padrão e os resultados são apresentados na Figura 18. Os resultados obtidos (média $\pm$ SD) para três determinações foram: $2,8 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para SMX e $3,2 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para TMP. Recuperações entre 95,1% e 104,8% de SMX em amostras de águas naturais ($n = 3$) foram obtidas para 2,0; 4,0 e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX adicionado em cada amostra. Para TMP, recuperações entre 97,8 e 102,4% em amostras de águas naturais ($n = 3$) foram obtidas para 2,0; 4,0 e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TMP adicionado em cada amostra.

Não houve diferenças significativas entre as concentrações adicionadas e encontradas nos antibióticos, o que indica que o eletrodo GC/rGO-AgNPs pode ser usado com sucesso na determinação simultânea de SMX e TMP em amostras de águas residuárias, sob as condições otimizadas e utilizando o método de adição de padrão.

Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido para o eletrodo de GC/rGO-AgNPs na detecção de SMX e TMP em águas residuárias sintética simulando efluente de suinocultura **S**) amostra; **a**) amostra adicionada com $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX e TMP; **b**) amostra adicionada com $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX e TMP, e **c**) amostra adicionada com $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SMX e TMP.

5 CONCLUSÃO

O eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata foi avaliado na determinação simultânea dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim. O compósito proposto foi sintetizado por dois métodos diferentes. Pelas imagens de FEG-SEM, e pela caracterização eletroquímica observou-se que o compósito sintetizado pelo método eletroquímico (rGO-AgNPs) apresentou uma melhor dispersão das nanopartículas, resultando em um aumento da área superficial quando comparado ao compósito sintetizado pelo método químico (rGO/AgNPs). Além disso, o eletrodo GC/rGO-AgNPs apresentou uma melhora na resposta eletroquímica para a determinação simultânea de SMX e TMP quando comparado com o eletrodo de GC/GO e GC/rGO/AgNPs, evidenciando o efeito sinérgico do GO e das AgNPs e o aumento da área superficial no eletrodo compósito obtido via eletroquímica.

O dispositivo eletroquímico proposto é fácil de ser preparado, onde a maior dificuldade é a síntese do óxido de grafeno, a qual é trabalhosa e tem-se de partida uma média de 12 g de carbono que, ao final, fornece aproximadamente 250 mg de GO, tendo assim um rendimento médio de 2,1 %. Porém, na preparação da suspensão utiliza-se apenas 1,0 mg de GO para 1 mL de água, e na preparação de cada eletrodo utiliza-se 10 μ L da suspensão, preparando-se assim, uma média 100 filmes por suspensão, tornando assim o método viável.

O sensor proposto, GC/rGO-AgNPs, foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de SMX e TMP em amostras de águas residuárias apresentando-se como um material alternativo a ser utilizado na análise de antibióticos em amostras de interesse ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PEREG-BARNEA T., REFAEL G., Inducing topological order in a honeycomb lattice, **Physical Review B**, v. 85, n.7, 2012.
- [2] BOLOTIN K.I., et al., Ultrahigh electron mobility in suspended graphene, **Solid State Communications**, v.146, n. 9–10, p.351–355, 2008.
- [3] STOLLER M.D., et al., Graphene-based ultracapacitors, **Nano Letters**, v.8, n. 10, p. 3498–3502, 2008.
- [4] LEE C., et al., Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, **Science**, v.321n. 5887, p. 385–388, 2008.
- [5] WANG, G, ZHANG, L., ZHANG, J., A review of electrode materials for electrochemical supercapacitors, **Chemical Society Reviews**, v. 41, , p. 797-828, 2012
- [6] NOVOSELOV K.S., et al., Electric field effect in atomically thin carbon films, **Science**, v. 306 n.5696, p.666–669, 2004.
- [7] LI W., et al., High-density three-dimension graphene macroscopic objects for high-capacity removal of heavy metal ions, **Scientific Reports**, v. 3, p.2125, 2013.
- [8] LI D., et al., Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets, **Nature Nanotechnology**, v.3, n. 2, p. 101–105, (2008).
- [9] COMPTON O.C., NGUYEN S.T., Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials, **Small**, v. 6, n.6, p. 711–723, 2010.
- [10] ZHOU Y.Z., et al., Transparent and conductive reduced graphene oxide/silver nanoparticles multilayer film obtained by electrical self-assembly process with graphene oxide sheets and silver colloid, **RSC Advances**, v.3, n. 10, p. 3391–3398, 2010.
- [11] SHAO Y.L., et al., High-performance flexible asymmetric supercapacitors based on 3D porous graphene/MnO₂ nanorod and graphene/Ag hybrid thin-film electrodes, **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 6,p. 1245–1251, 2013.

