



RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR RESIDUAL
DETERMINATION OF TRICAINE (MS-222) AND
BENZOCAINE IN FISH**

**LAVRAS – MG
2021**

RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ELECTROCHEMICAL
SENSORS FOR RESIDUAL DETERMINATION OF TRICAINE (MS-222) AND
BENZOCAINE IN FISH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Coorientador

Dra. Fabiana da Silva Felix
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lima, Rafael Machado Felix de.

Development and characterization of electrochemical sensors
for residual determination of tricaine (MS-222) and benzocaine in
fish / Rafael Machado Felix de Lima. - 2018.

143 p.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Anestésicos. 2. Tilápia-do-Nilo. 3. Polímeros condutores. I.
Saczk, Adelir Aparecida. II. Título.

RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ELECTROCHEMICAL
SENSORS FOR RESIDUAL DETERMINATION OF TRICAINE (MS-222) AND
BENZOCAINE IN FISH**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SENSOR ELETROQUÍMICO
PARA A DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE TRICAÍNA (MS-222) E BENZOCAÍNA
EM PEIXES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de março de 2018.

Dra. Ângela Dayana Barrera de Brito UFLA

Dr. Alexandre Luiz Bonizio Baccaro USP

Dr. Lucas Franco Ferreira UFVJM

Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Coorientador

Dra. Fabiana da Silva Felix
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

*A Deus e Nossa Senhora Aparecida, pela oportunidade de percorrer este caminho.
À professora Adelir, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade, pelos conselhos,
pelo incentivo.
Aos meus pais, Geraldo e Josiane, pelo amor e carinho incondicionais.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo que tenho e o que sou. Pela minha jornada, por me fazer forte, e ser fiel em todos os momentos. À Nossa Senhora Aparecida pelo colo e amor.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química (DQI) e ao Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), por ter me acolhido e contribuído em meu crescimento profissional.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O presente trabalho foi realizado com seu apoio, código de financiamento 001. Aos demais órgãos de fomento, CNPQ e FAPEMIG, por contribuírem para a realização desta pesquisa.

À minha orientadora, Adelir, pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade, durante estes mais cinco anos de trabalho em conjunto. Por me apresentar a eletroquímica, trazendo-me à tona o encantamento a esta área de pesquisa, ensinando e incentivando. Agradeço pelo carinho e pelos conselhos, por não me deixar desanimar, e me mostrar sempre além do que via, e, principalmente, por acreditar em mim. Por trazer em si uma amizade incrível, que me fez crescer. Por me motivar sempre a ir além, e me tornar um excelente professor. Muito Obrigado!

Ao meu coorientador, Juliano, pelas ideias de projeto, pelos materiais, pelo auxílio na execução de experimentos em outros laboratórios, por apresentar-me a polianilina. Por todas as análises realizadas exterior à UFLA através de seu intermédio. Agradeço, principalmente, por todos os incentivos e pela confiança em meu potencial como pesquisador.

À minha coorientadora, Fabiana, que contribuiu imensamente nas análises de BIA, nos ensinamentos de eletroquímica e eletroanalítica. Agradeço por sua amizade, pelas palavras de apoio e pelo seu jeito alegre que nos mantém motivados.

Aos membros da banca de qualificação, professores Polyana, Juliano e Cleber, que fizeram sugestões de grande valia, contribuindo efetivamente para esta pesquisa.

Aos meus pais, pela oportunidade de ser filho, por me tornarem quem eu sou, pelo constante apoio, pelos ensinamentos transmitidos, pelo amor e pela amizade incondicionais, por me amarem, e estarem em meu tempo. Agradeço em especial, por estarem sempre presentes durante toda minha vida. Hoje sou “gente”, fruto de um amor inesgotável, carinho e ensinamentos que posso semear por onde for.

Ao meu irmão, Diego, por ser conselheiro e leal em todas suas atitudes, e um grande amigo durante toda minha vida.

Aos meus avós Luzia, Maria de Lourdes, João Felix e Eurico Benedito, por serem tão especiais. O amor nunca se esgota.

Aos meus sobrinhos, Laura e Lucas, pelo sorriso mais lindo que existe! Amor sincero e carinho que traz conforto e paz.

À minha cunhada, Letícia, pela amizade.

Aos amigos, que sempre estiveram presentes durante a minha jornada, por sempre serem tão importantes em minha vida, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

Em especial, à Cybele Martins e à Adriana Renata Elieser, pelo apoio e pela compreensão, quando se fez necessário. Pelos conselhos e pelas palavras de calma nas horas em que mais precisei.

À professora Zuy, pelo carinho e pela amizade, pelos ensinamentos e incentivo. Por acreditar no meu trabalho.

À professora Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos em química e química orgânica, e por todas as análises realizadas no Laboratório de Análises Físico-químicas de Aguardente de Cana, em especial, as destilações de anilina.

Aos familiares, pela força e pelo amor.

Aos (As) professores (as) Dra. Ângela, Dr. Alexandre, Dr. Lucas e Dra. Maria das Graças, pela disponibilidade e prontidão em aceitar meu convite para a avaliação do trabalho, por todas as contribuições para a execução.

Aos demais professores do Departamento de Química com quem convivi durante esses anos, por serem exemplos de profissionais competentes.

Aos amigos do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE) Thales, Maísa, Mateus Fornazari, Camila, Josi, entre outros colegas que passaram pelo LAE, por terem contribuído com apoio e amizade para a realização do presente trabalho.

Agradeço em especial aos amigos doutorandos do LAE: Meryene, Bianca e Daiane e ao amigo Matheus Julien por toda palavra de motivação, por todo carinho, risadas, momentos especiais e descontração.

Agradeço, em especial, a Michele, que desenvolveu iniciação científica no LAE, pela amizade, por todo trabalho em equipe, pelos bons momentos de risadas, telefonemas, mensagens, e apoio, tornando os dias ruins mais fáceis de lidar, e os problemas durante o trabalho, mais engraçados. Com toda a certeza, sua Iniciação Científica agregou muitos valores neste trabalho, porém, agregou mais ainda na minha formação profissional. Agradeço imensamente pela amizade.

Aos amigos (as) do Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos.

Aos amigos (as) do Laboratório de Catálise e Biocombustíveis.

Aos amigos (as) do Laboratório de Análises Físico-químicas de Aguardente de Cana.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica e à Roseni e à Jussara, pela ajuda e disponibilidade, na secretaria do PPAG.

À Cleusa, que realizou com perfeição, no Laboratório de Análises Físico-químicas de Aguardente de Cana, a destilação da anilina.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e facilitaram a minha caminhada, meus sinceros agradecimentos.

Todos nós somos feitos por outras milhares de pessoas. Cada ser que fez algo de bom para nós, ou nos disse algumas palavras de conforto ou aprovação, influenciou em nossa personalidade e nossos atos. É por isso que elas se transformam em parte de qualquer sucesso nosso.

(George Matthew Adams)

RESUMO GERAL

Durante o processo de manejo aquícola são utilizados anestésicos com o intuito de insensibilizar o peixe e facilitar as atividades de produção. Isso faz com que haja uma melhora na qualidade da carne do pescado, pois diminuindo o estresse ao animal, o produto possui melhor textura de carne, além de reduzir o índice de mortalidade durante a produção. Entretanto, a utilização incorreta destes compostos químicos podem deixar traços residuais na carne dos pescados, gerando preocupação quanto à segurança alimentar do consumidor. Neste sentido, objetivou-se neste trabalho desenvolver metodologias eletroquímicas/eletroanalíticas eficientes para a aplicação na determinação de anestésicos residuais em filés de peixes. No primeiro artigo, foi realizado o estudo da eletrossíntese de um eletrodo à base de um polímero orgânico condutor associado a nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (GCE/PANI-MWNT's) por meio da técnica de voltametria cíclica, em que os parâmetros foram otimizados utilizando a técnica estatística de planejamento fatorial fracionado. Neste trabalho foi possível correlacionar ensaios eletroquímicos com dois níveis e seis fatores (2^{6-1}) e otimizar o preparo do eletrodo, caracterizando por FTIR e deslocamento Raman. No segundo artigo, realizou-se a aplicação do eletrodo (GCE/PANI-MWTC's) na determinação residual de triclaína em peixes por meio da técnica voltamétrica DPV. Para a caracterização do eletrodo foi utilizada a técnica EIS, demonstrando a relação do ciclo de varredura de potencial e a formação da cadeia polimérica. O método analítico desenvolvido apresentou limites de detecção de $2,08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e o de quantificação de $4,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação de 0,9905. O método de extração apresentou eficiência na determinação da triclaína do filé de peixe com recuperação de $90\% \pm 4\%$. Além disso, foram realizadas propostas de interações de mecanismos entre a polianilina (PANI), nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (MWTC's) e o anestésico triclaína. No terceiro artigo, determinou-se benzocaína e triclaína residual em filé de peixe utilizando eletrodo de carbono impresso empregando a metodologia BIA. Foi possível obter mais de 300 injeções por hora com baixos limites de detecção de $3,02 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para benzocaína e $3,19 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para triclaína, utilizando apenas 80 mL de amostra para cada análise, com alta repetibilidade e boa taxa de recuperação de ambos os anestésicos $> 99\%$.

Palavras-chave: Anestésicos. Análise residual. Tilápia-do-Nilo. Planejamento fatorial fracionado. Polímeros condutores.

GENERAL ABSTRACT

During the aquaculture management process, anesthetics are used in order to stagnate fish and facilitate production activities. This makes there a fish meat quality improvement, because reducing the stress to the animal; the final product has better meat texture, besides reducing the mortality rate during production. However, the misuse of these chemicals can leave residual traces in fish meat, generating concern about the consumer's food safety. In this sense, the objective in this work was to develop efficient electrochemical/electroanalytical methodologies for the application in the determination of residual anesthetics in fish fillets. In the first article, the study of electrosynthesis of an electrode based on a conductive organic polymer associated with carboxylic acid functionalized carbon nanotube (GCE/PANI-MWNT's) was carried out using the cyclic voltammetry technique, wherein the parameters were optimized using statistical technique of fractional factorial planning. In this work, it was possible to correlate electrochemical tests with two levels and six factors (2^{6-1}) and optimize the electrode preparation, characterized by FTIR and Raman analyze. In the second article, the electrode (GCE/PANI-MWTC's) was applied in the residual determination of tricaine in fish using the voltammetric DPV technique. For the electrode characterization, the EIS technique was used, demonstrating the relation of the potential scanning cycle and the polymer chain formation. The analytical method developed showed detection limits $2.08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and the quantification $4.00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ with correlation coefficient 0.9905. The extraction method presented efficiency in the tricaine determination of fish filet with recovery $90\% \pm 4\%$. In addition, proposals were made of mechanisms interaction between polyaniline (PANI), carboxylic acid functionalized carbon nanotube (MWTC's) and tricaine anesthetic. In the third article, benzocaine and residual tricaine were determined in fish fillets using a printed carbon electrode using BIA methodology. It was possible to obtain more than 300 injections per hour with low detection limits $3.02 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for benzocaine and $3.19 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for tricaine, using only 80 mL of sample for each analysis, with high repeatability and good recovery rate of both anesthetics $> 99\%$.

Keywords: Anesthetics. Residual analysis. Nile tilapia. Fractional factorial design. Conductive polymers.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Peixe tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	22
Figura 2 - Estrutura química dos anestésicos mais utilizados na piscicultura.	23
Figura 3 - Estruturas químicas dos anestésicos de uso na aquicultura contendo (A) função éster e (B) função amida, R1 e/ou R2 são grupos amina.	24
Figura 4 - Estruturas químicas dos anestésicos (A) benzocaína, (B) ácido p-aminobenzoico e (C) triclaína.	25
Figura 5 - Estrutura química dos polímeros orgânicos condutores (A) poliacetileno; (B) polianilina; (C) polipirrol e (D) politiofeno.	29
Figura 6 - Representação do transporte de carga na PANI durante o processo de formação do pólaron.	30
Figura 7 - Estrutura química (geral) da PANI.	30
Figura 8 - Estrutura química dos diferentes estados de oxidação da PANI.	31

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 - (I) Perfil de distribuição da maior intensidade de corrente de pico (I_p) com baixo deslocamento de potencial (E_p) vs. menor largura de pico ($W_{1/2}$) em função de cada experimento estipulado na Tabela 1, com valores autoescalados; (II) i_p em função de E_p autoescalado; (III) E_p em função de $w_{1/2}$ autoescalado; (IV) I_p em função de $W_{1/2}$ autoescalado.	51
Figura 2 - Perfil de distribuição da maior intensidade de corrente de pico (i_p) com baixo deslocamento de potencial (e_p) vs. menor largura de pico ($w_{1/2}$) em função de cada experimento estipulado na Tabela 1, com valores autoescalados (A) Experimento 25 e (B) Experimento 31.	53
Figura 3 - Voltamogramas cíclicos da eletrossíntese de PANI-MWTC's sobre GCE, condições: anilina e HCl 0,5 mol L ⁻¹ , e MWTC's 0,02 mg, $\Delta E = -0,2$ V a 1,0 V vs KCl _{sat} , $\nu = 5$ mV s ⁻¹ (A) do 50º ciclo da eletrossíntese de PANI e PANI-MWTC's; (B) 50 ciclos de GCE/PANI; (C) 50 ciclos de GCE/PANI-MWTC's e (D) até 5 ciclos de GCE/PANI-MWTC's.	56

ARTIGO 2

Figura 1 - Diagramas de Nyquist (○) e Bode (□) para os espectros de EIS obtidos a partir dos eletrodos de carbono vítreo (GCE) e eletrodo modificado GCE/PANI-MWTC's. Nyquist: A1 (GCE); B1 (1º ciclo); C1 (2º ciclo); D1 (3º ciclo); E1 (4º ciclo) e F1 (5º ciclo). Bode: A2 (GCE); B2 (1º ciclo); C2 (2º ciclo); D2 (3º ciclo); E2 (4º ciclo) e F2 (5º ciclo). Espectros obtidos em solução eletrólito KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo Fe(CN) ₆ ³⁻ /Fe(CN) ₆ ⁴⁻ 5 mmol L ⁻¹ . Amplitude RMS = 10 mV; Intervalo de Frequência: 10 ⁶ a 10 ⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste do circuito aos dados experimentais e os pontos são os dados experimentais. (Continua).....	72
Figura 2 - Modelos de circuitos equivalentes propostos para o ajuste aos dados experimentais.	75

- Figura 3 - (A) Perfil voltamétrico utilizando a técnica voltametria cíclica da eletrossíntese da modificação do eletrodo GCE com PANI-MWTC's, em HCl 0,5 mol L⁻¹, MWTC's = 0,02 mg L⁻¹ e anilina 0,5 mol L⁻¹. Parâmetros eletroquímicos: 2 ciclos sucessivos de varredura, na janela de potencial de -0,2V à +1,0V, $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Perfil eletroquímico de uma solução de K₄Fe(CN)₆ 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em solução eletrólito KCl 0,10 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$, $w = -0,5$ a +1,2 V utilizando eletrodo (---) GCE (—) GCE/PANI-MWTC's. (C) Perfil eletroquímico de uma solução de K₄Fe(CN)₆ 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹ durante 10 varreduras sucessivas utilizando a modalidade CV, nas condições $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $w = -0,5$ a +1,2 V, com eletrodo modificado GCE/PANI- MWTC's..... 78
- Figura 4 - (A) Espectros Raman ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) de PANI-MWTC's; (B) Espectros na região do infravermelho entre 4000-500 cm⁻¹ do (I) PANI, (II) MWTC's e (III) PANI-MWTC's. 80
- Figura 5 - (A) Variação da intensidade de corrente de pico em função da velocidade de varredura; (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função da intensidade de corrente de pico; (C) Intensidade de corrente de pico sobre a raiz quadrada da velocidade de varredura em função da velocidade de varredura e, (D) Função logarítmica da velocidade de varredura em função da velocidade logarítmica da intensidade de corrente de pico. 82
- Figura 6 - (A) Voltamogramas cíclicos de solução de tricaína (0,127 mmol L⁻¹) em solução eletrólito tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (---), pH = 7,2: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (A) GCE, tricaína (—) solução eletrólito fosfato (--) e (B) GCE/PANI- MWTC's tricaína (—) solução eletrólito fosfato (---). 83
- Figura 7 - Proposta de mecanismo de interação entre PANI-MWTC's-Tricaína. 84
- Figura 8 - (A) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e (—) adições sucessivas de solução de tricaína. (B) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo extrato de filé de peixe obtido durante o procedimento de extração; (—) adições sucessivas de solução de tricaína. Análises realizadas utilizando a técnica DPV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 20 \text{ ms}$. Em detalhes: regressão linear da curva analítica. (Continua) 86
- Figura 8 - (A) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e (—) adições sucessivas de solução de tricaína. (B) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo extrato de filé de peixe obtido durante o procedimento de extração; (—) adições sucessivas de solução de tricaína. Análises realizadas utilizando a técnica DPV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 20 \text{ ms}$. Em detalhes: regressão linear da curva analítica. (Conclusão)..... 87

ARTIGO 3

- Figure 1 - Cyclic voltammograms in phosphate buffer solution 0.1 molL⁻¹, pH 7.0 (dashed line) and with 1.00 x 10⁻³ mol L⁻¹ (A) benzocaine (solid line) (B) tricaine (solid line). Scan rate: 100 mVs⁻¹..... 101
- Figure 2 - Results for BIA with amperometric detection using a carbon printed electrode, in a phosphate buffer médium 0.1 molL⁻¹, pH 7.0, after injections of (a) 1.0 x 10⁻⁷, (b) 2.0, (c) 4.0, (d) 6.0, (e) 8.0, (f) 1.0 x 10⁻⁶, (g) 2.0, (h) 4.0, (i) 6.0 e (j) 8.0 x 10⁻⁶ molL⁻¹ (A) benzocaine (B) tricaine. Working electrode potential at 0.90 V and 0.75 V vs. Ag/AgCl_{KCl}sat for benzocaine and tricaine, respectively. Injected volume: 80 mL. Speed of injection: 271 mLs-1. Inset: linear regressions for each analyte. . 103
- Figure 3 - BIA with amperometric detection results for 25 repetitive injections of (A) benzocaine and (B) tricaine 4.0 x 10⁻⁷ molL⁻¹, in a phosphate buffer medium 0.1

molL⁻¹ (pH 7.0). Applied potencial: 0.90 V and 0.75 V vs. Ag/AgClKClsat, for benzocaine and tricaine, respectively. Injected volume: 80 mL. Injection speed: 271 mLs⁻¹. 104

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Proporções de HCL, anilina, MWTC's e parâmetros eletroquímicos da técnica voltametria cíclica referente ao nível determinado pelos ensaios estatísticos (fatorial fracionário 2^{6-1}) realizados no processo de otimização dos experimentos. 47
- Tabela 2 - Principais efeitos de interação e matriz de planejamento utilizando fatorial fracionário..... 49

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Parâmetros obtidos via simulação e ajuste aos dados experimentais para os GCE e GC/PANI-MWTC's e seus ciclos correspondentes..... 76

LISTA DE SIGLAS

I_{pa}	Intensidade de corrente de pico anódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
v	Velocidade de varredura
A_p	Amplitude de pulso
t_p	Tempo de pulso
E_{step}	Incremento de varredura
$W_{1/2}$	Largura de pico à meia altura
f	Frequência
E_d	Potencial de depósito
T_d	Tempo de depósito
$Ag \setminus AgCl_{(sat)}$	Eletrodo de prata cloreto de prata
CV	Coefficiente de variação
LOQ	Limite de quantificação
LOD	Limite de detecção
pH	Potencial hidrogeniônico
CV	Voltametria cíclica
LSV	Voltametria de varredura linear
DPV	Voltametria de pulso diferencial
SWV	Voltametria de onda quadrada
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
PANI	Polianilina
MWTC's	Nanotubo de carbono de múltiplas paredes

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	17
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	Segurança alimentar e Piscicultura.....	21
3.2	Anestésicos em peixes	24
3.3	Análise residual de anestésicos utilizando métodos analíticos.....	26
3.4	Análise residual de anestésicos utilizando análise por injeção em batelada (BIA)	27
3.5	Polímeros Condutores – Polianilina.....	28
3.6	Nanotubo de carbono de múltiplas paredes como modificadores em sensores eletroquímicos	32
3.7	Uso da estatística no desenvolvimento de sensores eletroquímicos	33
	REFERÊNCIAS.....	35
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	42
	ARTIGO 1 - Utilização do planejamento fatorial no estudo do comportamento eletroquímico de GCE/PANI-MWTC's como um possível material supercapacitor frente sua excelente estabilidade cíclica	42
	ARTIGO 2 - Detecção residual de tricaina em filé de tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) por voltametria de pulso diferencial utilizando eletrodo GCE/PANI-MWTC's	62
	ARTIGO 3 - Determination of benzocaine and tricaine in fish fillets using bia with amperometric detection.....	95
	TERCEIRA PARTE.....	108
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
	PERSPECTIVAS FUTURAS	109
	ANEXOS.....	110

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura consiste em uma modalidade da aquicultura para a criação de peixes em meios aquáticos artificiais, sendo responsável pelo subsídio de 10% a 12% de toda população mundial, cerca de 700 a 800 milhões de pessoas, sendo assim, importante aliada no crescimento da economia (BRASIL, 2014). O peixe é o principal aliado na alimentação humana, correspondendo a cerca de 20% da ingestão total mundial de proteína animal. Isso se deve ao fato deste alimento conter baixo teor de gorduras saturadas, carboidratos e colesterol proteico de alta qualidade, além de micronutrientes essenciais, e, vitaminas, minerais, e ácidos graxos poli-insaturados. Dentre as espécies produzidas e consideradas com maior taxa de consumo é possível destacar a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), com alta produção na China, Egito, Filipinas, Brasil, México e Estados Unidos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO, 2014). No Brasil, a produção de tilápia ocorre em todo o território nacional, destacando-se como a espécie mais produzida, fazendo com que o país alcance a 19ª posição mundial em sua produção (BRASIL, 2014; FAO, 2014).

Durante a cadeia produtiva do pescado são utilizados anestésicos com o propósito de insensibilizar os animais e facilitar o manejo aquícola, porém, o uso desses compostos podem deixar traços residuais na carne do pescado, diminuindo a qualidade do alimento, acarretando riscos ao consumidor. Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são a triclaína, a benzocaína e o óleo de cravo, e, ainda, há alguns relatos da utilização de isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato. No cenário internacional a triclaína é o único anestésico aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para a aplicação no manejo aquícola (KIESSLING *et al.*, 2009; OLIVEIRA; CARMO; OLIVEIRA, 2009). A triclaína (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222) é um éster derivado do ácido p-aminobenzoico, cuja síntese deriva da benzocaína, através da adição do grupamento metanosulfonato, tornando este composto solúvel em água, diferente da benzocaína (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE - CCAC, 2005; U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2011; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

A análise residual de compostos anestésicos em peixes é uma ferramenta importante para a definição de protocolos, desde os parâmetros de aplicação dos anestésicos até o abate e o processamento do pescado. Tais critérios garantem a qualidade do produto, definindo margens seguras para o consumo humano e aumentando a qualidade do pescado para a exportação.

Usualmente, as análises residuais são realizadas utilizando as técnicas cromatográficas e diversos procedimentos de preparo da amostra como extração, pré-concentração e purificação. As técnicas voltamétricas, também representam um meio eficiente para a análise residual de anestésicos em peixes, uma vez que realizam estas análises com a mesma exatidão e precisão que as técnicas convencionais, contudo exige um menor tratamento da amostra.

O desenvolvimento de materiais para a modificação de eletrodos melhora o sinal eletroquímico, aumentando a sensibilidade ao composto de interesse. A polianilina e os derivados da anilina (leucoesmeraldina, sal e base esmeraldina e permigranilina), são exemplos de polímeros condutores orgânicos. Em condições ambientais, possuem estabilidade química na forma condutora, facilidade de polimerização e dopagem, com baixo custo do monômero. Associado a estes polímeros é possível utilizar outros materiais, a fim de aumentar sua atividade de condução elétrica, resultando em uma maior sensibilidade. Os nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWTC's) possuem propriedades térmicas, calor específico, condutividade térmica e termoelétrica que podem ser associadas aos polímeros condutores, fazendo com que estes materiais sejam substancialmente explorados para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletro-mecânicos (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004; RAO *et al.*, 1997).

Para o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados, foram estudados diversos parâmetros a fim de obter a melhor relação entre a intensidade de corrente de pico e a largura de pico. Para isso, foram utilizadas as técnicas estatísticas univariadas gerando grande número de dados, e muitas vezes não sendo possível identificar suas interações. Sendo assim, o método de planejamento fatorial completo ou fracionado são os *designs* de primeira ordem, cujos modelos são empregados quando a análise envolve grande número de fatores, possibilitando a obtenção da livre interação dos dados, bem como a capacidade de compará-los, identificando semelhanças, diferenças e tendências.

Assim, em um primeiro momento, a associação de técnicas estatísticas mais elaboradas podem auxiliar na otimização quanto à modificação de eletrodos com polímeros orgânicos condutores associados aos nanotubos de carbono de múltiplas paredes para melhoria do sinal analítico, o qual pode ser caracterizado por técnicas espectroscópicas (Raman e FTIR) e eletroquímicas (voltametria cíclica e EIS), por exemplo. Subsequente, estes eletrodos são aplicáveis na determinação residual de anestésicos em peixes, podendo realizar o estudo das interações orgânicas para melhor compreensão do mecanismo envolvido. Ainda envolvendo anestésicos foi possível associar tanto a determinação de tricaína quanto benzocaína com a análise por injeção em batelada (BIA) permitindo aumentar consideravelmente o número de experimentos realizados por minuto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver sensores eletroquímicos à base de carbono vítreo (CGE) e/ou eletrodos impressos modificados com nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizado com ácido carboxílico (MWTC's) e polianilina (PANI) e caracterizá-los para a determinação residual de anestésicos tricaína, MS-222 e benzocaína em peixes.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um eletrodo base de carbono vítreo modificado com polianilina e nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (GCE/PANI-MWTC's) empregando a técnica de planejamento fatorial fracionado para a determinação de tricaína em filés de peixe.
- b) Otimizar as condições para obtenção dos parâmetros da eletrossíntese do eletrodo de GCE/PANI-WMTC's empregando o planejamento fatorial fracionado como ferramenta estatística.
- c) Estudar o comportamento eletroquímico do anestésico tricaína frente ao eletrodo GCE/PANI-WMTC's, analisando os potenciais nos quais esta substância mostra sensibilidade utilizando as técnicas de voltametria cíclica e pulso diferencial.
- d) Caracterizar o modificador PANI-WMTC's por técnicas espectroscópicas de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Deslocamento Raman.
- e) Caracterizar o eletrodo GCE/PANI-WMTC's por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), verificando a quantidade de ciclos necessários para a formação da cadeia polimérica da PANI.
- f) Validar as figuras de mérito como limites de detecção e quantificação, precisão, faixa dinâmica linear, sensibilidade e exatidão.
- g) Avaliar os aspectos termodinâmicos, correlacionando a velocidade de varredura (v) e a corrente (I_p).
- h) Desenvolver um método utilizando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica para detecção de benzocaína e tricaína residual em peixe.

- i) Avaliar o comportamento dos anestésicos tricaína e benzocaína frente ao eletrodo de carbono impresso, utilizando o método BIA com detecção amperométrica, observando em quais potenciais nos quais essa substância mostra sensibilidade.
- j) Otimizar as condições de BIA: potencial de trabalho, velocidade de injeção e volume de injeção.
- k) Validar as figuras de mérito da metodologia BIA como limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), precisão, faixa dinâmica linear, sensibilidade e exatidão.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Segurança alimentar e Piscicultura

No Brasil, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscaliza, investiga e realiza auditorias para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos (BRASIL, 2009). O produto, ao chegar à mesa do consumidor, deve estar isento de qualquer contaminação, ou seja, não deve haver presença de resíduos químicos utilizados durante o processo de produção. Tais procedimentos fazem com que o produto comercial adquirido possua qualidade certificada (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). Em relação aos produtos oriundos da pesca. A Lei nº 11.958. de 26/06/2009 criou o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), atribuindo total autonomia e responsabilidade sobre o setor aquícola, por meio do carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) para monitorar a qualidade do pescado brasileiro (BRASIL, 2009, 2012).

O responsável pela segurança alimentar em todo mundo é a Organização Mundial da Saúde (OMS ou World Health Organization, WHO), a qual utiliza de processos e mecanismos sistemáticos para certificar que durante todo processo de produção de qualquer alimento, seja garantida a inocuidade, ou seja, o produto esteja isento de qualquer contaminante (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2013). Entre os pesquisadores, este tema tem se tornado recorrente, aumentando o desenvolvimento de pesquisas voltadas diretamente à segurança alimentar, uma vez que a saúde pública está diretamente ligada a esta linha de pesquisa (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO, 2013).

O Brasil produz cerca de 1,25 milhões de toneladas de peixe, o que gera um PIB de R\$5 bilhões, colocando o país na 17ª posição mundial de produção de pescado, com destaque aos estados de Santa Catarina, Pará e Maranhão. Entre as espécies de destaque na produção, a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) possui maior taxa de consumo, e por consequência maior atividade produtiva. A produção deste peixe iniciou-se em 1971, ganhando destaque no ano de 2011, com 9.681,6 toneladas de produção (BRASIL, 2014). Este peixe foi introduzido no país em 1952, com a espécie *T. rendalli*. De água doce, pertence à família Cichlidae, originária de rios que banham a África, a Jordânia e a Palestina, a tilápia-do-nilo pode se reproduzir e adaptar-se em águas salgadas. Os peixes desta espécie são de coloração cinza azulada, com corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas e listras verticais na nadadeira caudal, com a reprodução favorecida na faixa de temperatura entre 21 a 35 °C (BOSCOLO; HAYASHI; SOARES, 2001).

Figura 1 - Peixe tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Botrel (2017)

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations) (FAO, 2013), o consumo de peixes em todo o mundo aumentou consideravelmente. Em 2010, contabilizaram uma média de 17 quilos por pessoa/ano, com uma estimativa de que em 2050 a produção de pescado mundial terá que chegar a 80 milhões de toneladas para atender à população. Para intensificar a produção e melhorar a qualidade do peixe para a exportação, é imprescindível o conhecimento das cadeias produtivas, uma vez que está relacionada diretamente com as medidas de ordenação e manejo (BRASIL, 2014; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008).

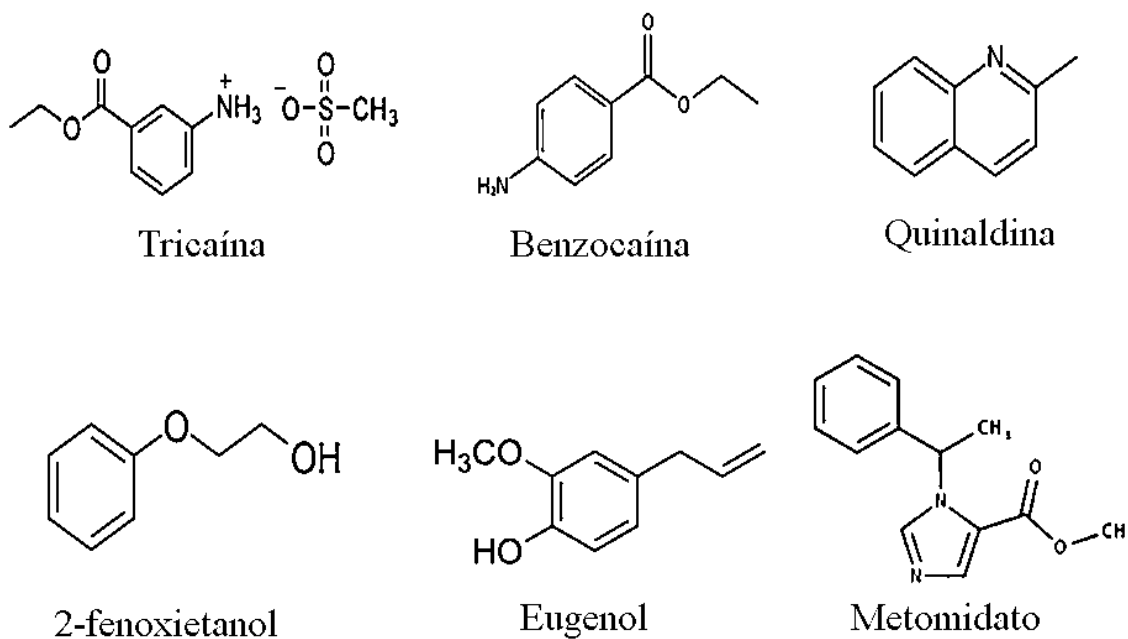
Na cadeia produtiva do pescado é possível destacar a aquicultura e a pesca extrativa. A aquicultura se caracteriza como o cultivo de animais aquáticos em ambientes monitorados e similares ao seu habitat natural e a pesca extrativa é caracterizada como a captura desses animais em seu habitat (BRASIL, 2009, 2014). Assim, a aquicultura é uma atividade marcada por intenso manuseio dos animais. É evidente que operações de transporte, marcação e coleta de sangue possam acarretar contaminação desses animais por agentes químicos, como antibióticos, vacinas e anestésicos. Dentre os agentes químicos, os anestésicos são os mais utilizados na piscicultura. São drogas importantes que insensibilizam os peixes, minimizando os efeitos danosos do estresse imposto durante o manejo dos animais (ACERETE *et al.*, 2004; FRISCH; ANDERSON, 2000; METTAM *et al.*, 2011; MYLONAS *et al.*, 2005; ROSS; ROSS, 2008; RUANE; CARBALLO; KOMEN, 2002; SNEDDON, 2012; VERA *et al.*, 2010).

Diante do manejo aquícola, o uso de anestésicos se torna importante, visto que diminui substancialmente as atividades fisiológicas do peixe, facilitando o manuseio. Além disso, em pesquisas recentes há relatos de que os peixes sentem estímulos dolorosos, devido às ligações entre as suas atividades comportamentais e os neurotransmissores cerebrais específicos (SNEDDON, 2012). Esses medicamentos foram, inicialmente, utilizados há mais de 40 anos,

em algumas espécies de peixes. A partir de então, buscam-se o melhoramento destas substâncias e métodos mais efetivos para a anestesia (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004).

Os anestésicos podem ser administrados por ingestão, utilizando-se o alimento como condutor de substâncias, injeção, por meio da aplicação direta ou, ainda, por imersão em soluções contendo a substância, sendo este método o menos eficiente devido à baixa solubilidade em solução aquosa de alguns compostos (SUN *et al.*, 2010). Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são tricaína (IUPAC), benzocaína (IUPAC), quinaldina, metomidato, 2-fenoxietanol, óleo de cravo ou seu princípio ativo, o eugenol. As estruturas químicas deste anestésicos estão representadas na Figura 2 (CCAC, 2005; FDA, 2011; KIESSLING *et al.*, 2009; OLIVEIRA; CARMO; OLIVEIRA, 2009; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Figura 2 - Estrutura química dos anestésicos mais utilizados na piscicultura.



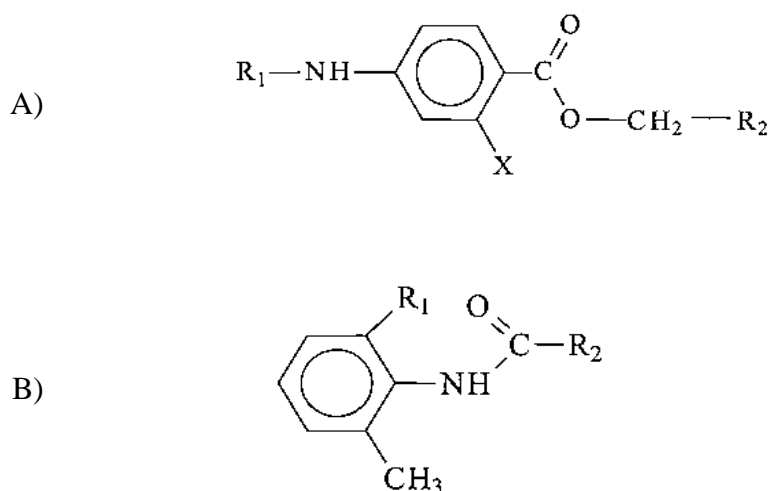
Fonte: Oliveira, Carmo e Oliveira (2009)

3.2 Anestésicos em peixes

Os anestésicos locais diminuem os estímulos dolorosos, enquanto a anestesia geral diminui os níveis de consciência (WEBER *et al.*, 2009, 2011). Em peixes são utilizados anestésicos locais, visto que estes animais têm respiração branquial, a qual possibilita uma rápida absorção dessas drogas, com ação sistêmica. Em comparação aos mamíferos, esta anestesia atua de forma análoga à anestesia geral. Contudo, ao definir o tempo de carência do anestésico, é possível determinar níveis seguros para o consumo da carne do pescado (KIESSLING *et al.*, 2009).

Em geral, a estrutura química da molécula de anestésico local é composta por uma função aromática, uma cadeia intermediária de éster (Figura 3A) ou uma função amida (Figura 3B) e, ainda, um grupo amina secundário ou terciário. Outro fator importante e determinante para a execução das atividades fisiológicas no organismo animal são os grupamentos em R₁ e/ou R₂, que podem conferir caráter anfifílico, determinando a solubilidade do composto em solução aquosa (ARAÚJO; PAULA; FRACETO, 2008).

Figura 3 - Estruturas químicas dos anestésicos de uso na aquicultura contendo (A) função éster e (B) função amida, R₁ e/ou R₂ são grupos amina.



Fonte: Oliveira, Carmo e Oliveira (2009)

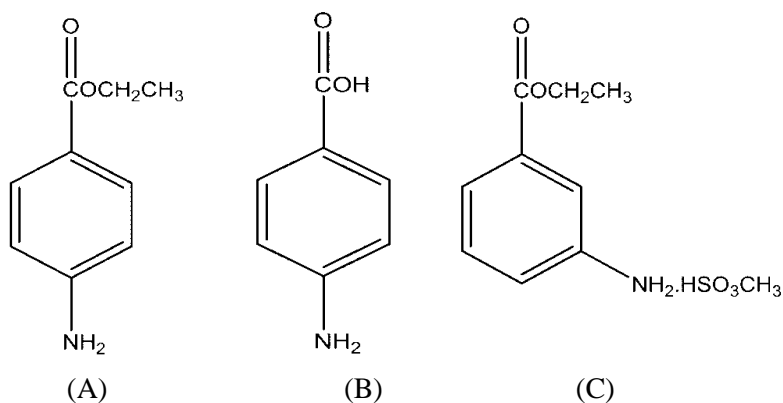
Entre os anestésicos disponíveis no mercado, em geral, são seguidas as recomendações da Food and Drug Administration (FDA), a qual, nos Estados Unidos, o único anestésico aprovado é a tricafina ou MS-222, (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila). Este composto é solúvel em água, sendo aprovado para utilização nas espécies de peixes que pertencem às famílias *Ictaluridae*, *Salmonidae*, *Esocidae* e *Percidae*. Outra ressalva, que nos EUA, assim

como Canadá e Reino Unido, deve ser regulamentado um período residual de 21 dias antes da liberação para o abate dos peixes. Outros países, como Noruega, este período residual vale tanto para tricaína quanto para a benzocaína (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012). Na Coreia do Sul, Nova Zelândia, Austrália, Costa Rica e Chile possuem regulamentação quanto ao uso de AQUI-S® (anestésicos contendo o princípio ativo isoeugenol), onde não é necessário período de depuração residual se ministrado conforme norma técnica indicativa (TUCKEY; FORGAN, 2012; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Assim, dentre os anestésicos utilizados na aquicultura é possível destacar a benzocaína e a tricaína, pela similaridade entre suas estruturas químicas. A benzocaína (4-aminobenzoato de etila) tem massa molecular de $165,19 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade em água de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) e temperatura de fusão de $89-92 \text{ }^\circ\text{C}$. Já a tricaína (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222) tem massa molecular de $261,29 \text{ g mol}^{-1}$, solubilidade em água de $1 \times 10^5 \text{ mg L}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) e temperatura de fusão de $149,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

O precursor da benzocaína (Figura 4A) e da tricaína é o ácido p-aminobenzoico (Figura 4B). A benzocaína é um anestésico local insolúvel em água, o que inviabiliza algumas utilizações em meio aquoso, porém, é amplamente utilizada durante alguns procedimentos farmacêuticos, no tratamento veterinário e nos procedimentos voltados para a saúde humana. Diante da insolubilidade da benzocaína foi necessário o desenvolvimento de outro composto, sendo a tricaína (Figura 4C), com alta solubilidade em água amplamente comercializada (STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 2000). Davis, Stephenson e Noga (2008) realizaram estudos sobre a influência da tricaína na pele e nas córneas da tilápia e verificaram que, quando este anestésico é utilizado em pH alcalino, ocasiona danos a estes órgãos dos peixes, no entanto, não apresentou potencial genotóxico.

Figura 4 - Estruturas químicas dos anestésicos (A) benzocaína, (B) ácido p-aminobenzoico e (C) tricaína.



3.3 Análise residual de anestésicos utilizando métodos analíticos

As técnicas usualmente utilizadas para a análise residual de anestésicos em peixes são as cromatográficas (KIESSLING *et al.*, 2009; KILDEA; ALLAN; KEARNY, 2004; MEINERTZ *et al.*, 1999, 2006; MEINERTZ; SCHREIER, 2009; SCHERPENISSE; BERGWERFF, 2007; STEHLY *et al.*, 1995; STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 1998, 2000). Foram encontrados poucos trabalhos na literatura com o anestésico triclaína utilizando as técnicas eletroquímicas. No entanto, foram encontrados alguns estudos para a determinação de outros anestésicos, tanto na matriz peixe quanto em outras matrizes.

Melles *et al.* (2013) estudaram a avaliação química do metabolismo da pele de peixes, investigando a presença de eugenol e isoeugenol, utilizando a técnica de amperometria para observar a fragmentação eletroquímica destes compostos. Para isso, foi utilizado eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho e Pd/H₂ como eletrodo de referência. Em seguida os autores realizaram as análises empregando um LC/MS, por meio de ambas as técnicas comprovaram que estes anestésicos realizam um processo de oxidação, gerando produtos secundários por meio da dimetilação.

A determinação de benzocaína e butacaína em urina humana foi realizada por Reddy, Balaji e Reddy (2006), por meio da voltametria redissolução anódica na modalidade pulso diferencial. Neste estudo foi utilizado eletrodo de carbono vítreo modificado com nafion (eletrodo de trabalho), Ag/AgCl_{sat} (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar), e o eletrólito de suporte usado foi solução tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹, em pH de 1 e 2. A amplitude de pulso otimizada foi de 50 mV; a velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ e o potencial e o tempo de acumulação de -0,2 V e 210 s, respectivamente. A benzocaína apresentou um potencial de pico em +1,03 V. O método desenvolvido apresentou limites de detecção de 2,40 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ e de quantificação de 7,97 x 10⁻⁹ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,9977. A recuperação do método foi de 97%, demonstrando a eficiência da metodologia utilizada.

Arteaga *et al.* (2012) compararam os resultados da atividade antioxidante dos compostos fenólicos timol, 4-hexilresorcinol, cinamaldeído, sesamol, salilaldeído, carvacrol, ácido gálico, 3-hidroxicumarina e eugenol, por meio da voltametria cíclica. Como solução eletrólito foram utilizadas as soluções de ácido acético e ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ e as soluções estoque dos compostos fenólicos foram preparadas em etanol, na concentração de 5,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Os eletrodos utilizados foram carbono vítreo (trabalho), Ag/AgCl_{sat} (referência) e fio de platina (auxiliar). O potencial de pico anódico para o eugenol foi de 411 mV, em pH 7 e velocidade de

varredura de 100 mV s^{-1} . Os autores verificaram que existe boa correlação entre as técnicas, permitindo o uso da voltametria cíclica para a determinação da atividade antioxidante em especiarias e condimentos.

Lima (2014) realizou o estudo do comportamento voltamétrico da tricaína sobre o eletrodo de carbono vítreo via oxidação (anódica) do anestésico. Foi possível verificar que o composto apresenta dois picos de oxidação um em $+0,8\text{V}$ e outro em $+1,3\text{V}$ vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Compararam as técnicas voltamétricas na modalidade linear, pulso diferencial e onda quadrada frente a dois métodos de extração. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a modalidade onda quadrada, com o limite de quantificação igual a $8,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. O processo de transferência de massa foi controlado por difusão com ocorrência de reações químicas sem complicações cinéticas. O melhor método de extração apresentou taxa de recuperação de 106,13%.

Assim a presente pesquisa representa uma contribuição significativa para a investigação do comportamento eletroquímico do anestésico tricaína utilizando técnicas eletroquímicas frente ao eletrodo modificado com filmes poliméricos condutores e nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizado com ácido carboxílico, uma vez que ambos os modificadores possuem alta taxa de condutividade.

3.4 Análise residual de anestésicos utilizando análise por injeção em batelada (BIA)

O desenvolvimento de sistemas automatizados com alta velocidade e boa precisão tornou-se essencial na química analítica. Assim, têm sido utilizado os métodos de injeção de fluxo (FIA) ou análise por injeção em batelada (BIA).