[12] ZHU Z.J., et al., Preparation and application of thionin-bridged graphene–gold nanoparticle nanohybrids, **Journal of Materials Chemistry B**, v.1 n.10, p. 1432–1438, 2013.

[13] HILDER M., et al., Graphene/zinc nano-composites by electrochemical co-deposition, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 40, p. 14034–14040, 2012.

[14] PASRICHA R., GUPTA S., SRIVASTAVA A.K., A facile and novel synthesis of Ag–graphene-based nanocomposites, **Small**, v. 5, n. 20, p. 2253–2259, 2009.

[15] LIU J.B., et al., Toward a universal adhesive nanosheet for the assembly of multiple nanoparticles based on a protein-induced reduction/decoration of graphene oxide, **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 21, p. 7279, 2010.

[16] SHEN J.F., et al., One-pot hydrothermal synthesis of Ag-reduced graphene oxide composite with ionic liquid, **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 7795–7801, 2011.

[17] WALLACE, P. R. **The Band Theory of Graphite**. Physical. Review. vol. 71, n 9, pp. 622–634, 1947.

[18] LOH K.P., BAO Q.L., ANG P.K., YANG J.X., The chemistry of graphene, **J. Materials Chemistry**, v. 20, p. 2277, 2010.

[19] GEIM A.K., NOVOSELOV K.S., The rise of graphene, **Nat. Mater**, v. 6, p. 183, 2007.

[20] LI D., MULLER M.B., GILJE S., KANER R.B., WALLACE G.G., Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper, **Nat. Nanotech.**, v. 3, p. 101, 2008.

[21] HUMMERS JR., W.S., OFFEMAN, R.E., Preparation of graphitic oxide, **Journal of the American Society**, v.80, p. 1339, 1957.

[22] PARK S., RUOFF R.S., Chemical methods for the production of graphenes, **Nat. Nanotech**, v 4, p. 217, 2009.

[23] SCHNIEPP H.C., LI J.L., MCALLISTER M.J., SAI H., HERRERA-ALONSO M., ADAMSON D.H., PRUDHOMME R. K., CAR R., SAVILLE D.A., AKSAY I.A., Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide, **Journal of Physics Chemistry B**, v.110, p.8535-8539, 2006.

[24] STANKOVICH S., DIKIN D.A., PINER R.D., KOHLHAAS K.A., A. KLEINHAMMES, Y. JIA, Y. WU, S.T. NGUYEN, R.S. RUOFF, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, **Carbon**, v. 45, p. 1558, 2007.

[25] LIU A.R., et. al, A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized onto platinum nanoparticles modified graphene electrode, **Phys.Mech. Astr.**, v. 55, p. 1163, 2012.

[26] GU Z.G., YANG S.P., LI Z.J., SUN X.L., WANG G.L., FANG Y.J., LIU J.K., An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe-CdS core-shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene-gold nanocomposite and gold nanoparticle, **Electrochim. Acta**, v.56, p.9162, 2011.

[27] CINCOTTO, F. H.,* MORAES, F. C., AND MACHADO, S., A., S.; Graphene Nanosheets and Quantum Dots: A Smart Material for Electrochemical Applications; **Chemistry a European journal**, v. 20, n. 16, 2014.