Duğu *et al.* (2011) realizaram a determinação de benzocaína e procaína em diferentes eletrodos, inclusive eletrodos impressos. Para os estudos cíclicos, utilizou-se eletrodos de carbono vítreo, platina e ouro. Os melhores resultados foram encontrados com o eletrodo de ouro em pH básico, e para a procaína em pH ácido. Utilizando eletrodos impressos de ouro modificados com calixarenos, foi possível observar que a corrente diminuiu devido à interação com o composto orgânico. Neste estudo o autor não utilizou a metodologia BIA.

Dejmkova *et al.* (2011) determinaram benzocaína utilizando FIA com detecção amperométrica empregando eletrodo de pasta de carbono. A solução transportadora para FIA foi tampão B-R pH 4 (80% de metanol, v / v) e a taxa de fluxo utilizada foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O potencial de trabalho foi $+1,2 \text{ V}$. Os resultados encontrados estavam de acordo com os

resultados obtidos com detecção espectrofotométrica padrão declarada pelo fabricante do produto farmacêutico. O método apresentou LOD de $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com 0,9997 R².

Lima *et al.* (2018) realizaram a determinação de benzocaína e tricaína sobre o eletrodo de carbono impresso utilizando a metodologia BIA. Os resultados obtidos demonstram que o método proposto é uma alternativa interessante aos métodos cromatográficos, uma vez que permite a análise rápida (mais de 300 injeções por hora) com baixos limites de detecção ($3,02 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para benzocaína e $3,19 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para tricaína), utilizando apenas 80 mL de amostra para cada análise. Além disso, foi possível obter alta repetibilidade para ambos os compostos analisados, demonstrando um bom desempenho. Neste estudo, a preparação de amostra desenvolvida reduziu a quantidade de gordura no peixe, favorecendo a precisão, como mostrado pelos resultados de recuperação de ambos os anestésicos contidos no peixe (valores acima de 99% para ambos os analitos).

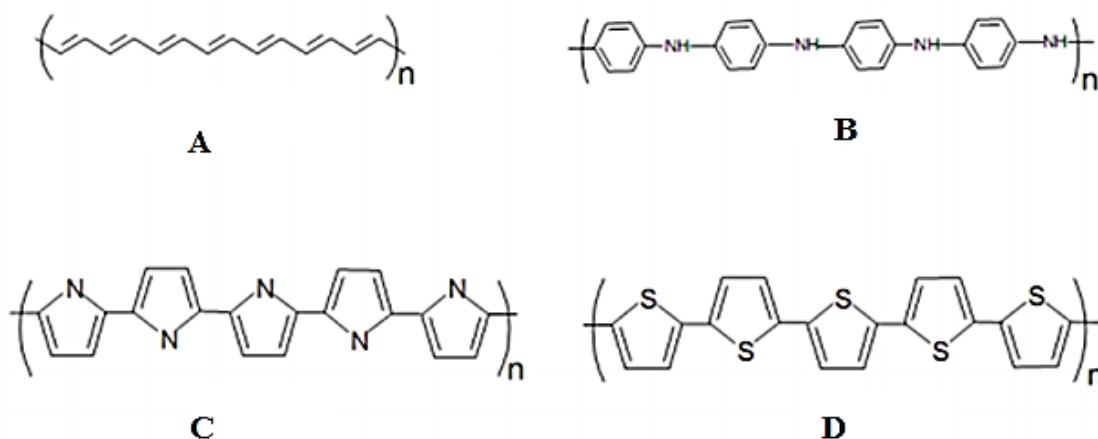
3.5 Polímeros Condutores – Polianilina

Os polímeros são macromoléculas, formados por unidades repetidas ao longo da cadeia molecular (monômeros), ligados covalentemente por meio de uma reação de polimerização (MANO; MENDES, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2012).

A partir de 1976, os experimentos dos pesquisadores Alan MacDiarmid, Hideki Shirakawa e Alan J. Heeger mudaram a utilização dos polímeros. Com os resultados obtidos, os pesquisadores descobriram os polímeros condutores, rendendo o prêmio Nobel de Química em 2000. O principal teor da descoberta tratava do processo de dopagem (remoção ou adição de elétrons na cadeia polimérica), o qual acarretava o aumento da condutividade do polímero em muitas ordens de grandeza (EPSTEIN; MACDIARMID, 1995; GENIES *et al.*, 1990; KANATZIDIS, 1990; MACDIARMID; EPSTEIN, 1995; MAIA *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Assim, os polímeros começaram a ser empregados em ramos tecnológicos, como microeletrônica e sensores, baterias recarregáveis, displays eletrocromáticos, dispositivos emissores de luz, energia fotovoltaica e painéis de isolamento (MEDEIROS *et al.*, 2012). A Figura 5 demonstra exemplos dos principais polímeros condutores.

Figura 5 - Estrutura química dos polímeros orgânicos condutores (A) poliacetileno; (B) polianilina; (C) polipirrol e (D) politiofeno.

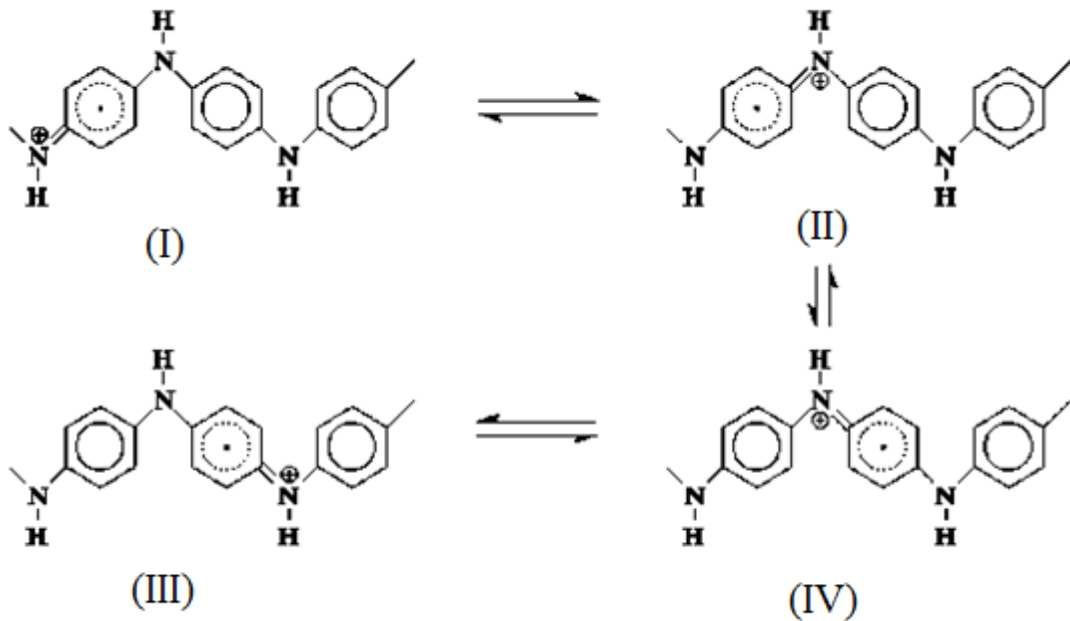


Fonte: Maia *et al.* (2000)

Os polímeros condutores formam pôlarons e bipôlarons, uma vez que mudam a condução elétrica da molécula consideravelmente durante o processo de dopagem, devido as características eletrocromicas. A formação de um pôlaron ocorre devido à retirada de um elétron da cadeia polimérica, assim, passa a ser considerado como um íon radical, com spin $\frac{1}{2}$, com alta associação à distorção reticular, além de presença de alguns estados eletrônicos localizados. Ao retirar o segundo elétron da mesma cadeia polimérica ocorre a formação de um dicátion sem spin, ou seja, bipôlaron, gerado, principalmente, pelo aumento de energia na distorção reticular, a qual é maior que a repulsão de cargas de mesmo sinal (EPSTEIN; MACDIARMID, 1995; GENIES *et al.*, 1990; MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012).

A polianilina (PANI) possui boa estabilidade química em condições ambientes, fácil processabilidade e polimerização e rápida dopagem. Assim, a PANI é um dos polímeros condutores com maior número de pesquisa, devido suas particularidades e potencialidade nas aplicações tecnológicas (MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012). O mecanismo de formação de pôlarons e bipôlarons na PANI pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Representação do transporte de carga na PANI durante o processo de formação do pôlaron.

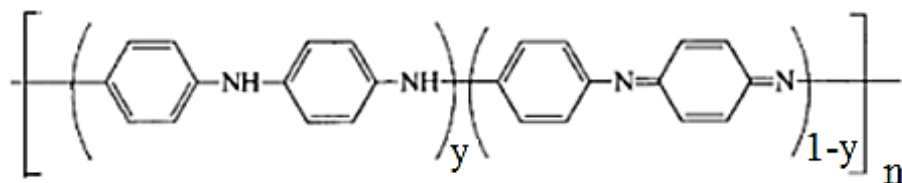


Fonte: Kanatzidis (1990)

Na retirada do primeiro elétron ocorre a formação de um pôlaron (Figura 6II), com a retirada do segundo elétron forma-se um bipôlarons (Figura 6III). Com isso, a condutividade da PANI aumenta consideravelmente. Em média, a PANI possui alta taxa de condutividade elétrica (106 S/m), sendo considerada um oligômero (MEDEIROS *et al.*, 2012).

Na literatura, os primeiros relatos relacionando a eletroquímica e PANI foram nos anos de 1950 e 1960, entretanto foi a partir de 1980, que foram intensificados os ensaios químicos com este polímero devido seu potencial em aplicações tecnológicas (HEEGER, 2001; MACDIARMID, 2001; MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012). A PANI é um polímero formado pela reação de polimerização da anilina, oxidada e reduzida, repetidas e alternadas, conforme demonstrado na fórmula molecular geral na Figura 7.

Figura 7 - Estrutura química (geral) da PANI.



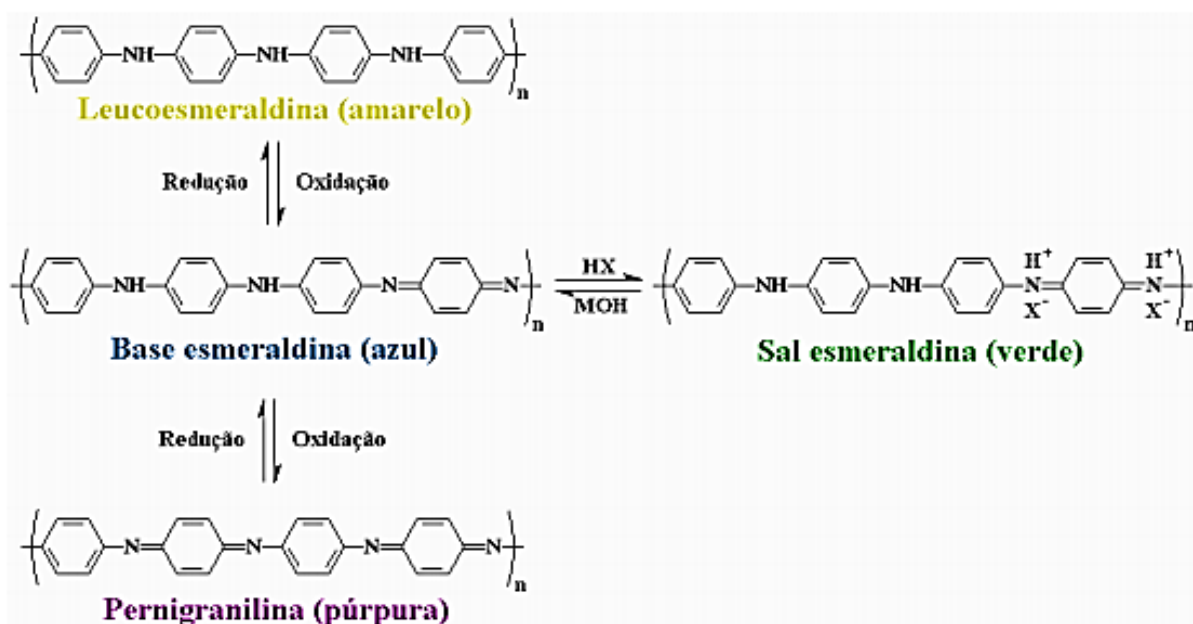
Fonte: Kanatzidis (1990)

A PANI contém quatro anéis aromáticos, separados por átomos de nitrogênio. Possui unidades reduzidas (y), chamadas de anéis benzenoides e unidades oxidadas ($y-1$) denominadas anéis quinoides. Este polímero condutor possui três estados de oxidação conhecidos (GENIES *et al.*, 1990; MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Dentre os estados de oxidação, existem duas formas extremas e uma intermediária. A base leucoesmeraldina, quando $y = 1$ (Figura 7), o polímero encontra-se completamente reduzido, contendo apenas nitrogênios amina. No estado pernigranilina, quando $y = 0$ (Figura 7), podem estar presentes na molécula do polímero somente nitrogênios imina. A forma esmeraldina, quando $y = 0,5$ (Figura 7), o polímero encontra-se completamente oxidado. As formas não protonadas da PANI são conhecidas como bases, e as formas protonadas são denominadas sais (KANG; NEOH; TAN, 1998; MAIA *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2012).

As diferentes formas de oxidação da PANI podem ser observadas na Figura 8. É importante destacar que, de todas as formas possíveis da polianilina, o sal esmeraldina é a forma que possui os maiores valores de condutividade (EPSTEIN; MACDIARMID, 1995; GENIES *et al.*, 1990; MATTOSO, 1996).

Figura 8 - Estrutura química dos diferentes estados de oxidação da PANI.



Fonte: Mattoso (1996) e Medeiros *et al.* (2012).

Em geral, a síntese da PANI pode ser obtida por duas vias, a via química e a via eletroquímica. De forma geral, a obtenção da PANI é por meio da oxidação, visto que ambas

as rotas ocorrem via oxidação da anilina. Na síntese eletroquímica de PANI, a polimerização ocorre pela oxidação do monômero anilina sobre um eletrodo, na forma de um filme. A relação monômero/oxidante tem influência direta no rendimento da polimerização e na obtenção de polímeros com maiores valores de condutividade. Além da relação monômero/oxidante, também a síntese da PANI é influenciada diretamente pelo pH e temperatura, e ainda pelos parâmetros eletroquímicos. O conhecimento prévio destas relações permite selecionar as melhores condições de síntese para que se obtenha um rendimento máximo associado a altas condutividades (MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Durante a obtenção da PANI, a morfologia e a estrutura base são influenciadas pelo meio de síntese e razão de dopagem. Para o controle de pureza, podem ser empregados os métodos espectroscópicos, além de associar as técnicas eletroquímicas verificando os estados de oxidação e dopagem (MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012). Existem diferentes metodologias para a síntese de PANI, as quais buscam-se maiores taxas de condutividade. Assim o estudo do processo de polimerização associados aos modificadores contribuem para a aplicação deste polímero em sensores eletroquímicos.

3.6 Nanotubo de carbono de múltiplas paredes como modificadores em sensores eletroquímicos

Os nanotubos de carbono (CNT's) são estruturas únicas com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis. Essas estruturas foram mostradas em 1991, por Iijima (IJIMA, 1991), alguns anos após a descoberta do fulereno. Os nanotubos de carbono possuem, usualmente, poucos ângstroms a dezenas de nanômetros, e podem ter comprimentos acima de centímetros (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; HEER, 2002; CHEUNG *et al.*, 2002; DAI, 2002; PRIYA; BERCHMANS, 2012; SOBHA; NARAYANANKUTTY, 2015).

Os CNT's podem ser divididos em dois grupos: de camada única (do inglês, *single-walled 32carbono nanotubes* ou SWCNT's) e de múltiplas camadas (*multi-walled 32carbono nanotubes*, MWCNTs). Os MWCNTs apresentam comprimento superior a 10 micrômetros e diâmetros que variam de 10 a 50 nm e são constituídos de 2 a 40 camadas de grafenos concêntricos que se distanciam entre si por 0,34 nm. Os SWCNTs são mais finos e apresentam diâmetro variando entre 1 e 5 nm, sendo formados por uma única folha de grafeno (KONDAWAR; DESHPANDE; AGRAWAL, 2012; LIN *et al.*, 2017; ZARBIN, 2007).

A estabilidade térmica dos CNT's, sob condições reacionais, associados ao seu calor específico, condutividade térmica e termoelétrica, faz com que este material seja de interesse

fundamental ao ser empregado no controle de estabilidade dos dispositivos (IJIMA, 1991; PRIYA; BERCHMANS, 2012; SOBHA; NARAYANANKUTTY, 2015).

Estudos mostraram que os CNTs possuem estabilidade térmica de até 2800 °C no vácuo, e condutividade térmica com valores superiores a 3000 WK⁻¹m⁻¹ em temperatura ambiente, fazendo com que este material seja comparado à condutividade do grafite e diamante, cujos valores de condutividade térmica são os mais altos conhecidos, 0,80 e 1000 WK⁻¹m⁻¹, respectivamente (CHE; CAGIN; GODDARD, 2000; KIM *et al.*, 2001; KONDAWAR; DESHPANDE; AGRAWAL, 2012; LIN *et al.*, 2017).

Além disso, possui excelentes propriedades mecânicas, ópticas e eletrônicas, os nanotubos de carbono têm apresentado um grande potencial para diversas aplicações, incluindo fios quânticos, diodos moleculares e dispositivos nanoeletrônicos com processos de purificação podem ocorrer situações de funcionalização das paredes dos CNTs (BARAZZOUK *et al.*, 2004; BASKARAN; MAYS; BRATCHER, 2004).

Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas que são substancialmente diferentes dos nanotubos não funcionalizados, e este fenômeno é explorado para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletro-mecânicos em escala nanométrica devido a sua grande resistência e flexibilidade mecânica. Essas estruturas quimicamente modificadas podem ser usadas de forma a facilitar a interação e dispersão dos nanotubos com moléculas orgânicas e biológicas, ou até mesmo facilitar a dispersão em solventes orgânicos e inorgânicos (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004; RAO *et al.*, 1997).

3.7 Uso da estatística no desenvolvimento de sensores eletroquímicos

A vantagem de se utilizar as técnicas estatísticas é a redução do número de experimentos necessários para a compreensão de um determinado sistema, resultando em menor consumo de reagentes e consideravelmente menos trabalho laboratorial. Desta forma, os métodos multivariados são mais rápidos e rentáveis frente aos métodos univariados durante a execução de experimentos com grande número de dados ou variáveis (HOPKE, 2003; JALALVAND, 2017; SANTOS; SANTOS; FERREIRA, 2003).

O planejamento fatorial completo ou fatorial fracionado são, usualmente, empregados por serem *designs* de primeira ordem com simplicidade e custo relativamente baixo. Os modelos de planejamento fracionado são necessários quando a análise envolve grande número de fatores. Por meio desta técnica de planejamento é possível obter a livre interação com dados, a capacidade de fazer comparações, procurar semelhanças, diferenças e tendências. Esta técnica

também pode ser utilizada para determinar a resposta simples, em que as superfícies são lineares em relação a todos os fatores investigados ou apenas a primeira etapa de uma investigação multivariada, cuja resposta é determinante (JALALVAND, 2017; TARLEY *et al.*, 2009).

Quando o termo de interação é desprezível, a interpretação resultante para a análise é considerada planar. Quanto mais importante for o termo de interação, maior será o grau de torção da superfície de resposta (JALALVAND, 2017; TARLEY *et al.*, 2009). Já para o caso de dois fatores, a superfície de resposta é dada pelo modelo linear (ARMSTRONG, 2006) de acordo com a equação 1:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (\text{equação 1})$$

Entretanto, as ferramentas estatísticas possuem pouca aplicação associadas às técnicas eletroanalíticas. Tarley *et al.* (2009) descreveram a associação entre as técnicas multivariadas e as eletroanalíticas, entre os anos de 1996 a 2008, as quais, estatisticamente, foram publicados 8,9% de artigos científicos na área de eletroquímica associado à metodologia de análise por injeção em fluxo, seguido por 37,5% utilizando a modalidade voltamétrica pulso diferencial e onda quadrada, 8,9% com biossensores, 1,8% com potenciometria e outros com 41,1%, incluindo a otimização da preparação dos eletrodos.

Terezo e Pereira (2000) estudaram a morfologia do composto Ti/IrO₂-Nb₂O₅, utilizando o planejamento fatorial fracionado em uma matriz experimental de em 2⁶⁻³ para reduzir o número de experimentos e compreender as propriedades eletroquímicas do composto. Estudos realizados por Pereira e Kubota (2004) utilizaram um método amperométrico associado ao delineamento fatorial (dois níveis e três fatores) a fim de preparar eletrodos imobilizados com riboflavina em uma superfície de sílica modificada com óxido de nióbio. Os fatores utilizados e as proporções necessárias foram estatisticamente significativos na intensidade da corrente. O uso do planejamento fatorial fracionado reduziu o número de experimentos, além de auxiliar na análise da interação dos dados.

REFERÊNCIAS

- ACERETE, L. *et al.* Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1-4, p. 167–178, Aug. 2004.
- ARAÚJO, D. R. de; PAULA, E. de; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1775-1783, set. 2008.
- ARMSTRONG, N. A. **Pharmaceutical experimental design and interpretation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 256 p.
- ARTEAGA, J. F. *et al.* comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 5, p. 5126-5138, May 2012.
- BARAZZOUK, S. *et al.* Single-wall carbon nanotube films for photocurrent generation. A prompt response to visible-light irradiation. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 108, n. 44, p. 17015-17018, Oct. 2004.
- BASKARAN, D.; MAYS, J. W.; BRATCHER, M. S. Polymer-grafted multiwalled carbon nanotubes through surface-initiated polymerization. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 43, n. 16, p. 2138-2142, Apr. 2004.
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; HEER, W. A. Carbon nanotubes--the route toward applications. **Science**, New York, v. 297, n. 5582, p. 787-792, Aug. 2002.
- BERBER, S.; KWON, Y.-K.; TOMÁNEK, D. Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes. **Physical Review Letters**, New York, v. 84, n. 20, p. 4613-4616, May 2001.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.
- BOTREL, B. M. C. *et al.* Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC-MS. **Food Chemistry**, London, n. 229, p. 674-679, Aug. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília: Mapa, 2009. 440 p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Acordo de cooperação técnica**. Brasília: MPA, 2012. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controlempa/sanidade-pesqueira/acordo-de-cooperacao-tecnica-mpa-mapa>. Acesso em: 25 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2014. 60 p. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc. Acesso em: 25 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Brasília: MPA, 2012. 128 p. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>. Acesso em: 25 fev. 2018.

BRITTO, P. J.; SANTHANAM, K. S. V.; AJAYAN, P. M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Lausanne, v. 41, n. 1, p. 121-125, Oct. 1996.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). **Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing**. Ottawa: CCAC, 2005. 87 p. Disponível em: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2018.

CASTRUCCI, F. *et al.* Large photocurrent generation in multiwall carbon nanotubes. **Applied Physics Letters**, New York, n. 89, p. 253107, June 2006.

CHE, J.; CAGIN, T.; GODDARD, W. A. Thermal conductivity of carbon nanotubes. **Nanotechnology**, Bristol, n. 11, p. 65-69, July 2000.

CHEUNG, C. L. *et al.* Diameter-controlled synthesis of carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 106, n. 10, p. 2429-2433, Feb. 2002.

DAI, H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 35, n. 12, p. 1035-1044, Dec. 2002.

DAVIS, M. W.; STEPHENSON, J.; NOGA, E. J. Health the effect of tricaine on use of the fluorescein test for detecting skin and corneal ulcers in fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 20, n. 2, p. 86-95, June 2008.

DEJMKOVA, H. *et al.* Determination of benzocaine using HPLC and FIA with amperometric detection on a carbon paste electrode. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 23, n. 3, p. 662-666, Feb. 2011.

DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS G.; SAITO, R. Physics of carbon nanotubes. **Carbon**, Elmsford, v. 33, n. 7, p. 883-891, 1995.

DUTU, G. *et al.* The electrochemical behavior of some local anaesthetics on screen-printed electrodes modified with calixarenes. **Pharmacia**, São Paulo, v. 59, n. 2, p. 147-160, 2011.

EPSTEIN, A. J.; MACDIARMID, A. G. Polyanilines: from solitons to polymer metal, from chemical curiosity to technology. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 69, n. 1-3, p. 179-182, Mar. 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Food safety and quality**. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>. Acesso em: 16 fev. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014 (SOFIA)**. Rome: FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/097d8007-49a4-4d65-88cd-fcaf6a969776/>. Acesso em: 25 fev. 2018.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 23-34, July 2000.

GENIES, E. M. *et al.* Polyaniline: a historical survey. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 36, n. 2, p. 139-182, June 1990.

HEEGER, A. J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 125, n. 1, p. 23-42, Sept. 2001.

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

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 500, n. 1, p. 365-377, Dec. 2003.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136-1142, Apr. 2004.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, London, n. 354, p. 56-58, Nov. 1991.

JALALVAND, A. R. Applications of chemometrics-assisted voltammetric analysis. *In*: STOYTCHIEVA, M.; ZLATEV, R. (Ed.). **Applications of the voltammetry**. London: IntechOpen, 2017. p. 4-34.

KANATZIDIS, M. G. Conductive polymers. **Chemical and Engineering News**, Washington, v. 68, n. 49, p. 36-54, Dec. 1990.

KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Polyaniline: a polymer with many interesting intrinsic redox states. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 23, n. 2, p. 277-324, 1998.

KIESSLING, A. *et al.* Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*Salmosalar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3-4, p. 301-308, Jan. 2009.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 265-277, June 2004.

KIM, P. *et al.* Thermal transport measurements of individual multiwalled nanotubes. **Physical Review Letters**, New York, v. 87, n. 21, p. 215502, Dec. 2001.

KONDAWAR, S.; DESHPANDE, M. D.; AGRAWAL, S. P. Transport properties of conductive polyaniline nanocomposites based on carbon nanotubes. **International Journal of Composite Materials**, New York, v. 2, n. 3, p. 32-36, Aug. 2012.

LIMA, R. M. F. de. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica de tricaina em peixes (Oreochromis niloticus)**. 2014. 106 p. (Dissertação) – (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LIMA, R. M. F. de *et al.* Determination of benzocaine and tricaine in fish fillets using BIA with amperometric detection. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 30, n. 2, p. 283-287, Feb. 2018.

LIN, W. *et al.* Polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites for structural vibration damping and strain sensing. **Journal of Materials Research**, Pittsburgh, v. 32, n. 1, p. 73-83, Jan. 2017.

MACDIARMID, A. G. synthetic metals: a novel role for organic polymers (Nobel Lecture). **Reviews of Modern Physics**, Minneapolis, v. 73, p. 701-711, Sept. 2001.

MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Secondary doping in polyaniline. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 69, n. 1-3, p. 85-92, Mar. 1995.

MAIA, D. J. *et al.* Conductive polymer synthesis in the solid host matrices. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 204-215, abr. 2000.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. 208 p.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 7, p. 62-77, 2012.

MEINERTZ, J. R. *et al.* Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-STM at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, n. 1, p. 347-354, Apr. 2006.

MEINERTZ, J. R. *et al.* Liquid chromatographic determination of benzocaine and N-acetylbenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, n. 1, p. 255-260, Sept. 1999.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-STM exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 3-4, p. 200-206, Nov. 2009.

MELLES, D. *et al.* In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, n. 913-914, p. 106-112, Jan. 2013.

MYLONAS, C. C. *et al.* Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 467-481, May 2005.

OLIVEIRA, J. R.; CARMO, J. L. do; OLIVEIRA, K. K. C. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, jul. 2009.

PEREIRA, A.C.; KUBOTA, L. T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 725-729, out. 2004.

PRIYA, S.; BERCHMANS, S. CuO microspheres modified glassy carbon electrodes as sensor materials and fuel cell catalysts. **Journal of the Electrochemical Society**, New York, v. 159, n. 4, p. F73, 2012.

RAO, A. M. *et al.* Diameter-selective raman scattering from vibrational modes in carbon nanotubes. **Science**, New York, v. 275, n. 5297, p. 187-191, Jan. 1997.

REDDY, T. M.; BALAJI, K.; REDDY, S. R. J. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of benzocaine and butacaine with nafion modified glassy carbon electrode. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 79, n. 2, p. 253-259, July 2006.

ROSS, L. G.; ROSS, B. (Ed.). **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. 240 p.

RUANE, N. M.; CARBALLO, E. C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, Washington, v. 33, n. 10, p. 777-784, Aug. 2002.

SANTOS, W. N. L. dos; SANTOS, C. M. C.; FERREIRA, S. L. C. Application of three-variables Doehlert matrix for optimization of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Journal Microchemical**, New York, v. 75, n. 3, p. 211-221, Dec. 2003.

SCHERPENISSE, P.; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, n. 1-2, p. 407-410, Mar. 2007.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Aquicultura e pesca: tilápias: estudos de mercado Sebrae/ESPM**. São Paulo: Sebrae, 2008. 13 p.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 21, n. 1, p. 32-43, Jan. 2012.

SOBHA, A. P.; NARAYANANKUTTY, S. K. Improved strain sensing property of functionalised multiwalled carbon nanotube/polyaniline composites in TPU matrix. **Sensitive and Actuators A. Physical**, Lausanne, n. 233, p. 98-107, 2015.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W. de; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, dez. 2009.

STEHLY, G. R. *et al.* Effects of temperature on the loss of benzocaine and acetylated benzocaine residues from edible tissues of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Final FDA Report. Contract 224-92-7036. Study CAP-94-00078-01**. 1995. 15 p.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 121-127, Apr. 1998.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants. Part A**, Abingdon, v. 17, n. 5, p. 387-392, May 2000.

SUN, Y.-X. *et al.* Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cucuier*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 309, n. 1-4, p. 82-85, Nov. 2010.

TARLEY, C. R. T. *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, New York, v. 92, n. 1, p. 58-67, May 2009.

TEREZO, A. J.; PEREIRA, E. C. Fractional factorial design applied to investigate properties of Ti/IrO₂-Nb₂O₅ electrodes. **Electrochimica Acta**, New York, v. 45, n. 25-26, p. 4351-4358, Aug. 2000.

THESS, A. *et al.* Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. **Science**, New York, v. 273, n. 5274, p. 483-487, July 1996.

THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, Oct. 2001.

TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 480-489, May 2006.

TUCKEY, N. P. L.; FORGAN, L. G. A rapid and simple fluorometric method for quantifying isoeugenol in seawater and in plasma and white muscle from Australasian snapper (*Pagrus auratus*). **Food Chemistry**, London, v. 133, n. 4, p. 1664-1670, Aug. 2012.

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4. ed. Flórida: Department of Health and Human Services, 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2013.

- VERA, L. M. *et al.* MS-222 toxicity in juvenile sea bream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1-2, p. 29-34, Sept. 2010.
- WEBER, R. A. *et al.* Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Soleasenegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 1-2, p. 108-112, Nov. 2011.
- WEBER, R. A. *et al.* The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Soleasenegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1-2, p. 147-150, Mar. 2009.
- WEI, Y. *et al.* Polymerization of aniline and alkyl ring-substituted 94 anilines in the presence of aromatic additives. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 94, n. 19, p. 7716-7721, Sept. 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety**. Oxford: WHO, 2013.
Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/>. Acesso em: 25 fev. 2018.
- ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 201-218, Feb. 2012.
- ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, nov./dez. 2007.
- ZHAO, G. *et al.* Application of a carbon nanotube modified electrode in anodic stripping voltammetry for determination of trace amounts of 6-Benzylaminopurine. **Microchimica Acta**, Wien, n. 143, p. 255-260, Nov. 2003.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1****UTILIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL NO ESTUDO DO
COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE GCE/PANI-MWTC's COMO UM
POSSÍVEL MATERIAL SUPERCAPACITOR FRENTE SUA EXCELENTE
ESTABILIDADE CÍCLICA**

Rafael Machado Felix de Lima^a, Michele Dorcília de Oliveira Silva^a; Fabiana Silva Felix^a,
Juliano Elvis de Oliveira^b, Cleber Nogueira Borges^a, Adelir Aparecida Saczk^{a*}

^a – Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^b – Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, 37200000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente: adelir@ufla.br (A.A.Saczk).

RESUMO

Neste trabalho está descrito o uso da técnica de planejamento fatorial fracionário associado à técnica eletroquímica para o desenvolvimento de um sensor à base de polianilina e nanotubos de carbono de múltiplas paredes sobre um eletrodo de carbono vítreo (GCE/PANI-MWTCs). Foi avaliada uma matriz experimental gerada pelo método estatístico com seis variáveis, gerando um total de 32 experimentos. Foram desenvolvidas e aplicadas equações matemáticas que correlacionaram a intensidade da corrente de pico (I_p), a largura do pico à meia altura ($w_{1/2}$) e o deslocamento de potencial (E_p) para interpretar o conjunto de resposta gerado em cada perfil eletroquímico, para os eletrodos de GCE/PANI e GCE/PANI-MWTCs. Foi possível verificar que concentrações $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e anilina melhoraram o processo de eletropolimerização da PANI na superfície do GCE. Utilizando MWTC's na concentração de $0,02 \text{ mg}$ houve incremento no sinal do eletrodo, aumentando a intensidade de corrente de pico, e estabilizando os processos de oxirredução da PANI na forma mais condutora. Outro fator importante para eletropolimerizar a PANI sobre GCE foi a velocidade de varredura de potencial (v) em 5 mV s^{-1} , sendo a mais eficiente no estudo durante o processo eletródico. Em relação à janela de potencial de varredura (W), correlacionando com as equações propostas, a janela de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V vs KCl}_{\text{sat}}$ foi mais eficiente para a formação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's, gerando resultados estáveis de I_p , E_p e $W_{1/2}$. Além disso, foram analisados números de ciclos de 1 até 50 ciclos de varredura, verificando-se a estabilidade do processo eletródico, o qual a partir do segundo ciclo de varredura já ocorre a formação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's. Sobre a natureza do processo eletródico da PANI-WMTC's observou-se que o transporte de massa foi controlado por adsorção com reações químicas acopladas. Considerando apenas a relação de estabilidade frente a quantidade de número de ciclos de varredura o eletrodo formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's o estudo demonstrou excelente estabilidade cíclica, podendo ser considerado como um material supercapacitor para futuros estudos. Ainda, a formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's durante o segundo ciclo de varredura de potencial o estudo evidenciou a possibilidade de utilização do eletrodo como um sensor eletroanalítico para compostos de interesse.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono. MWTC's. Voltametria cíclica. Polianilina. GCE. Eletrossíntese.

1 INTRODUÇÃO

Os sensores eletroquímicos contendo polímeros condutores, como por exemplo, a polianilina (PANI), geram um incremento na intensidade de corrente de pico, melhorando o sinal analítico, tornando-os mais sensíveis na determinação de espécies químicas eletroativas. A PANI e os derivados da anilina são compostos com unidades repetitivas alternadas, podendo ser encontradas na forma totalmente reduzida, totalmente oxidada ou em uma forma com maior estabilidade, a qual a PANI possui a mesma quantidade de grupos em forma reduzida e oxidada. Além disso, este polímero possui estabilidade química na forma condutora, facilidade de polimerização e dopagem. Dentre as formas de obtenção de PANI, utilizando a via de síntese eletroquímica, por meio da eletropolimerização na superfície de um substrato, possibilita o controle físico-químico do processo de polimerização (LIN *et al.*, 2017; MACDIARMID, 2001; MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Para a melhoria do sinal eletroquímico, estes polímeros podem ser modificados com diferentes agentes de carbono, como por exemplo, nanotubos de carbono de parede única (CNT's) ou de múltiplas paredes (MWTC's). Ao associar CNT's ou MWTC's a polímeros condutores ocorre a melhoria de suas propriedades mecânicas e elétricas, desta forma, aumentando a intensidade de corrente de pico e o processo de transferência de carga do sensor eletroquímico (IIJIMA, 1991; KONDAWAR; DESHPANDE; AGRAWAL, 2012; LIN *et al.*, 2017; PRIYA; BERCHMANS, 2012; SOBHA; NARAYANANKUTTY, 2015).

A quimiometria é uma ferramenta que pode ser utilizada na otimização de sensores modificados. Apresenta várias vantagens, principalmente na redução do número de experimentos e na interpretação de dados. É possível aplicar a quimiometria em várias áreas da eletroquímica como *design* experimental e otimização, tratamentos de dados, classificação de amostras e determinação de concentrações (JALALVAND, 2017).

Pereira e Kubota (2004) avaliaram o uso de amperometria associada ao delineamento fatorial (dois níveis e três fatores) para a otimização do preparo de eletrodos de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. Utilizando a técnica estatística foi possível obter a melhor reversibilidade no processo redox, menor separação entre os potenciais de pico anódico e catódico. Observaram ainda, que a concentração da solução eletrólito possui uma pequena influência na intensidade de corrente de pico. Assim, os fatores utilizados e as proporções necessárias para o preparo do eletrodo foram estatisticamente significativos.

Nos métodos eletroanalíticos é gerada uma quantidade considerável de dados, devido à grande quantidade de variáveis a serem otimizadas e correlacionadas. Assim, ao utilizar

técnicas estatísticas apresenta vantagens, principalmente na redução do número de experimentos e na interpretação dos dados. O planejamento fatorial completo ou fracionado constrói uma matriz de experimentos com as principais variáveis a serem estudadas e suas interações, auxiliando na compreensão das propriedades eletroquímicas do composto em análise (TARLEY *et al.*, 2009).

Nesse contexto, o objetivo neste trabalho foi aplicar o planejamento fatorial fracionado no processo de eletrossíntese de um sensor à base de PANI e nanotubo de carbono de múltiplas paredes sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE/PANI-WMTC's). Este estudo foi importante por aplicar uma matriz estatística de planejamento das condições experimentais, contendo dois níveis e seis fatores (2^{6-1}). Também foi proposto o uso de equações matemáticas para analisar as respostas obtidas durante os estudos por voltametria cíclica, correlacionando-os e otimizando os resultados, além de reduzir o número de análises, preservando a eficiência de resposta dos conjuntos de dados voltamétricos.

2 EXPERIMENTOS

2.1 Reagentes

A anilina (ACS > 99,0 %) foi adquirida da Neon Comercial, bidestilada a 180 °C, desaerada com N₂, e armazenada em frasco âmbar a 4 °C. A anilina foi preparada em solução aquosa nas concentrações de 0,1 e 0,5 mol L⁻¹, armazenada em frasco âmbar a 4 °C. A solução foi utilizada em temperatura ambiente (25°C). O MWTC's funcionalizado com ácido carboxílico (extensão da parede >8% de ácido carboxílico, 27 diâmetros de 9,5 nm, comprimento de 1,5 µm, > 80% base carbono) e a solução Tween® 20. Os MWTC's foram dispersos em água com adição de Tween® 20, em uma proporção de 3:1 (v/v), utilizando um ultrassom (Branson Digital SFX250 250 watts com 20 kHz) e preparados nas concentrações de 0,02 e 0,1 mg L⁻¹. A solução foi utilizada em temperatura ambiente (25 °C). Sigma-Aldrich (St. Louis/ Missouri, EUA).

Os demais reagentes foram preparados sem outros procedimentos de purificação. O ácido clorídrico (HCL) foi preparado em meio aquoso nas concentrações de 0,1 mol L⁻¹ ou 0,5 mol L⁻¹, pH 2,30, adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis/ Missouri, EUA). Todas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar à 4 °C e preparadas utilizando água ultrapura, processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore® Corporation, Bedford, EUA), a resistividade medida após o tratamento foi menor que 18,2 MΩ cm.

2.2. Modificação do eletrodo GCE/PANI-MWTCs utilizando planejamento fatorial fracionado

Para a modificação do eletrodo GCE/PANI-MWTCs foram considerados seis fatores de controle (concentrações de HCl, anilina e MWTC's, v , NC e E), cada um deles com dois níveis, resultando em 64 combinações. O planejamento fatorial fracionado 2^{k-p} (k=6 e p=1) otimizado favoreceu a realização de 32 experimentos. Os experimentos voltamétricos foram realizados em oitos diferentes células eletroquímicas aleatoriamente, conforme estabelecido na Tabela 1. A matriz de planejamento e a análise dos resultados foram realizadas pelo software estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

Tabela 1 - Proporções de HCl, anilina, MWTC's e parâmetros eletroquímicos da técnica voltametria cíclica referente ao nível determinado pelos ensaios estatísticos (fatorial fracionário 2^{6-1}) realizados no processo de otimização dos experimentos.

Parâmetros	Níveis	
	-1	1
NC	20	50
v (mV s^{-1})	5	50
E (V)	-0,2 a +0,9	-0,2 a +1,0
HCl (mol L^{-1})	0,1	0,5
Anilina (mol L^{-1})	0,1	0,5
MWTC's (mg L^{-1})	0,02	0,1

NC = número de ciclos; v = velocidade de varredura; E = janela de varredura de potencial; MWTC's = nanotubo de carbono de múltiplas paredes funcionalizado com ácido carboxílico.

Fonte: Do autor (2018)

Seguindo os relatos de Xavier *et al.* (2009), a metodologia foi modificada. O eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi polido com alumina na granulometria de $0.30 \mu\text{m}$. A modificação do GCE ocorreu via eletrossíntese empregando a técnica de voltametria cíclica (CV). As concentrações de anilina ($0,1$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), HCl ($0,1$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e MWTC's ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$), bem como os parâmetros eletroquímicos e suas variações, foram estabelecidas de acordo com o planejamento fatorial fracionado.

Para o estudo eletroquímico do eletrodo modificado GCE/PANI-MWTC's foi possível analisar a combinação dos fatores para a realização de um dos 32 experimentos, por exemplo: adicionou-se em uma célula eletroquímica em momentos diferentes uma solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, uma solução de anilina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução de MWTC's $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Para a formação do filme sobre a superfície do eletrodo de GCE realizou-se a variação dos parâmetros eletroquímicos, utilizando a técnica de voltametria cíclica: velocidade de varredura (v) igual a 5 mVs^{-1} , número de ciclos (NC) igual a 20 ciclos e janela de varredura de potencial (E) igual a $-0,2$ a $+0,9 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$, por exemplo, assim gerando uma combinação de várias possibilidades entre os fatores analisados e diversos experimentos. Os 32 experimentos realizados foram obtidos a partir da Tabela 1.

2.3 Instrumentação Analítica

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato IviumVertex 100mA (Ivium Technologies, Netherlands) interfaciado pelo software IviumSoft versão 2.403. Foi utilizada uma célula eletroquímica de $50,0 \text{ mL}$ com arranjo de três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, carbono vítreo modificado (Metrohm, Switzerland) com área geométrica

de 0,034 cm², um eletrodo auxiliar de fio de platina (Metrohm, Switzerland), um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl_{sat}) (Metrohm, Switzerland).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do perfil cíclico do eletrodo GCE/PANI-WMTC's considerando o planejamento fatorial fracionado

A matriz experimental gerada pela combinação da Tabela 1 pode ser observada na Tabela 2, já codificada e aplicada à técnica de planejamento fatorial fracionado para a eletrossíntese do eletrodo GCE/PANI-WMTC's. Dos 32 experimentos, o menor nível corresponde à menor concentração de HCl, anilina e MWTC's e o maior nível corresponde à maior concentração dessas substâncias, em relação aos aos parâmetros eletroquímicos da técnica voltametria cíclica, foram avaliados o menor e o maior nível de v , NC e W (E). Os experimentos propostos pela Tabela 2 foram realizados aleatoriamente.