[28] HUANG, T.; XU, X. N.; Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy, **J. Mater. Chem.**, v.20, p. 9867, 2010

[29] XU, P.; JEON, S, MACK, N. H.; Chiang, L. Y.; BROWN, L.; WANG, H. L., Facile synthesis and electrical properties of silver wires through chemical reduction by polyaniline; **Journal of Physics Chemistry C**, v.114, p. 36, 2010.

[30] WANG, D. H.; KIM, D. Y.; CHOI, K. W.; SEO, J. H.; IM, S. H.; PARK, J. H.; PARK, O. O.; HEEGER, A. J.; Enhancement of donor - Acceptor polymer bulk heterojunction solar cell power conversion efficiencies by addition of Au nanoparticles, **Angew. Chem. Int**, v. 50, p. 5519, 2011.

[31] WANG, C. C.; LUCONI, M. O.; MASI, A. N.; FERNÁNDEZ, L. P.; Derivatized silver nanoparticles as sensor for ultra-trace nitrate determination based on light scattering phenomenon, **Talanta**, v. 77, p. 1238, 2009.

[32] HRISTOZOV, D.; MALSCH, I., Hazards and Risks of Engineered Nanoparticles for the Environment and Human Health,. **Sustainability**, v.1, n. 4, p.1161-94, 2009.

[33] TRIBIDASARI A. I., RIKI S., YOSHIHIRO M., AKIRA F., YASUAKI E., Electrochemical Detection of Arsenic(III) Using Iridium-Implanted Boron-Doped Diamond Electrodes, **Analytical. Chemistry**, v. 78, p. 6291–6298, 2006.

[34] SIMM A. O., BANKS C. E., COMPTON R. G., The electrochemical detection of arsenic(III) at a silver electrode, **Electroanalysis**, , v. 17, p. 1727–1733, 2005.

[35] REN X., MENG X., CHEN D., TANG F., JIAO J., Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor, **Bioelectronics**, v. 9, p. 433–437, 2005.

[36] KLASSEN H. J., Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses, **Burns**, v. 26, p. 117-130, 2000.

[37] KOSMALA A., WRIGHT R., ZHANG Q., KIRBY P., Synthesis of silver nanoparticles and fabrication of aqueous Ag inks for inkjet printing, **Material. Chemistry. Physics**, v. 129, p. 1075; 2011.

[38] TIAN C. , MAO B. , WANG E. , KANG Z. , SONG Y. WANG, C. , LI S. , XU L. , One-step, size-controllable synthesis of stable Ag nanoparticles, **Nanotechnology**, v. 18 , p. 285-607, 2007.

[39] RELE M., KAPOOR S., SHARMA G., MUKHERJEE. E, Reduction and aggregation of silver and thallium ions in viscous media, **Physical. Chemistry.**, v. 6, p. 590, 2004.

[40] RICHARDSON S.D., Water analysis: Emerging contaminants and current issues **Analytical. Chemistry**, v. 81, p. 4645, 2009.

[41] MELO, S. A. S., TROVÓ, A. G., BAUTIZ, I. R., NOGUEIRA, R. F. P., Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

[42] PETERSEN K. E., Short-term treatment of acute urinary tract infection in girls, **Scand. J. Infect. Dis.**, V. 23, p. 213, 1991.

[43] HENNEY C.R., DOW R.J., MACCONNACHIE A.M., CROOKS J., **a Handbook of Drugs**, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.

[44] RYEDER M.J., KING S.M., READ S., Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole among children with human immunodeficiency virus infection **Pediatr Infect Dis.**, v.16, p.1028–1031, 1997.

[45] BEAM T.R., SMITH C.M., REYNARD A.M. (EDS.), Textbook of Pharmacology, Saunders, Philadelphia, 1992.

[46] MANDELL G.L., SANDE M.A., GILMAN A.G., RALL T.W., NIES A.S., TAYLOR P., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 1990, Chap. 45.

[47] TAYLOR R.B., RICHARDS R.M.E., XING J.Z., Simultaneous determination of some antibacterial drugs in isosensitest broth using high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction, **Analyst** , v. 117, p. 1425–1427, 1992.

[49] BERZAS J. J., NEVADO, CASTANEDA G., PENALVO, GUZMAN B. F. J., Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis, **Journal. Chromatography. A**, v. 918, p. 205–210, 2001.

[49] BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A.; Resistance responses of microorganisms in food environments, **Int. J. Food Microbiol**, v. 50, p. 33, 1999.

[50] GARDABASSI, L.; WONG, D. M. A. L.; DALSGAARD, A.; Delayed incubation as an alternative method to sample storage for enumeration of E. coli and culturable bacteria in water, **Water Res.**, v. 36, p. 4655-4658, 2002.

[51] MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G.; Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater , **Sci. Total Environ**, v. 224, p. 167, 1998.

[52] INGERSLEV, F.; TORÄNG, L.; LOKE, M. L.; HALLING-SØRENSEN, B.; NYHOLM, N.; Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems, **Chemosphere**, v. 44, p. 865, 2001.

[53] MONTANARO, A. Sulphonamide allergy, **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.18, p.843-850, 1998.

[54] European Community. Establishment of maximum residue levels of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation n. 2377/90. Official Journal of European Community, L224/1, 1990.

[55] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo.**

[56] CESARINO I., GALESCO H. V., MORAES F. C., LANZA M. R. V., MACHADO S. A. S., Biosensor Based on Electrocodeposition of Carbon Nanotubes/ Polypyrrole/Laccase for Neurotransmitter Detection, **Electroanalysis**, v. 25, n. 2, p.394–400, 2013.

[57] BERGMANN B.A., CHENG J., CLASSEN J., A. Stomp, In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation, **Biores. Technol.**, v. 73, p. 13, 2000.

[58] VIKKISK M., KRUUSENBERG I., JOOST U., SHULGA E., KINK I., TAMMEVESKI K., Electrocatalytic oxygen reduction on nitrogen-doped graphene in alkaline media **Appl. Catal. B** 2014, v.147, p.369.

[59] CESARINO I., CESARINO V., GALESCO H. V., MORAES F. C., FERREIRA T. C. R., LANZA M. R. V., Lucia H. MASCARO L. H., MACHADO S. A. S., Electrochemical degradation of benzene in natural water using silver nanoparticle-decorated carbon nanotubes, **Materials Chemistry and Physics**, v.141, p. 304-309, 2013.

[60] ZHAO W., WANG H., QIN X., WANG X., ZHAO Z., MIAO Z., CHEN L., SHAN M., FANG Y., CHEN Q., A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on multi-wall carbon nanotube/silver nanoparticle nanohybrids modified gold electrode, **Talanta**, v. 80, p. 1029, 2009.

[61]. CESARINO I., CESARINO V., LANZA M. R. V., Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim, **Sensors and Actuators B**, v. 188, p. 1293–1299, 2013.

[62] Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst*, v.112 p.199, 1987.

[63] ALMEIDA S.A.A., ARASA E., PUYOL M., C.S. MARTINEZ-CISNEROS, ALONSO-CHAMARRO J., MONTENEGRO M.C.B.S.M., SALES M.G.F., Novel

LTCC-potentiometric microfluidic device for biparametric analysis of organic compounds carrying plastic antibodies as ionophores: Application to sulfamethoxazole and trimethoprim, **Biosens. Bioelectron.**, v. 30 p. 197, 2011.

[64] OZKORUCUKLU S.P., OZCAN L., SAHIN Y., ALSANCAK G., Electroanalytical determination of some sulfonamides on overoxidized polypyrrole electrodes **Aust. J. Chem.**, v. 64, 2011.

[65] SOUZA C.D., BRAGA O.C., VIEIRA I.C., SPINELLI A., Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode, **Sens. Actuators B**, v. 135, p. 66, 2008.

[66] ANDRADE L.S., ROCHA-FILHO R.C., CASS Q.B., FATIBELLO-FILHO O., Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode, **Electroanalysis**, v. 21, p. 1475, 2009.