Tabela 2 - Principais efeitos de interação e matriz de planejamento utilizando fatorial fracionário. (Continua)

Exp.	v	NC	W	[HCl]	[Anilina]	[MWTC's]
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1	-1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	-1
12	1	1	-1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1	-1	-1
14	1	-1	1	1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	1
16	1	1	1	1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1	1
18	1	-1	-1	-1	1	-1
19	-1	1	-1	-1	1	-1
20	1	1	-1	-1	1	1
21	-1	-1	1	-1	1	-1
22	1	-1	1	-1	1	1
23	-1	1	1	-1	1	1
24	1	1	1	-1	1	-1
25	-1	-1	-1	1	1	-1
26	1	-1	-1	1	1	1

Tabela 2 - Principais efeitos de interação e matriz de planejamento utilizando fatorial fracionário. (Conclusão)

Exp.	v	NC	W	[HCl]	[Anilina]	[MWTC's]
27	-1	1	-1	1	1	1
28	1	1	-1	1	1	-1
29	-1	-1	1	1	1	1
30	1	-1	1	1	1	-1
31	-1	1	1	-1	1	-1
32	1	1	1	1	1	1

Fonte: Do autor (2018)

Foram desenvolvidas as equações de 1 a 4, correlacionando-as à intensidade de corrente de pico (i_p), ao deslocamento de potencial (e_p) e à largura de pico ($w_{1/2}$). Devido à diferença de escala entre os dados, todos os valores foram autoescalados, ou seja, centrados na média e divididos pelo respectivo desvio padrão, gerando i_p' , e_p' e $w_{1/2}'$.

$$x = \frac{i_p'}{e_p' \cdot w_{1/2}'}$$

(equação 1)

$$x = \frac{1}{w_{1/2}' \cdot e_p'}$$

(equação 2)

$$x = \frac{i_p'}{w_{1/2}'}$$

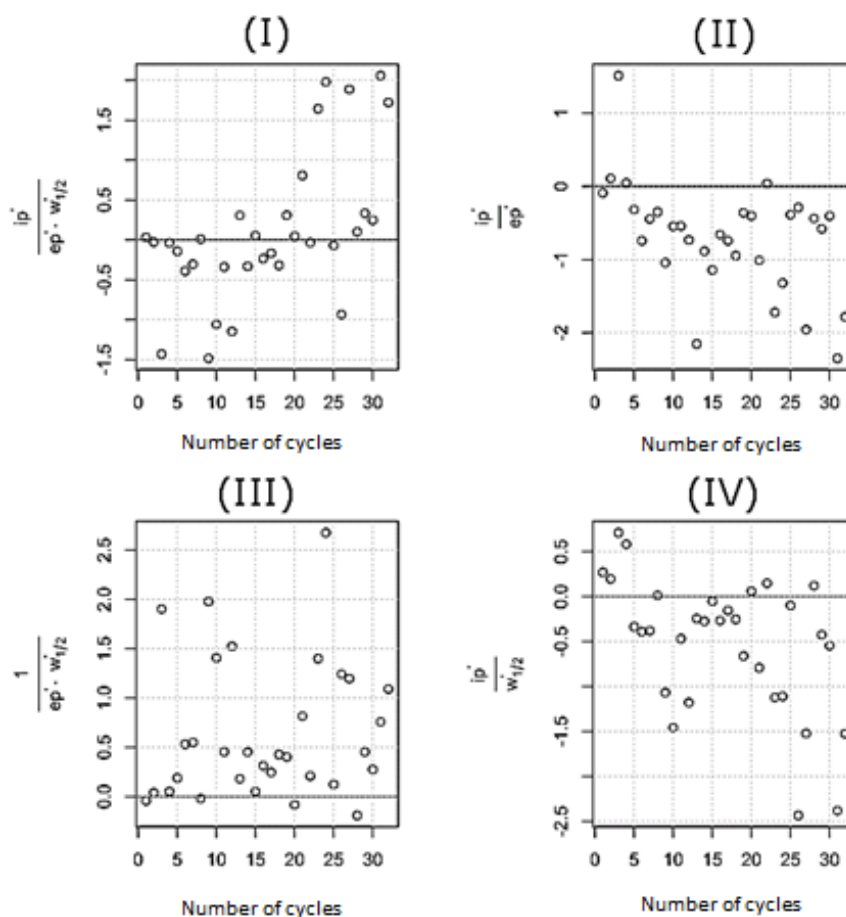
(equação 3)

$$x = \frac{i_p'}{e_p'}$$

(equação 4)

A Figura 1 representa os resultados dos 32 experimentos de acordo com as Tabelas 1 e 2 e as interações de i_p' , e_p' e $w_{1/2}'$, possibilitando a compreensão da eletropolimerização frente aos parâmetros avaliados.

Figura 1 - (I) Perfil de distribuição da maior intensidade de corrente de pico (I_p) com baixo deslocamento de potencial (E_p) vs. menor largura de pico ($W_{1/2}$) em função de cada experimento estipulado na Tabela 1, com valores autoescalados; (II) i_p em função de E_p autoescalado; (III) E_p em função de $w_{1/2}$ autoescalado; (IV) I_p em função de $W_{1/2}$ autoescalado.



Fonte: Do autor (2018)

Para a otimização dos parâmetros foram avaliados os maiores valores de i_p' e menores valores de e_p' e $w_{1/2}'$, com o intuito de obter a melhor relação de corrente com menor deslocamento de pico, analisando em qual das condições estudadas apresentaram maior influência para a obtenção deste conjunto de dados. Assim, correlacionando as equações de 1 a 4 com os dados obtidos, foi possível verificar que todos os fatores, assim como suas interações influenciaram diretamente na formação do eletrodo GCE/PANI-MWTCs.

Utilizando a equação 1 (Figura 1I) verificou-se que a maior parte dos experimentos se encontra acima da linha de média, cuja concentração de HCl e anilina foi de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando que as maiores concentrações destas substâncias geram as melhores condições experimentais. Em relação à solução de modificação de MWTC's foram avaliadas duas concentrações $0,02$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Em ambas as concentrações geraram alta intensidade de

corrente de pico durante a formação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's, entretanto, ao utilizar $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ do modificador foram produzidos filmes mais finos, possibilitando melhor interação iônica. A presença de MWTC's promoveu uma transferência direta de elétrons, estabilizando os estados de oxidação leucoesmeraldina/esmeraldina, aumentando a intensidade de corrente de pico devido a maior condutividade do eletrodo.

Considerando a equação 2 (Figura 1 II) foi possível observar que a maior parte dos experimentos possui dependência entre o aumento de corrente e o deslocamento de potencial. Foi evidente que as maiores intensidade de corrente possuem dependência com o deslocamento de pico. Desta forma, a maioria dos resultados obtidos apresentou-se abaixo da linha de média, visto que as variáveis analisadas possuem respostas diferentes (V , mV s^{-1} , entre outros). Para a análise dos dados estes foram autoescalados, considerando até duas casas decimais.

Ao analisar os dados pela equação 3 (Figura 1 III) foi possível verificar que a maior parte dos experimentos se apresentou acima da linha de média, demonstrando que o deslocamento de potencial possui dependência direta com $w_{1/2}$. Ou seja, quanto maior for E_p' maior será $W_{1/2}'$.

Na equação 4 (Figura 1 IV) foi possível aferir que o aumento da intensidade de corrente de pico, na maioria dos experimentos, possui dependência direta com $w_{1/2}$. Assim, grande parte da resposta obtida apresentou-se abaixo da linha de média, mostrando que as maiores intensidades de corrente de pico geram, mesmo que pequeno, um incremento na largura do pico.

Em relação aos demais parâmetros eletroquímicos analisados, considerando as Tabelas 1 e 2, foi possível avaliar a influência de v . Observando os experimentos e relacionando-os à Figura III, foi possível verificar que os experimentos conduzidos a 5 mV s^{-1} apresentaram melhor resposta de I_p' e menor E_p' , pois nos experimentos conduzidos em v igual a 50 mV s^{-1} houve um decréscimo de I_p' seguido de um incremento de E_p' em cerca de $\pm 0,2V$. Assim, experimentos conduzidos em menores velocidades possuem melhores resultados em relação a I_p' , E_p' e $W_{1/2}'$.

Entre os 32 experimentos previstos na matriz de planejamento fatorial fracionado, considerando a Figura 1 e as equações 1 a 4, os experimentos com a melhor relação entre i_p' , e_p' e $w_{1/2}'$ foram o de número 25 e 31. As condições experimentais de ambos os experimentos ocorreram com HCl e anilina nas concentrações de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e MWTC's $0,02 \text{ mg L}^{-1}$. Houve diferença nos parâmetros eletroquímicos. Para o experimento 25 as condições foram de 20 ciclos de varredura de potencial (NC) e a janela de potencial de varredura (E) $-0,2$ a $0,9 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$. Para o experimento 31, as condições foram de 50 ciclos de varredura de

potencial (NC) e a janela de potencial de varredura (E) foi de -0,2 a 1,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Ambos os experimentos foram eficientes em menor velocidade de varredura (5,0 mV s⁻¹).

Figura 2 - Perfil de distribuição da maior intensidade de corrente de pico (ip) com baixo deslocamento de potencial (ep) vs. menor largura de pico (w_{1/2}) em função de cada experimento estipulado na Tabela 1, com valores autoescalados (A) Experimento 25 e (B) Experimento 31. (Continua)

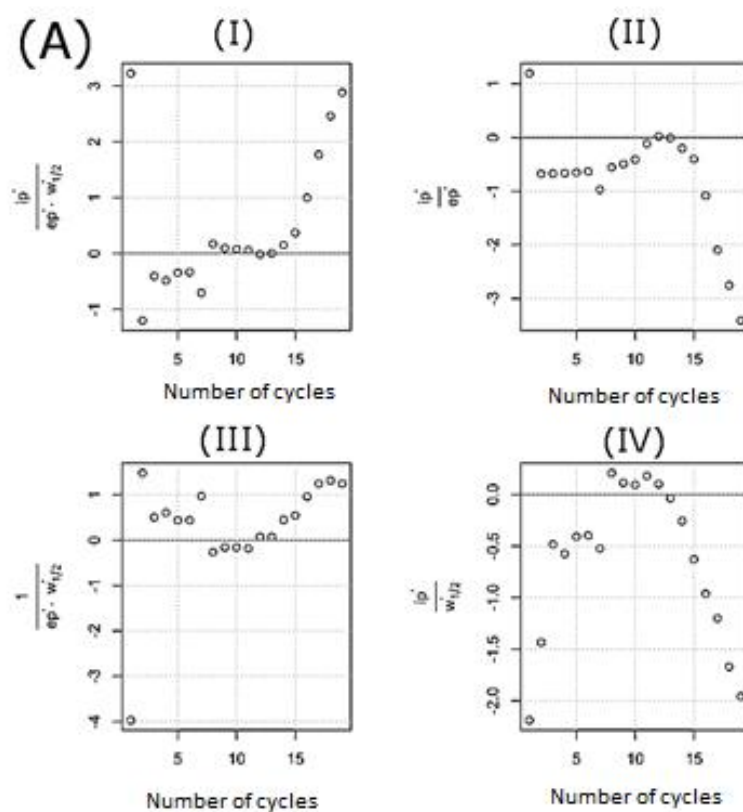
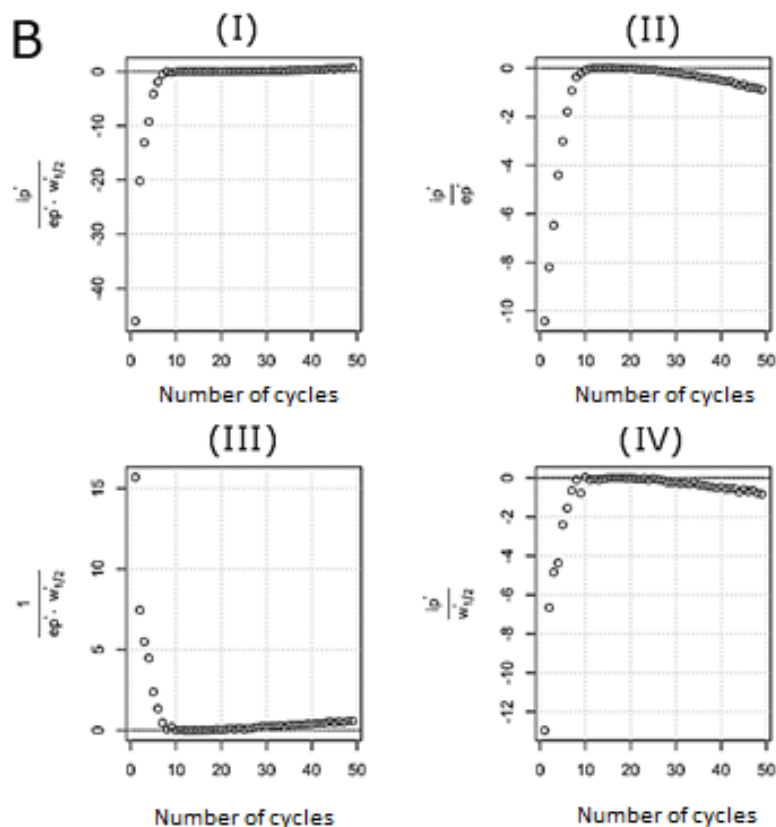


Figura 2 - Perfil de distribuição da maior intensidade de corrente de pico (i_p) com baixo deslocamento de potencial (ep) vs. menor largura de pico ($w_{1/2}$) em função de cada experimento estipulado na Tabela 1, com valores autoescalados (A) Experimento 25 e (B) Experimento 31. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018)

Considerando as equações propostas, o experimento 25 (Figura 2A), durante os 20 ciclos de varredura de potencial, houve ligeira estabilidade até o sétimo ciclo, considerando os valores observados acima da linha da média, enquanto para o experimento 31 houve estabilidade de ciclagem desde o segundo ciclo, entretanto após sexto ciclo das 50 varreduras sucessivas de potencial ocorre a absorção do material sob a superfície do eletrodo GCE durante a eletrossíntese do eletrodo GCE/PANI-WMTC's. No experimento 25, considerando a equação 1 a 4 foi possível verificar que apesar da estabilidade até o 6º ciclo de varredura de potencial a intensidade de corrente de pico (i_p), deslocamento de potencial (ep) e ($w_{1/2}$) não se mantém completamente acima da linha da média nos demais ciclos de varredura de potencial. Com a equação 2, foi possível aferir que o experimento 31 possui menor deslocamento de potencial e menor $w_{1/2}$, pois já nos primeiros ciclos apresentou valores dentro da média esperada. Para as equações 3 e 4, foi possível aferir que o experimento 25 quando comparado à intensidade de corrente de pico, não foi capaz de manter altas taxas de corrente sem deslocar o potencial de

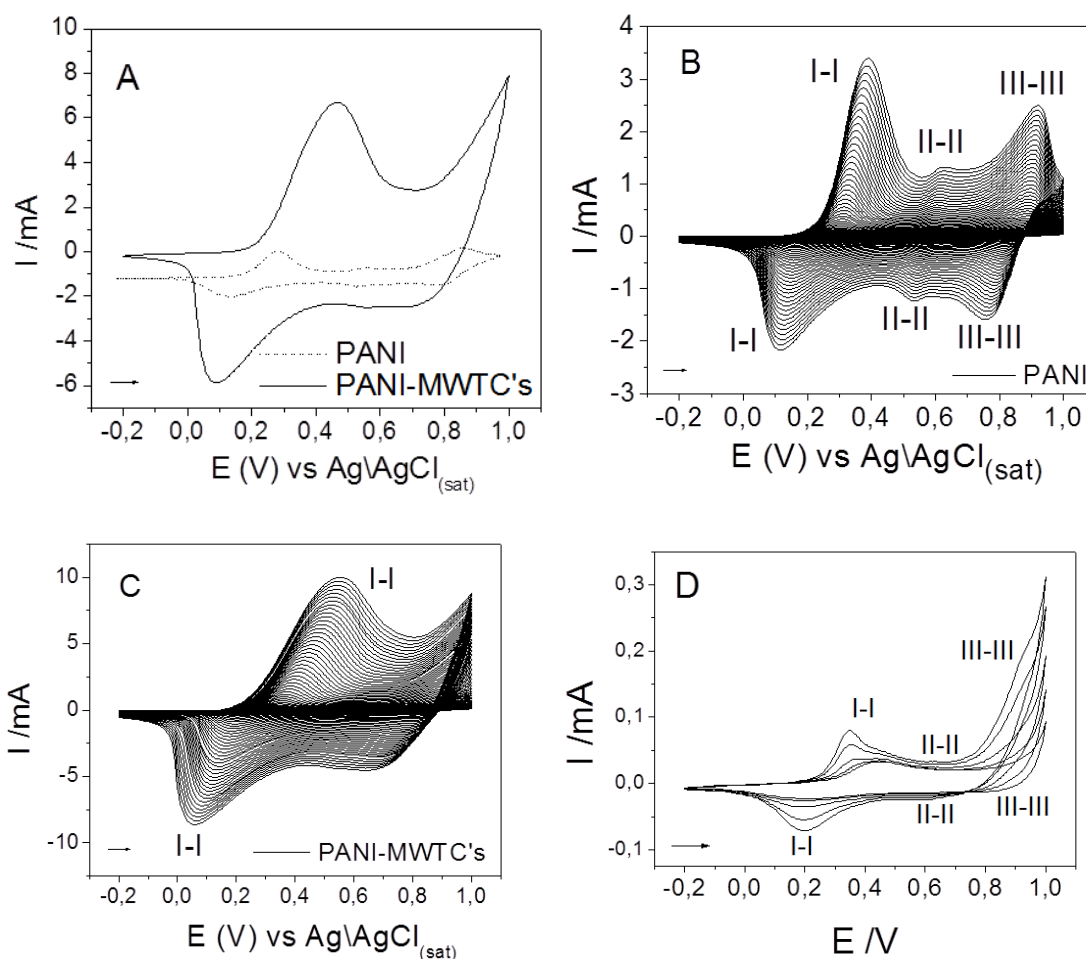
pico ou aumentar consideravelmente $w_{1/2}$ entre os ciclos estudados. Já o experimento 31 possui maior estabilidade, mantendo-se fixo, e próximo à linha de média.

Avaliando que a principal diferença entre os experimentos ocorre na janela de varredura de potencial e na quantidade de número de ciclos, foi possível afirmar que na janela de varredura do experimento 31 (-0,2 a 1,0 V *vs* Ag/AgCl (KCl_{sat})) obteve-se melhor estabilidade cíclica durante a eletrossíntese, visto que o experimento percorre de 0 a 50 ciclos de varredura, assim, considerando apenas a relação de estabilidade frente a quantidade de número de ciclos de varredura o eletrodo formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's o estudo demonstrou excelente estabilidade cíclica, podendo ser considerado como um material supercapacitor para futuros estudos. Ainda, a formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's durante o segundo ciclo de varredura de potencial o estudo evidenciou a possibilidade de utilização do eletrodo como um sensor eletroanalítico para compostos de interesse.

3.2 Comparação do perfil voltamétrico do eletrodo GCE/PANI-WMTC's e GCE/PANI

Considerando as condições experimentais do nível 31 (Experimento 31), foram realizadas as mesmas análises voltamétricas, porém sem a presença de MWTC's com a finalidade de avaliar o quanto infere MWTC's durante a eletrossíntese no eletrodo GCE/PANI-MWTC's. Desta forma, na Figura 3 (A) são representados os voltamogramas comparando os eletrodos GCE/PANI-MWTCs e GCE/PANI, o perfil voltamétrico completo da eletrossíntese do eletrodo GCE/PANI (Figura 3B), o perfil voltamétrico completo da eletrossíntese do eletrodo GCE/PANI-MWTCs (Figura 3C) e o perfil do eletrodo GCE/PANI-MWTC's até 5 ciclos.

Figura 3 - Voltamogramas cíclicos da eletrossíntese de PANI-MWTC's sobre GCE, condições: anilina e HCl 0,5 mol L⁻¹, e MWTC's 0,02 mg, $\Delta E = -0,2$ V a 1,0 V vs KCl_{sat}, $\nu = 5$ mV s⁻¹ (A) do 50º ciclo da eletrossíntese de PANI e PANI-MWTC's; (B) 50 ciclos de GCE/PANI; (C) 50 ciclos de GCE/PANI-MWTC's e (D) até 5 ciclos de GCE/PANI-MWTC's.



Fonte: Do autor (2018)

Na Figura 3A está evidenciado que o eletrodo de GCE/PANI-MWTC's apresentou boa intensidade de corrente de pico no primeiro par redox (pico I-I) em comparação ao eletrodo eletrossintetizado apenas com GCE/PANI. No eletrodo de GCE/PANI-MWTC's também foi possível verificar uma pequena formação do segundo par redox (pico II-II, intermediário), conferindo a PANI formada na presença de MWTC's, uma coloração esverdeada, em que a molécula está na sua forma com maior potencial condutor esmeraldina/vernigranilina ou sal esmeraldina. Gerando um incremento na intensidade de corrente de pico de 7 a 10 mA. Assim, os MWTC's estabilizam o sistema e impedem a completa oxidação de PANI sobre o GCE, gerando um polímero condutor no estado de pôlarons ou bipôlarons, com anéis benzoides e quinoides.

Além disso, ao observar os voltamogramas foi possível identificar nos experimentos conduzidos, o perfil voltamétrico da eletrossíntese de GCE/PANI (Figura 4B) e GCE/PANI-MWTC's (Figura 4D), até seis possíveis processos redox, denominados I-I, II-II e III-III. Os processos redox principais ocorrem em I-I e III-III, responsáveis pelas reações de interconversão da PANI em seus estados de oxidação leucoesmeraldina/esmeraldina e esmeraldina/ernigranilina, respectivamente. O par redox II-II, produto do polímero em um estado mais oxidado, aparece geralmente com baixa intensidade de corrente de pico (MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012). Na Figura 4C foi possível observar a estabilidade da eletrossíntese do eletrodo GCE/PANI-MWTC's durante 50 ciclos consecutivos de varredura de potencial.

4 CONCLUSÃO

Foi possível a utilização de uma ferramenta estatística (planejamento fatorial fracionado) para eletrossintetizar o eletrodo GCE/PANI-MWTC's, otimizando e correlacionando as variáveis, reduzindo o número de experimentos e possibilitando a compreensão do sistema em estudo. As concentrações de anilina e HCl influenciam diretamente no processo de formação do filme de PANI-MWTC's sobre GCE. Concentrações de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e anilina melhoram o processo de eletropolimerização da PANI na superfície do GCE, pois conduziram a PANI na forma de sal esmeraldina. A utilização de MWTC's na concentração de $0,02 \text{ mg}$ melhorou o sinal do eletrodo, suplementando a intensidade de corrente de pico, e estabilizando os processos de oxirredução da PANI. Em relação às variáveis eletroquímicas, a menor ν (5 mV s^{-1}) foi mais eficiente durante o processo eletródico. Em relação à janela de potencial de varredura (W), correlacionando com as equações propostas, a janela de potencial de varredura $-0,2 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V vs KCl}_{\text{sat}}$ foi mais eficiente para a formação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's, gerando resultados estáveis de I_p' , E_p' e $W_{1/2}'$.

Foram analisados números de ciclos de 1 até 50 ciclos de varredura, verificando-se a estabilidade do processo eletródico, o qual no segundo ciclo de varredura já ocorre a formação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's. Observando o comportamento cíclico dos experimentos foi possível verificar que processo eletródico é controlado pela transferência de massa em forma de adsorção, de modo quase-reversível com reações químicas acopladas à transferência de carga. Considerando apenas a relação de estabilidade perante a quantidade de número de ciclos de varredura, o eletrodo e a formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's, no estudo, demonstraram excelente estabilidade cíclica, podendo ser considerado como um material supercapacitor para futuros estudos. Ainda, a formação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's durante o segundo ciclo de varredura de potencial o estudo evidenciou a possibilidade de utilização do eletrodo como um sensor eletroanalítico para compostos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Rede Mineira de Química (RQ-MG) sob a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro. Os autores agradecem o Departamento de Química (DQI/UFLA), Laboratório de Analítica e

Eletroanalítica (LAE), Laboratório de Análises Físico Químicas de Aguardente de Cana, Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Diamantina, Minas Gerais, Brasil) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA).

REFERÊNCIAS

- GENIES, E. M. *et al.* Cyclic voltammetry of polyaniline: interpretation of the middle peak. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, n. 249, p. 97-107, 1988.
- IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, London, n. 354, p. 56-58, Nov. 1991.
- JALALVAND, A. R. Applications of chemometrics-assisted voltammetric analysis. *In*: STOYTICHEVA, M.; ZLATEV, R. (Ed.). **Applications of the voltammetry**. London: IntechOpen, 2017. p. 4-34.
- KONDAWAR, S.; DESHPANDE, M. D.; AGRAWAL, S. P. Transport properties of conductive polyaniline nanocomposites based on carbon nanotubes. **International Journal of Composite Materials**, New York, v. 2, n. 3, p. 32-36, Aug. 2012.
- LIN, W. *et al.* Polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites for structural vibration damping and strain sensing. **Journal of Materials Research**, Pittsburgh, v. 32, n. 1, p. 73-83, Jan. 2017.
- MACDIARMID, A. G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers (Nobel Lecture). **Reviews of Modern Physics**, Minneapolis, v. 73, p. 701-711, Sept. 2001.
- MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.
- MEDEIROS, E. S. *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 7, p. 62-77, 2012.
- NASCIMENTO, G. M. do *et al.* Spectroscopic characterization of polyaniline formed in the presence of montmorillonite clay. **Polymer**, London, v. 47, n. 17, p. 6131-6139, 2006.
- NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 4, p. 706-723, Apr. 1964.
- PEREIRA, A.C.; KUBOTA, L. T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 725-729, out. 2004.
- PRIYA, S.; BERCHMANS, S. CuO microspheres modified glassy carbon electrodes as sensor materials and fuel cell catalysts. **Journal of the Electrochemical Society**, New York, v. 159, n. 4, p. F73, 2012.
- R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 25 fev. 2018.

RABIA, M. *et al.* Preparation of polyaniline/ PbS core-shell nano/ microcomposite and its application for photocatalytic H₂ electrogeneration from H₂O. **Scientific Reports**, Sydney, v. 8, n. 1107, p. 1-12, Jan. 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 299 p.

SOBHA, A. P.; NARAYANANKUTTY, S. K. Improved strain sensing property of functionalised multiwalled carbon nanotube/polyaniline composites in TPU matrix. **Sensitive and Actuators A. Physical**, Lausanne, n. 233, p. 98-107, 2015.

TAGOWSKA, M.; PALYS, B.; JACKOWSKA, K. Polyaniline nanotubules: anion effect on conformation and oxidation state of polyaniline studied by Raman spectroscopy. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 142, n. 1-3, p. 223-229, Apr. 2004.

TARLEY, C. R. T. *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, New York, v. 92, n. 1, p. 58-67, May 2009.

XAVIER, M. G. *et al.* Synthesis of nanoparticles and nanofibers of polyaniline by potentiodynamic electrochemical polymerization. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 9, n. 3, p. 2169-2172, Mar. 2009.

ARTIGO 2**DETECÇÃO RESIDUAL DE TRICAÍNA EM FILÉ DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*) POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL
UTILIZANDO ELETRODO GCE/PANI-MWTC's**

Rafael Machado Felix de Lima^a; Michele Dorcília de Oliveira^a; Fabiana da Silva Felix^a; Juliano Elvis de Oliveira^b; Sérgio Scherrer Thomasi^a; Lucas Franco Ferreira^c, Ricardo Augusto Moreira de Souza Corrêa^c, Adelir Aparecida Saczk^{a*}

^a – Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras – MG, Brasil.

^b – Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil.

^c – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39100-000 Diamantina – MG, Brasil.

*Autor correspondente: A. A. Saczk (adelir@dqi.ufla.br)

RESUMO

Durante o processo de manejo aquícola são utilizados anestésicos, com o intuito de insensibilizar o peixe e facilitar as atividades de produção, isso faz com que haja uma melhora na qualidade da carne do pescado, pois ao diminuir o estresse ao animal, o produto possui melhor textura de carne, e ainda, reduz o índice de mortalidade. Entretanto, o manejo aquícola carece de atenção quanto à segurança alimentar, uma vez que estes compostos químicos podem deixar traços residuais na carne dos pescados. Neste sentido, objetivou-se realizar a determinação de tricaína em filés de peixe, empregando o eletrodo de carbono vítreo modificado com polianilina e nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (GCE/PANI-MWTC's) por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Caracterizou-se o eletrodo GCE/PANI-MWTC's por FTIR, Raman e EIS, demonstrando a relação do ciclo de varredura de potencial e a formação da cadeia polimérica. O melhor resultado para a formação do eletrodo foi obtido com dois ciclos de varredura. A tricaína apresentou comportamento irreversível com um pico anódico em 0,70 V com deslocamento de até $\pm 0,14$ V. O eletrodo modificado demonstrou eficiência nas varreduras eletroquímicas, com boa relação entre o potencial de corrente de pico e intensidade de corrente de pico. A melhor relação de I_{pa} foi obtida na voltametria de pulso diferencial, com as condições na velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} , amplitude de pulso (A_p) de 100 mV s^{-1} e tempo de pulso (t_s) de 20 ms. Os limites de detecção foram de $2,08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e o de quantificação foi de $4,61 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação de 0,9924. O método de extração apresentou eficiência na extração da tricaína do filé de peixe com recuperação média de $90\% \pm 4\%$. Foram realizadas propostas de interações de mecanismos entre a polianilina (PANI), nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (MWTC's) e o anestésico tricaína. Foram propostos três mecanismos: (I) interação por ligação de hidrogênio pelo grupo amino (R-NH_2), entre PANI-MWTC's e PANI-Tricaína; (II) ligação de hidrogênio pelo grupamento éster ($\text{R-COOR}'$) e (III) interações π - π . Os estudos das propostas de mecanismos orgânicos permitiram compreender a forma como a tricaína, PANI e MWTC's interagem quando submetidas em sistemas de análise eletroquímica, observando assim, quais são os principais pares eletrônicos envolvidos durante a análise, contribuindo para a otimização da metodologia analítica.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias químicas para a modificação de eletrodos de carbono vítreo traz significativa melhora perante o sinal eletroquímico, sensibilidade e seletividade para a detecção e quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos. Nos últimos anos, considerando os materiais de modificação, têm-se destacado os nanotubos de carbono (CNTs), entre eles os nanotubos de múltiplas paredes MWTC's, pois, possuem excelente atividade eletroquímica, alta condutividade eletrônica, grande área de superfície e facilidade de funcionalização. Entretanto, de acordo com Lisboa *et al.* (2020), os CNTs possuem interações inter-tubo de van der Waals, ou seja, quando estes tubos estão dispostos próximos um ao outro, ocorre uma resistência de junção, porque o contato entre tubo-tubo impede a mobilidade eletrônica ao longo da estrutura, fato que possivelmente diminui o transporte de elétrons. A fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e condução eletrônica durante a modificação com MWTC's, estes, podem ser associados aos polímeros condutores, minimizando a resistência de contato entre os tubos e ainda, visando ao alinhamento entre as cadeias poliméricas e MWTCs. (CAETANO *et al.*, 2017; CASTRUCCI *et al.*, 2006; IJIMA, 1991; LIN *et al.*, 2017; LISBOA *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2008; MATTOSO, 1996; OCHIAI *et al.*, 2017; PÖHLS *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 1997; SAHOO *et al.*, 2010; SALVATIERRA *et al.*, 2013; SOBHA; NARAYANANKUTTY, 2015).

Destacando-se diante dos polímeros condutores, a polianilina (PANI) e os derivados da anilina, possuem estabilidade química na forma condutora, facilidade de polimerização e dopagem (LIN *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2012; SOBHA; NARAYANANKUTTY, 2015). O baixo custo do monômero (anilina), a alta estabilidade nas condições ambientais, propriedades ajustáveis, condutividade eletrônica (em sua forma de sal esmeralda), processo redox bem estabelecido e a capacidade de formar filmes, fazem do PANI um dos polímeros condutores importante aliado durante a modificação de eletrodos e sua associação com estruturas de carbono, visto que apresenta anéis benzenoides possibilitando a interação π - π com MWTC's (GAJENDRAN *et al.*, 2008; LISBOA *et al.*, 2020; SALVATIERRA *et al.*, 2012, 2013; SALVATIERRA; OLIVEIRA; ZARBIN, 2010).

A PANI possui três diferentes estados de oxidação já explorados na literatura: leucoesmeraldina (totalmente reduzido), base esmeralda (parcialmente reduzido) e pernigranilina (totalmente oxidada). Destas formas, para a modificação de eletrodos, considerando o transporte eletrônico, a base de esmeraldina é a forma considerada mais promissora, haja vista suas propriedades de modulação por dopagem ácida e formação de um

sal esmeraldina com comportamento condutor (BHADRA *et al.*, 2009; LISBOA *et al.*, 2020; MACDIARMID, 2001; OUEINY; BERLIOZ; PERRIN, 2014; ZENGIN *et al.*, 2002).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu este trabalho considerando a área da piscicultura, responsável pelo subsídio de 10% a 12% de toda população mundial, fator crucial no crescimento da economia. Esta carne possui baixo teor de gorduras saturadas, carboidratos e colesterol proteico de alta qualidade, além de micronutrientes essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (BRASIL, 2014; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO, 2014; U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2011).

Para facilitar o processo de manejo com o objetivo de insensibilizar o animal são utilizados anestésicos, entre eles, um dos mais utilizados na aquicultura são a tricaina (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222), a benzocaína e o óleo de cravo, e, ainda, há alguns relatos da utilização de isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato (COYLE; DURBORROW; TIDWELL, 2004).

A tricaina é um composto aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para a aplicação no manejo aquícola. A MS-222 é um éster derivado do ácido p-aminobenzoico, cuja síntese derivada tem origem a partir da adição do grupamento metanosulfonado, a fim de tornar este composto solúvel em água, diferente da benzocaína (BONASTRE *et al.*, 2014; COYLE; DURBORROW; TIDWELL, 2004; DAVIS; STEPHENSON; NOGA, 2008; KIESSLING *et al.*, 2009; TONI *et al.*, 2015).

A Organização das Nações Unidas (ONU), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), monitoram a qualidade do alimento humano consumido, garantindo que o produto não contenha traços de compostos anestésicos (BRASIL, 2014).

De acordo com o relatório da Food And Agriculture Organization of United Nations (FAO, 2019), a China, no ano de 2019, obteve uma produção de 1,8 milhões de toneladas de tilápia-do-nilo, um aumento de cerca 500.000 toneladas em comparação com o ano de 2018. Os agricultores aumentaram a produção no segundo metade de 2018, e no início de 2019, em um esforço para enviar volumes antes da data de vigência esperada. Com a China, temos grandes produtores de tilápia na América Latina, como Brasil, além da África e Estados Unidos, por exemplo. O mercado do pescado está enfrentando alguns obstáculos regulatórios em diversos países, visto a necessidade de crescimento, as tarifas de importação e a necessidade de manter a qualidade confrontando com as normas de segurança alimentar durante a cadeia produtiva.

Este trabalho visa à determinação de tricaína no filé de filé de tilápia-do-nilo (*oreochromis niloticus*) utilizando um eletrodo modificado com PANI-MWTC's sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE) empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Além de comprovar a boa relação para a formação e utilização do eletrodo modificado, com potencial para a quantificação de compostos residuais nos filés deste peixe. Neste trabalho mostra-se o promissor desempenho frente a quantificação residual de compostos utilizados durante o manejo em outros pescados.

2 Experimentos

2.1 Reagentes e soluções

A anilina (ACS > 99,0 %) foi adquirida da Neon Comercial, bidestilada a 180 °C, desaerada com N₂, e armazenada em frasco âmbar a 4 °C. A solução de anilina foi preparada em água na concentração de 0,5 mol L⁻¹, armazenada em frasco âmbar a 4 °C. A solução foi utilizada em temperatura ambiente (25 °C). O MWTC's funcionalizado com ácido carboxílico (extensão da parede >8% de ácido carboxílico, 27 diâmetros de 9,5 nm, comprimento de 1,5 µm, > 80% base carbono) e a solução Tween® 20. Os MWTC's foram dispersos em água com adição de Tween® 20, em uma proporção de 3:1 (v/v), utilizando um ultrassom (Branson Digital SFX250 250 watts com 20 kHz) e preparados na concentração 0,02 mg L⁻¹. A solução foi utilizada em temperatura ambiente (25 °C), Sigma-Aldrich (St. Louis/ Missouri, EUA).

Os demais reagentes foram preparados sem outros procedimentos de purificação. O fosfato de potássio monobásico (NaH₂PO₄) (P.A.), fosfato de potássio dibásico (Na₂HPO₄), foram utilizados para o preparo da solução tampão fosfato, pH 7,20. O ácido clorídrico (HCL) e Cloreto de Potássio (KCL) foram utilizados para o preparo de soluções nas concentrações, 0,5 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente, sendo adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis/ Missouri, EUA). O Ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) foi utilizado na concentração de 0,1 mmol L⁻¹ e 5,0 mmol L⁻¹ sendo adquirido da Labsynth Produtos para Laboratórios LTDA. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore® Corporation, Bedford, EUA).

A tricaína (≥ 99%) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis/ Missouri, EUA). A solução estoque contendo tricaína (0,01 mmol L⁻¹) foi preparada no dia da análise, assim como a solução eletrólito tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹), com pH igual 7,20, a qual foi preparada por meio da adição dos sais de NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄. Estas soluções foram preparadas utilizando

água ultrapura, processada por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore® Corporation, Bedford, EUA).

2.2 Preparo do eletrodo GCE modificado com PANI-MWTCs e do anestésico Tricaína

2.2.1 Modificação do eletrodo GCE/PANI-MWTC's

Seguindo os relatos de Xavier *et al.* (2009), a metodologia foi modificada. O eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi polido com alumina na granulometria de 0.30 μm por 5 minutos. A modificação do GCE ocorreu via eletrossíntese empregando a técnica de voltametria cíclica (CV). Em uma célula eletroquímica de 50,0 mL foram utilizados HCl 0,5 mol L⁻¹, anilina 0,5 mol L⁻¹ e 0,02 mg L⁻¹ MWTC's. Os parâmetros eletroquímicos utilizados foram: janela de varredura de potencial (W) de -0,2 a 1,0 V vs Ag\AgCl (KCl_{sat}), durante 2 ciclos de varredura de potencial, velocidade de varredura (ν) de 15 mV s⁻¹, gerando um filme estável de polianilina (PANI) e nanotubos de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (MWTC's) na superfície do eletrodo (GCE/PANI-MWTC's). O preparo do eletrodo foi realizado sempre no dia da análise em temperatura ambiente (25 °C).

2.2.2 Estudos do eletrodo GCE/PANI-MWTC's vs estudos voltamétricos para determinação de tricaína

Com a finalidade de verificar a condução eletrônica promovida pelos MWTC's, foi avaliada a atividade dos eletrodos GCE/PANI e GCE/PANI-MWTC's, realizando uma análise comparativa via eletrotrossíntese de PANI diretamente sobre o eletrodo de GCE e em seguida via eletrossíntese de PANI e MWTC's sobre o eletrodo de CGE utilizando a técnica voltamétrica CV nas condições: eletrodo GCE/PANI (A) HCl 0,5 mol L⁻¹ e anilina 0,5 mol L⁻¹ e (B) GCE/PANI-MWTC's, em HCl 0,5 mol L⁻¹, MWTC's = 0,02 mg L⁻¹ e anilina 0,5 mol L⁻¹, ambos utilizando durante 2 ciclos sucessivos de varredura, janela de varredura de potencial de varredura (W) de -0,2V a +1,0V, ν = 15 mV s⁻¹.

Analisando a estabilidade do filme formado sobre o eletrodo GCE/PANI-MWTC's, foram realizadas 10 análises sucessivas, utilizando a técnica CV. Foi utilizada uma solução de K₃Fe(CN)₆ 0,001 mol L⁻¹ preparada em solução eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹. Os parâmetros eletroquímicos foram: janela de varredura de potencial de -0,5 a +1,0 V vs KCl_{sat}, ν de 50 mV s⁻¹.

Os parâmetros da técnica DPV foram otimizados de forma univariada: velocidade de varredura (v) no intervalo de 50 a 200 mV s^{-1} , amplitude de pulso (A_p) no intervalo de 50 a 300 mV s^{-1} e o tempo de pulso (t_p) no intervalo de 20 a 70 ms. Os dados considerados para cada otimização foram a relação de Intensidade de Corrente de Pico (I_{pa}) e Largura de Pico ($w_{1/2}$), sendo desejada a melhor relação entre maior I_{pa} e menor $w_{1/2}$ durante a análise do anestésico triclaína.

2.2.3 Caracterização do filme de PANI-MWTC's via Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman e Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

A PANI-MWTCs foi obtida por meio de eletrossíntese, utilizando a técnica de voltametria cíclica, a qual, em célula eletroquímica de 50,0 mL foram utilizados HCl 0,5 mol L^{-1} , anilina 0,5 mol L^{-1} e 0,02 mg L^{-1} MWTC's. Os parâmetros eletroquímicos utilizados foram: janela de varredura de potencial (W) de -0,2 a 1,0 V *vs* Ag\AgCl (KCl_{sat}), durante 50 ciclos de varredura de potencial, velocidade de varredura (v) de 15 mV s^{-1} . O produto gerado sobre o eletrodo (PANI-MWTCs) foi retirado e adicionado em uma pastilha de KBR e analisado utilizando a técnica espectrofotométrica na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) por meio de um espectrômetro Nicolet spectrometer (Nexus 470, Madison, WI). O espectro de FTIR foi registrado no modo de transmissão, com varredura de 4000 to 400 cm^{-1} e 2 cm^{-1} .

Para as análises de espectroscopia Raman, o preparado de PANI-MWTCs foi realizado de acordo com as descrição para FTIR, as análises de espectroscopias foram registradas em um Espectrômetro de Raman com Transformada de Fourier (RFS 100/S, Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha) excitados por um laser Nd:YAG a 1064 nm com resolução de 4 cm^{-1} .

As análises via EIS foram conduzidas utilizando o eletrodo de GCE/PANI-MWTC's. Os experimentos foram conduzidos no potencial de circuito aberto (OCP) obtido em uma solução 0,1 mol L^{-1} de KCl contendo 5,0 mmol L^{-1} do par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. A faixa de frequência variou de 106 a 10^{-2} Hz. Para garantir a linearidade da resposta impedimétrica, a amplitude RMS da perturbação senoidal foi definida como 10 mV. A linearidade foi verificada para todos os casos por meio da transformada de Kramers-Krönig ($\chi \leq 10^{-6}$).

2.3 Preparação das amostras de peixe e validação da metodologia analítica para a determinação de tricafina por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial

As amostras de filés de peixe de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) para determinação do anestésico tricafina foram fornecidas pelo Laboratório de Metabolismo de Peixes, Departamento de Zootecnia, Setor de Piscicultura da UFLA.

O processo de preparo da amostra dos filés de peixe foi adaptado de acordo com a metodologia descrita por Botrel *et al.* (2017). Foram pesados 2,00 g de filé de peixe, macerados e acondicionados em tubo falcon de fundo cônico (capacidade de 15,00 mL) e então, liofilizados (Labconco, Freezone 2.5). Em seguida, foi adicionado 13,00 mL de solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ (pH 7,0). A solução foi agitada em vortex (Mixer Vixar®) por 5 minutos e centrifugada a 356 rad s⁻¹ por 5 minutos. Para separar a gordura, o tubo foi levado ao congelador (-18 °C ± 2 °C) até completo congelamento, e após, esta gordura foi retirada. O extrato foi descongelado, filtrado em uma membrana com diâmetro 25 mm e tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore® Corporation, Bedford, EUA). O processo de congelamento permitiu a completa separação do extrato em duas fases (hidrofóbica e hidrofílica), uma vez que, a parte hidrofílica (mais densa) permaneceu completamente congelada enquanto a parte hidrofóbica (menos densa) adquiriu uma consistência particulada e gelatinosa, podendo ser facilmente removida por uma espátula, sem perdas da fase hidrofílica enriquecida com o analito.

Uma alíquota de 1,0 mL da parte hidrofílica foi transferida para a célula eletroquímica contendo 29,0 mL de solução tampão fosfato (pH 7,2) a 25 °C. Foi realizada uma análise prévia empregando o eletrodo GCE/PANI-MWTC's no extrato obtido a partir do filé de peixe sem a presença do anestésico e em seguida foram adicionadas sucessivas quantidades de solução de tricafina (4,61 x 10⁻⁸ a 1,13 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) (n = 6) usando o método de adição padrão. Para a validação da metodologia desenvolvida para determinação de tricafina, adotou-se as diretrizes da EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Foram avaliados os limites de detecção (LOD), e de quantificação (LOQ), sensibilidade, linearidade, exatidão e recuperação do método de extração.

A linearidade da curva analítica foi avaliada em triplicatas independentes em um intervalo de concentração de 4,00 x 10⁻⁵ a 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, analisando o padrão tricafina isoladamente, pela técnica DPV e analisando para o extrato obtido do preparado de amostra do filé de peixe enriquecido com as concentrações do anestésico tricafina.

O LOD foi avaliado por meio da análise de 10 replicatas de solução de tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ com pH 7,2. Os resultados de corrente foram realizados conforme a Equação 1.

$$LOD = (3 \times S)$$

(Equação 1)

em que S é o desvio padrão correspondente às leituras do branco.

O LOQ foi considerado como o menor ponto da curva de analítica. Para os ensaios de recuperação foram enriquecidas três amostras de peixes com concentrações diferentes de anestésico (4,00; 6,00 e 8,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹), as quais foram submetidos ao processo de extração. A taxa de recuperação foi obtida segundo a Equação 2 e a exatidão do método foi aferida a partir dos ensaios de recuperação.

$$\%Recuperação = \frac{\text{concentração medida}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

(Equação 2)

2.4 Instrumentação Analítica

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato IviumVertex 100mA (Ivium Technologies, Netherlands) interfaciado pelo software IviumSoft versão 2.403. Foi utilizada uma célula eletroquímica de 50,0 mL com arranjo de três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, carbono vítreo modificado (Metrohm, Switzerland) com área geométrica de 0,034 cm², um eletrodo auxiliar de fio de platina (Metrohm, Switzerland), um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl_{sat}) (Metrohm, Switzerland). Foi realizado polimento da superfície do eletrodo antes de cada medida eletroquímica por cerca de 3 minutos em feltro metalográfico, contendo suspensão de alumina com granulometria de 0,3 μm.

Todas as medidas de EIS foram obtidas utilizando um Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT204 da AUTOLAB equipado com o módulo FRA32M. Os procedimentos de simulação e ajuste do circuito equivalente proposto aos dados experimentais foram conduzidos utilizando o software NOVA 1.10 fornecido pela AUTOLAB. O bom ajuste do circuito foi verificado em todos os casos por meio do método CNLS ($\chi \leq 10^{-3}$).

Para as caracterizações de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado um espectrômetro Nicolet spectrometer (Nexus 470, Madison, WI). As análises de espectroscopia Raman foram registradas em um Espectrômetro de Raman com Transformada de Fourier (RFS 100/S, Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo do eletrodo GCE/PANI-MWTC's por impedância eletroquímica (EIS)

Foi avaliada a quantidade de número de ciclos de varredura de potencial para a eletrossíntese do eletrodo CGE/PANI-MWTC's. Todos os espectros foram obtidos na presença da sonda redox $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ (reação redox de esfera externa) mediante aplicação de um potencial d.c. igual ao potencial de circuito aberto (OCP) de +0,27 V. A Figura 1 representa os resultados obtidos da caracterização por EIS para o eletrodo GCE: diagramas de Nyquist (A1) e de Bode (A2). Os resultados em cinco ciclos de varredura de potencial para o eletrodo CGE/PANI-MWTC's podem ainda ser observados na Figura 1 (B1, C1, D1, E1 e F1) em relação aos diagramas de Nyquist e na Figura 1 (B2, C2, D2, E2 e F2) em relação aos diagramas de Bode.

Figura 1 - Diagramas de Nyquist (\circ) e Bode (\square) para os espectros de EIS obtidos a partir dos eletrodos de carbono vítreo (GCE) e eletrodo modificado GCE/PANI-MWTC's. Nyquist: A1 (GCE); B1 (1º ciclo); C1 (2º ciclo); D1 (3º ciclo); E1 (4º ciclo) e F1 (5º ciclo). Bode: A2 (GCE); B2 (1º ciclo); C2 (2º ciclo); D2 (3º ciclo); E2 (4º ciclo) e F2 (5º ciclo). Espectros obtidos em solução eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 5 mmol L⁻¹. Amplitude RMS = 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste do circuito aos dados experimentais e os pontos são os dados experimentais. (Continua)

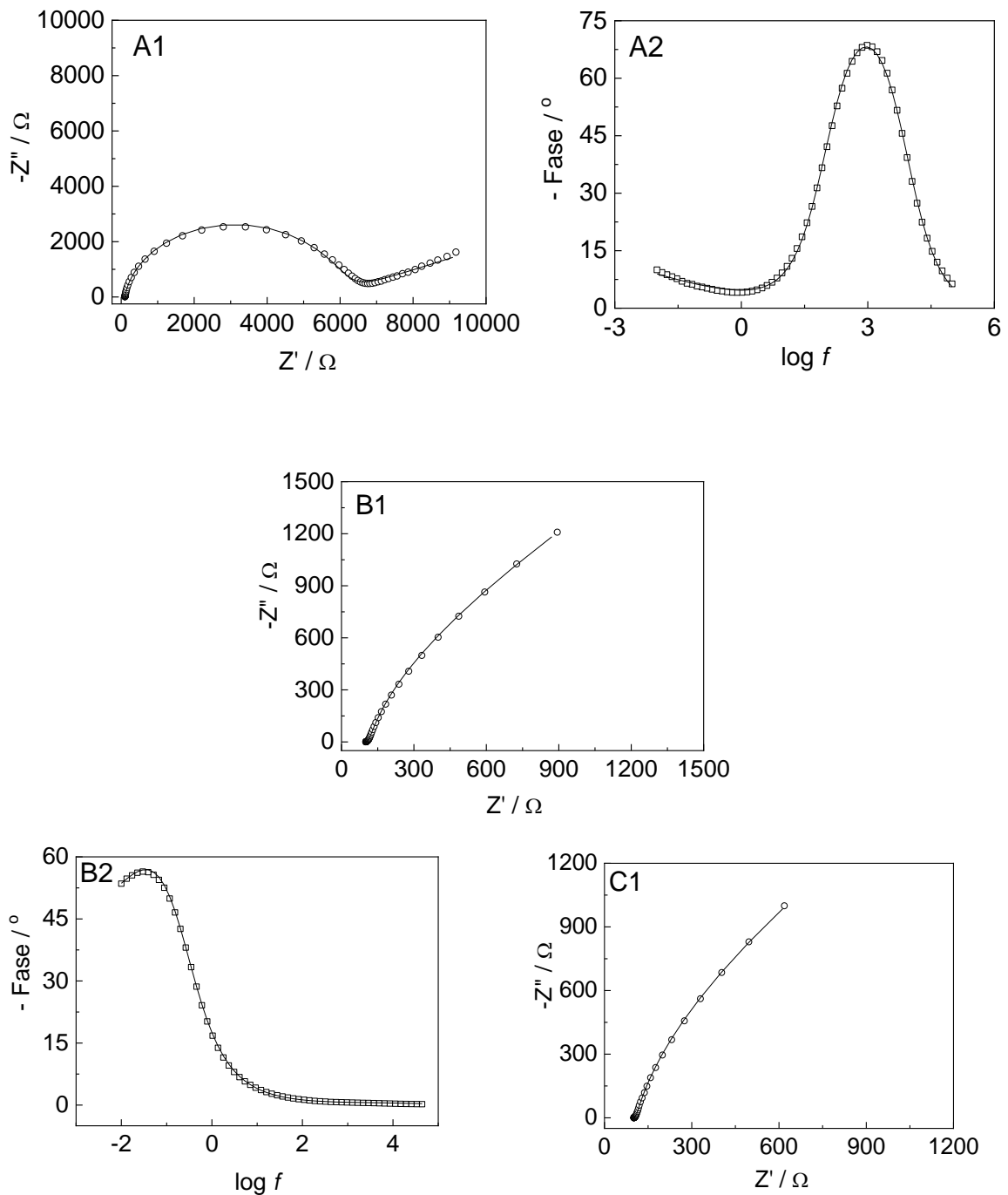


Figura 1 - Diagramas de Nyquist (\circ) e Bode (\square) para os espectros de EIS obtidos a partir dos eletrodos de carbono vítreo (GCE) e eletrodo modificado GCE/PANI-MWTC's. Nyquist: A1 (GCE); B1 (1º ciclo); C1 (2º ciclo); D1 (3º ciclo); E1 (4º ciclo) e F1 (5º ciclo). Bode: A2 (GCE); B2 (1º ciclo); C2 (2º ciclo); D2 (3º ciclo); E2 (4º ciclo) e F2 (5º ciclo). Espectros obtidos em solução eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 5 mmol L⁻¹. Amplitude RMS = 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste do circuito aos dados experimentais e os pontos são os dados experimentais. (Continua)

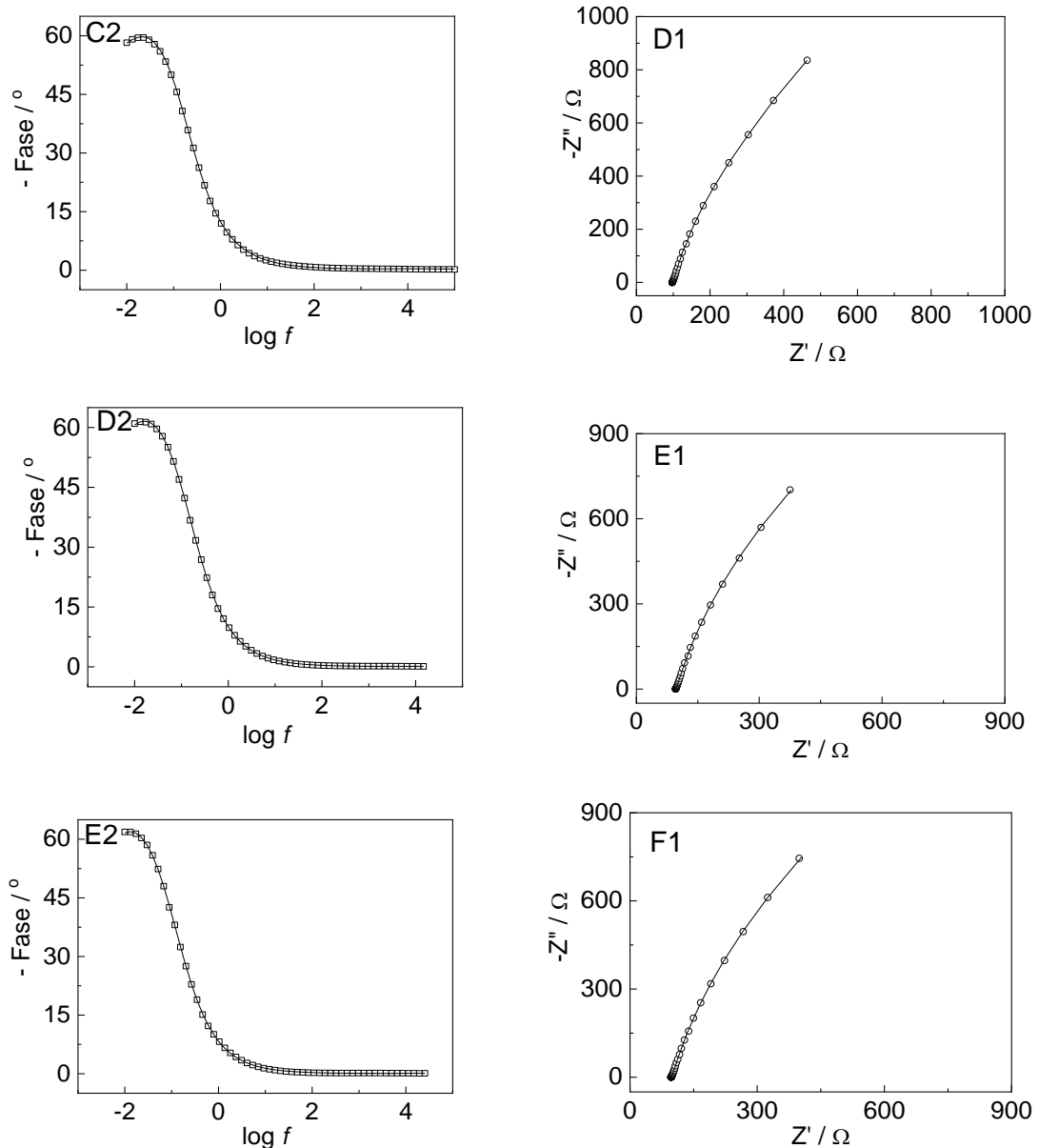
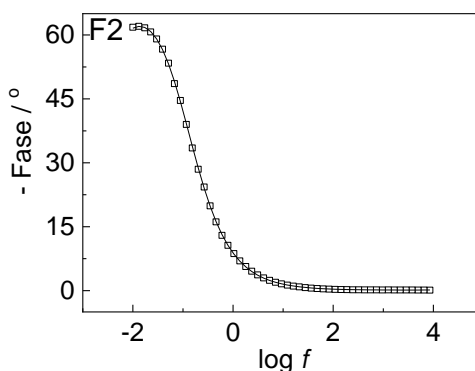


Figura 1 - Diagramas de Nyquist (\circ) e Bode (\square) para os espectros de EIS obtidos a partir dos eletrodos de carbono vítreo (GCE) e eletrodo modificado GCE/PANI-MWTC's. Nyquist: A1 (GCE); B1 (1º ciclo); C1 (2º ciclo); D1 (3º ciclo); E1 (4º ciclo) e F1 (5º ciclo). Bode: A2 (GCE); B2 (1º ciclo); C2 (2º ciclo); D2 (3º ciclo); E2 (4º ciclo) e F2 (5º ciclo). Espectros obtidos em solução eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 5 mmol L⁻¹. Amplitude RMS = 10 mV; Intervalo de Frequência: 10⁶ a 10⁻² Hz. As linhas sólidas representam o ajuste do circuito aos dados experimentais e os pontos são os dados experimentais. (Conclusão)

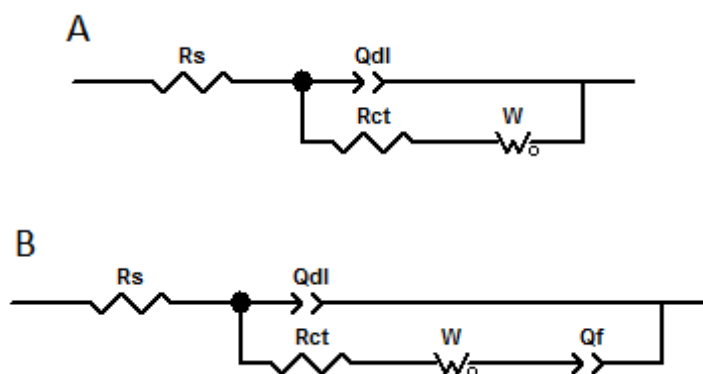


Fonte: Do autor (2018)

De acordo com a teoria de EIS um sistema quase-reversível é caracterizado pela presença no plano complexo de um semicírculo conectado a um segmento linear com inclinação de 45^o (reta de Warburg). Como esperado, este comportamento foi encontrado para o eletrodo sem modificação (GCE) (Figura 1A e 1B) e o modelo teórico de Randles foi descrito pelo circuito elétrico equivalente (Figura 1A), sendo o mais recomendado para representar, no domínio da frequência, o comportamento de reações redox de esfera externa, ou seja, processos eletroquímicos ocorrendo na interface eletrodo/solução na ausência de complicações cinéticas decorrentes da adsorção de espécies do eletrólito e/ou de intermediários de reação.

Este circuito elétrico (Figura 2A) consiste em um elemento ôhmico representando a resistência não compensada da solução (R_S), seguido por um arranjo em paralelo de elementos capacitivo (Q_{DL}), resistivo (R_{CT}) e difusivo (W). Enquanto os elementos Q_{DL} e R_{CT} são representativos da pseudo-capacitância interfacial e da resistência de transferência de carga no potencial de equilíbrio, respectivamente, o elemento W representa o fenômeno da difusão linear semi-infinita ocorrendo na interface eletrodo/solução considerada como sendo plana.

Figura 2 - Modelos de circuitos equivalentes propostos para o ajuste aos dados experimentais.



Fonte: Do autor (2018)

Entretanto, as plataformas GCE/PANI-MWTC's apresentaram um comportamento completamente distinto daquele observado no eletrodo GCE sem a modificação (Figura 1B1 a 1F2). Observa-se pelo plano complexo uma supressão do semicírculo presente para o GCE não modificado. Este comportamento pode estar associado às propriedades condutoras do PANI aliados ao MWTC's amplamente discutidos na literatura (LVOVICH, 2009; SARAC; ATES; KILIC, 2008).

Um circuito para tratamento quantitativo de eletrodos modificados com PANI foi proposto por Babaiee, Pakshir e Hashemi (2015) e está representado na Figura 2B. Este consiste em um elemento ôhmico representando a resistência não compensada da solução (R_s), seguido por um arranjo em paralelo de elementos capacitivo (Q_{DL}), resistivo (R_{CT}) representativos da pseudo-capacitância interfacial e da resistência de transferência de carga em que, em série ao elemento resistivo, tem-se o elemento de Warburg (W) representando a difusão de contra íons através do filme seguido de um elemento capacitivo (Q_F) que representa o efeito de pseudo-capacitância do filme formado.

Os valores dos diferentes parâmetros dos circuitos equivalentes propostos, obtidos a partir da simulação numérica estão reunidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros obtidos via simulação e ajuste aos dados experimentais para os GCE e GC/PANI-MWTC's e seus ciclos correspondentes.

Parâmetro	Eletrodos					
	GCE	GC/PANI-MWTC's 1 ciclo	GC/PANI-MWTC's 2 ciclos	GC/PANI-MWTC's 3 ciclos	GC/PANI-MWTC's 4 ciclos	GC/PANI-MWTC's 5 ciclos
R_s / Ω	102	99,2	99,2	92,5	88,5	89,4
R_{CT} / Ω	$5,57 \times 10^3$	4,70	3,26	4,62	7,31	7,6
$Q_{DL} / \Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^n$	$4,50 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,87 \times 10^{-3}$	$8,93 \times 10^{-4}$	$6,85 \times 10^{-6}$	$7,29 \times 10^{-6}$
n_{DL}	0,95	0,46	0,44	0,29	0,22	0,24
$W / \Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^5$	$5,42 \times 10^{-6}$	$13,1 \times 10^{-3}$	$26,1 \times 10^{-3}$	$65,6 \times 10^{-3}$	$89,9 \times 10^{-3}$	$76,5 \times 10^{-3}$
$Q_F / \Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^n$	—	$4,83 \times 10^{-3}$	$8,39 \times 10^{-3}$	$12,0 \times 10^{-3}$	$15,1 \times 10^{-3}$	$14,0 \times 10^{-3}$
n_F	—	0,99	0,99	0,95	0,93	0,94
χ^2	$9,9 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-4}$

Fonte: Do autor (2018)

Todos os dados apresentados possuem boa consistência visto que χ^2 se manteve na ordem de 10^{-3} a 10^{-4} . Uma vez que a RCT obtida no OCP atua como uma medida indireta da densidade de corrente de troca ($I_o = RT/nFRCT$) para a reação redox de esfera externa na interface eletrodo/solução modificada, os resultados obtidos indicam que a presença do PANI-MWTC's sobre a superfície dos eletrodos que influencia diretamente na transferência eletrônica na interface eletrodo/solução (KONDAWAR; DESHPANDE; AGRAWAL, 2012). Para todos os eletrodos modificados houve uma redução na RCT na ordem de 10^3 , o que confirma a necessidade de modificação do GCE utilizando PANI-MWTC's, o qual atua como mediador na troca de elétrons do par redox.

Adicionalmente, observou-se um aumento na impedância difusional de contra íons através do filme (W), assim como um aumento da pseudo-capacitância do filme (Q_F). Estes resultados indicam que a quantidade de ciclos de potencial durante a polimerização do PANI-MWTC's influencia diretamente na espessura do filme, uma vez que o parâmetro Q_F é diretamente proporcional a este parâmetro, além disso, filmes mais espessos tendem a apresentar maior impedância difusional (W) (INZELT, 2012).

Em relação ao número de ciclos de varredura de potencial no eletrodo GC/PANI-MWTC foi possível observar que houve um aumento de I_p , com pequeno deslocamento de E_p e baixo valor de $W_{1/2}$ com até 4 ciclos de varredura de potencial e então, uma discreta variação entre os parâmetros (I_p , E_p e $W_{1/2}$) com 5 ciclos. Como esta variação foi muito pequena, pode-se inferir que após 4 ciclos não exista um crescimento significativo da cadeia polimérica.

Apesar de, em até 4 ciclos, ter ocorrido um discreto aumento da cadeia polimérica, foi importante avaliar a relação da espessura do filme formado em função da sensibilidade

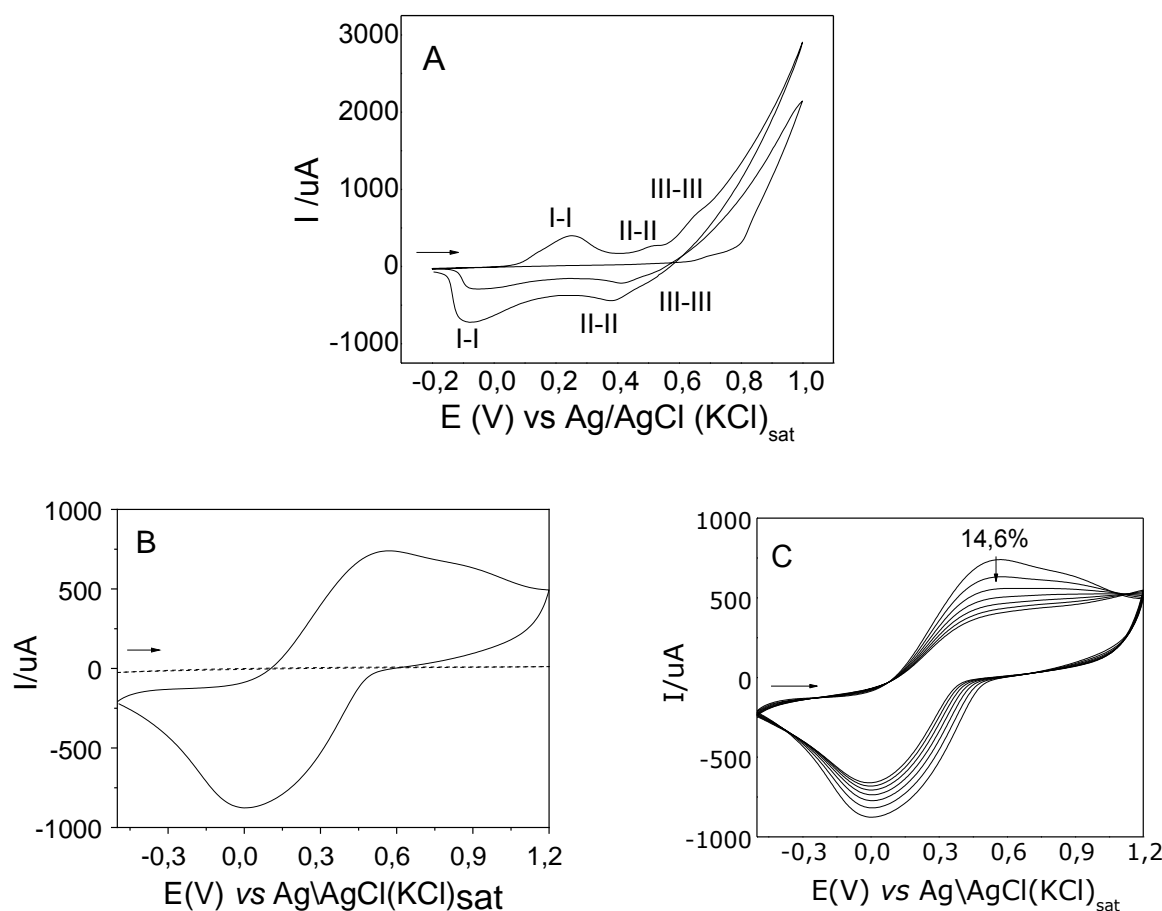
eletroquímica obtida em cada um dos ciclos. Assim, foi avaliada a formação do filme de PANI-MWTC's sobre a superfície de GCE por meio dos voltamogramas em cada ciclo, seguido pela análise da sensibilidade eletroquímica realizando a leitura em solução de ferrocianeto de potássio $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A completa polimerização de GCE/PANI-WMTC's ocorreu a partir do 2º ciclo de varredura cíclica de potencial, aumentando a quantidade de carga até 5 ciclos de varredura de potencial.

As melhores leituras eletroquímicas (ferrocianeto de potássio $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) utilizando a modalidade CV, foram obtidas com 2 e 3 ciclos de formação do eletrodo de CGE/PANI-WMTC's. Entretanto, ao utilizar 2 ciclos de varredura potencial durante a modificação do eletrodo, para a formação do filme, houve maior sensibilidade e resolução de pico, com boa relação de reprodutibilidade, sinal analítico e durabilidade do filme. De acordo com a literatura, a utilização de filmes mais finos facilita a troca de elétrons com a solução (DRESSELHAUS; ENDO, 2001).

3.2 Modificação do eletrodo GCE/PANI-WMTC's

A Figura 3A demonstra o perfil eletroquímico do eletrodo GCE/PANI-MWTC's eletrossintetizados em solução eletrólito HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 3 - (A) Perfil voltamétrico utilizando a técnica voltametria cíclica da eletrossíntese da modificação do eletrodo GCE com PANI-MWTC's, em HCl 0,5 mol L⁻¹, MWTC's = 0,02 mg L⁻¹ e anilina 0,5 mol L⁻¹. Parâmetros eletroquímicos: 2 ciclos sucessivos de varredura, na janela de potencial de -0,2V à +1,0V, $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Perfil eletroquímico de uma solução de K₄Fe(CN)₆ 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em solução eletrólito KCl 0,10 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$, $w = -0,5$ a +1,2 V utilizando eletrodo (---) GCE (—) GCE/PANI-MWTC's. (C) Perfil eletroquímico de uma solução de K₄Fe(CN)₆ 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹ durante 10 varreduras sucessivas utilizando a modalidade CV, nas condições $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $w = -0,5$ a +1,2 V, com eletrodo modificado GCE/PANI- MWTC's.



Fonte: Do autor (2018)

O perfil voltamétrico da eletrossíntese de GCE/PANI (Figura 3A) apresentou seis possíveis processos redox, denominados I-I, II-II e III-III. Os processos redox principais ocorrem em I-I e III-III, responsáveis pelas reações de interconversão da PANI em seus estados de oxidação leucoesmeraldina/esmeraldina e esmeraldina/pernigranilina, respectivamente. O par redox II-II, produto do polímero em um estado mais oxidado, aparece geralmente com baixa intensidade de corrente de pico (MATTOSO, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2012).

O eletrodo o GCE/PANI- MWTC's apresentou melhor resolução de pico e maior intensidade de corrente de pico (I_p) em relação ao eletrodo GCE (Figura 3B), evidenciando a

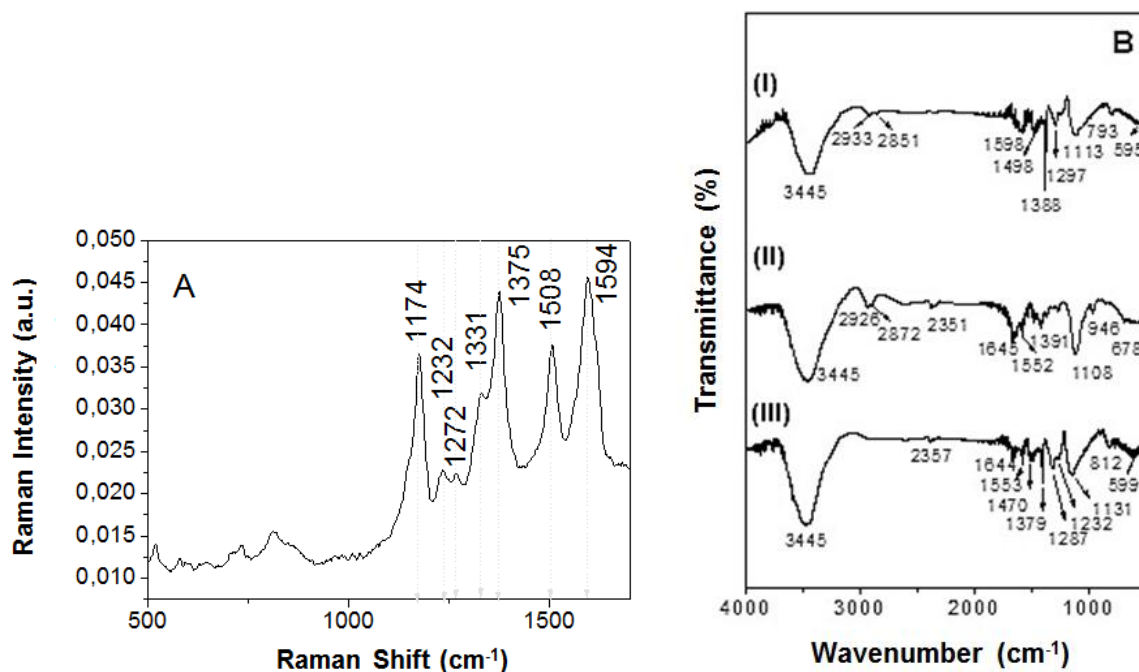
necessidade de modificação do eletrodo. No eletrodo GCE/PANI- MWTC's a relação de intensidade de corrente de pico anódico (I_{pa}) sobre a intensidade de corrente de pico catódico (I_{pc}) foi próxima de 1, demonstrando que o processo de transferência de elétrons ocorre de forma completamente reversível, durante a oxirredução da solução de $K_4Fe(CN)_6$ ($1,00 \times 10^{-3}$ mmol L⁻¹) em solução eletrólito KCl ($0,10$ mol L⁻¹) (BARD; STRATMANN; URWIN, 2003; JINLEI *et al.*, 2010).

Durante os estudos de análise de varreduras sucessivas em solução $K_4Fe(CN)_6$, empregando o eletrodo GCE/PANI- MWTC's (Figura 3C), foi possível observar que o uso de MWTC's gerou uma estabilidade no processo redox do $K_4Fe(CN)_6$. Entre o primeiro e o segundo ciclo, houve perda de intensidade de I_p de aproximadamente 14,6%. Para os demais ciclos, a perda de I_p foi menor que 10%. A adição de MWTC's em combinação com o polímero condutor PANI, gerou um incremento na intensidade de corrente de pico, diminuindo a intensidade de corrente de pico nos processos redox II-II, suprimindo os processos redox em III-III, evidenciando o efeito sinérgico MWTC's e PANI durante a eletrossíntese, facilitando o estado sal esmeraldina do polímero. (GAJENDRAN; SARASWATHI, 2008; LISBOA *et al.*, 2020; SALVATIERRA *et al.*, 2012, 2013; SALVATIERRA; OLIVEIRA; ZARBIN, 2010)

3.3 Caracterizações do filme de PANI-MWTC's

As Figuras 4A e 4B demonstram os resultados das análises de deslocamento Raman e infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para o filme de PANI-MWTC's eletrossintetizado sobre o eletrodo GCE nas condições experimentais: anilina e HCl $0,5$ mol L⁻¹, MWTC's $0,02$ mg L⁻¹, janela de varredura de potencial (W) $-0,2$ V a $1,0$ V vs KCl_{sat} e $\nu = 15$ mV s⁻¹.

Figura 4 - (A) Espectros Raman ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) de PANI-MWTC's; (B) Espectros na região do infravermelho entre $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ do (I) PANI, (II) MWTC's e (III) PANI-MWTC's.



Fonte: Do autor (2018)

As análises por espectroscopia Raman foram empregadas para analisar as possíveis interações entre PANI- PANI-MWTC's, como demonstrado na Figura 4. Observou-se que a eletrossíntese favoreceu uma reação de polimerização e formação de sal esmeraldina apresentando bandas características (Figura 4A) que podem ocorrer nas regiões entre: 1160/1174 ($\nu\text{C-H}$ dos segmentos semiquinônicos, atribuídos curvatura C-H do anel quinóide / benzenóide), dupletos 1331/1375 ($\nu\text{C-N}^+$, atribuído aos radicais cátions), 1506/1508 ($\nu\text{C-N}$ dos segmentos quinônicos), 1594 ($\nu\text{C-C}$ dos segmentos quinônicos). Esses grupos constatados no Raman indicam formação e presença do estado sal esmeraldina corroborando com a literatura (PANI-ES) (CHEN *et al.*, 2019; RABIA *et al.*, 2018; TAGOWSKA; PAŁYS; JACKOWSKA, 2004; WU; LIN; LIAO, 2005). As conclusões derivadas da espectroscopia Raman foram condizentes com os estudos de espectroscopia FTIR.

Foi possível observar as bandas características da formação de análises de FTIR em relação à PANI na forma condutora de sal esmeraldina, correlacionando com os dados presentes na literatura (CHEN *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2006; RABIA *et al.*, 2018). A Figura 4B demonstra os espectros de FTIR de (I) PANI, (II) MWTC's e (III) PANI-MWTC's. Durante a análise de PANI (Figura 4B-I), os dados obtidos corroboram com os dados de deslocamento Raman.

As bandas características encontradas para a formação de PANI (Figura 4B-I) no estado esmeraldina são: região de 3411-3445 cm^{-1} (deformação axial de -NH) e na região de 2367 - 3035 cm^{-1} (estiramento -C-H). Em 1645/1598/1552/1553 cm^{-1} as características são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ de anéis quinoides e 1498/1388 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de anéis benzoides. As regiões de 1297 cm^{-1} (estiramento C-N), 1113 cm^{-1} (estiramento C-O simétrico) e 793 - 946 cm^{-1} (grupamento -CH de anéis benzênicos).

O espectro de infravermelho de MWTC's (Figura 4B-II) apresentou uma banda em 1645 cm^{-1} , correspondente à vibração C=C de carbono com hibridização sp^2 (NASCIMENTO *et al.*, 2006; RABIA *et al.*, 2018; SILVERSTEIN *et al.*, 1979).

Foi observada durante a eletrossíntese de PANI-MWTC's, a formação no estado de maior condução eletrônica, sal esmeraldina (Figura 4B-III). Corroborando com os dados obtidos por Sharma *et al.* (2020), com pico de proeminência próximos à região de 1133 cm^{-1} , picos poucos deslocados, pois existe a presença de elétrons deslocalizados durante a eletrossíntese com MWCNT (PANI- MWTC's).

Corroborando com os estudos Sharma *et al.* (2020), picos importantes também observados, como 3411 cm^{-1} , que é atribuído à água absorvida e ao modo de alongamento O-H dos grupos carboxila no CNT funcionalizado, os quais ocorrem devido ao alongamento dos grupos C-H em CH_2 e CH_3 .

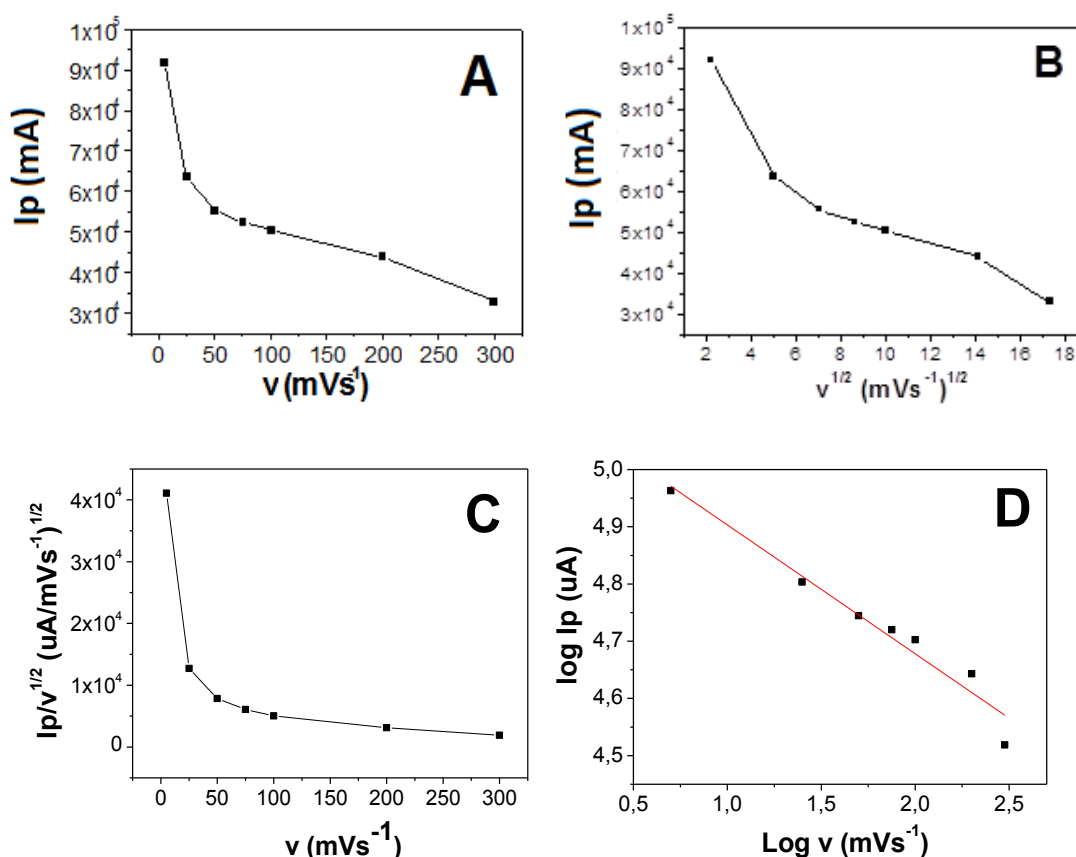
Além disso, uma mudança contínua do número de onda em direção limite inferior é observado com o aumento da concentração de dopagem de MWCNT na estrutura de nanocompósitos que desenvolve uma forte interação entre a estrutura conjugada de anéis quinoides de PANI e as superfícies de MWCNT ligadas por p. Essas varreduras de FTIR também afirmam que as nanopartículas MWCNT são embaladas espacialmente com moléculas de PANI (CHEN *et al.*, 2019).

Desta forma, fica evidente por meio das caracterizações espectroscópicas que durante o processo de eletrossíntese de PANI-MWTC's sobre o eletrodo GCE ocorre a formação de pólaron. A utilização MWTC's aumenta a condução eletrônica durante o processo de eletrossíntese e favorece o estado da PANI em sua forma de maior condução eletrônica (sal esmeraldina), assim conferindo estabilidade ao sistema eletroquímico (LISBOA *et al.*, 2020; MEDEIROS *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2006; RABIA *et al.*, 2018).

3.4 Natureza do processo eletródico do eletrodo GCE/PANI-MWTC's

Na figura 5 (A-D) foi avaliada a resposta voltamétrica do eletrodo GCE/PANI-MWTC's em função da v no intervalo de 5 a 300 mVs^{-1} , utilizando a técnica voltamétrica cíclica, considerando os estudos realizados por Nicholson e Shain (1964).

Figura 5 - (A) Variação da intensidade de corrente de pico em função da velocidade de varredura; (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função da intensidade de corrente de pico; (C) Intensidade de corrente de pico sobre a raiz quadrada da velocidade de varredura em função da velocidade de varredura e, (D) Função logarítmica da velocidade de varredura em função da velocidade logarítmica da intensidade de corrente de pico.



Fonte: Do autor (2018)

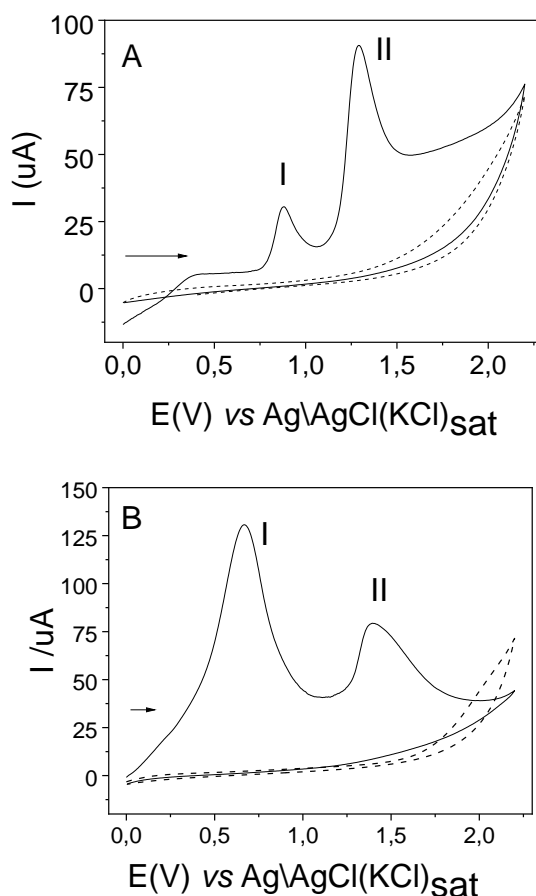
Durante todo o estudo da v (Figura 5A) foi possível observar a dependência em função de I_p . De acordo com os estudos de Nicholson e Shain (1964), I_p tende a variação linear com $v^{1/2}$ (Figura 5B), mas não passa pela origem, para relações lineares ou que tendem a linearidade de $I_p/v^{1/2}$ em função v (Figura 5C), os processos redox ocorrem de forma quase-reversível, com reações químicas acopladas à transferência de carga, esse fato evidencia a natureza do processo de transferência de massa por adsorção. A análise da relação entre \log de I_p em função do \log

de v (Figura 5D) mostrou um comportamento que tende a linearidade, mas que não passa pela origem, resultando em um comportamento não linear com $\log(i)/\log(v)$, ressaltando o processo controlado por adsorção. Tais informações são evidentes quando se realiza a varredura sucessiva de ciclos, onde a cada novo ciclo ocorre o aumento da intensidade de corrente de pico (BARD; STRATMANN; URWIN, 2003; JINLEI *et al.*, 2010).

3.5 Estudo voltamétrico da tricaína

A tricaína foi analisada no intervalo de 0,00 a +2,00 V vs Ag/AgCl(KCl_{sat}), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, em solução eletrólito tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 7,2, comparando o eletrodo GCE (Figura 6A) e o eletrodo GCE/PANI-MWTC's (Figura 6B).

Figura 6 - (A) Voltamogramas cíclicos de solução de tricaína ($0,127 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução eletrólito tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (---), pH = 7,2; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (A) GCE, tricaína (—) solução eletrólito fosfato (--) e (B) GCE/PANI- MWTC's tricaína (—) solução eletrólito fosfato (--).



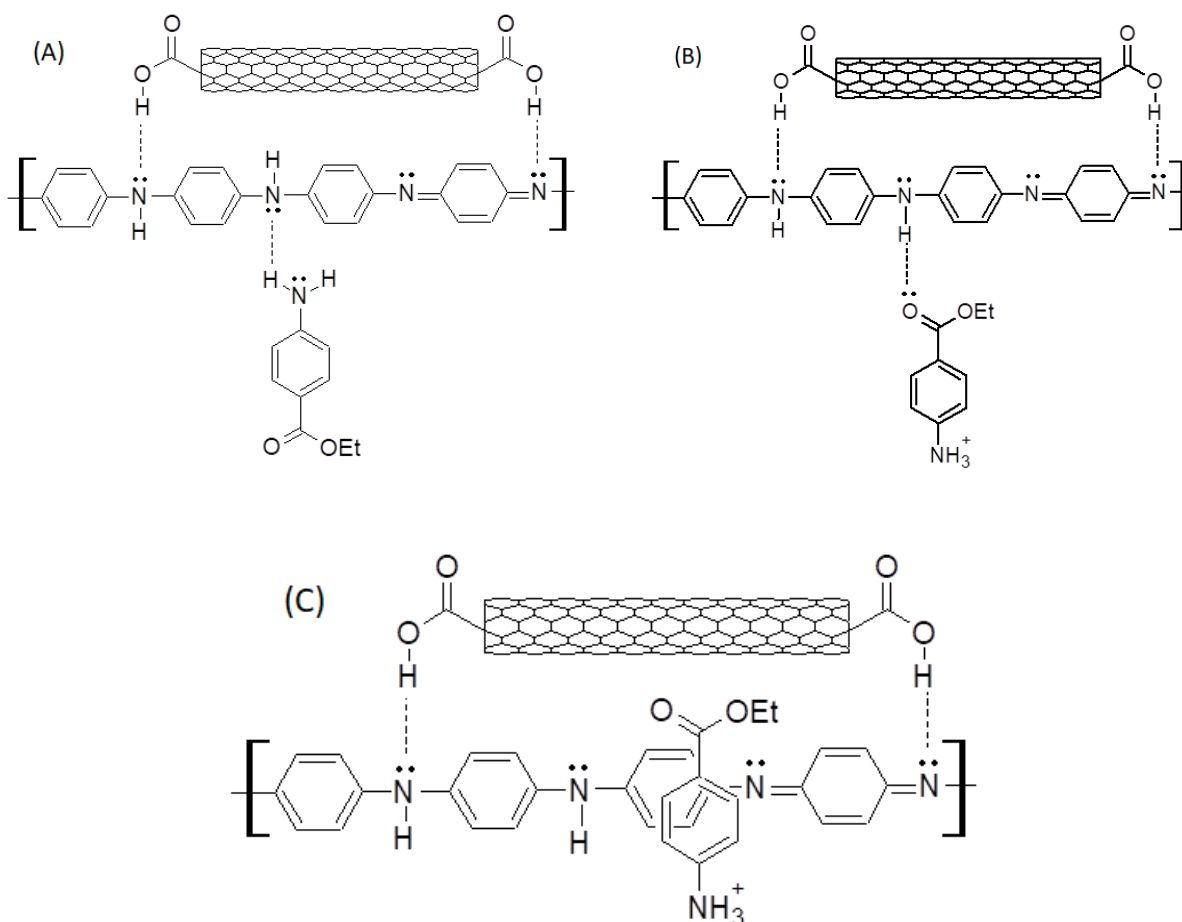
Fonte: Do autor (2018)

A Figura 6 demonstra que em ambos os eletrodos ocorre a oxidação da tricafina. No eletrodo GCE (Figura 6A) ocorrem dois processos anódicos, nos potenciais de 0,8V (pico I) e 1,3V (pico II) vs Ag/AgCl(KCl_{sat}) enquanto que no eletrodo GCE/PANI- MWTC's (Figura 7B), os processos anódicos ocorrem nos potenciais 0,7V (pico I) e 1,3V (pico II) vs Ag/AgCl(KCl_{sat}).

No eletrodo GCE/PANI-MWTC's ocorre um incremento na relação intensidade de corrente de pico e menor largura de pico, demonstrando maior sensibilidade na análise perante anestésico. O pico I apresentou maior incremento na intensidade de corrente de pico comparado ao pico II, e um deslocamento para potenciais mais positivos em 0,1V vs Ag/AgCl(KCl_{sat}) quando comparado às análises com GCE.

Considerando as possíveis interações entre as estruturas da de PANI, MWTC's e o anestésico tricafina, foram propostos três diferentes mecanismos de interação, representados na Figura 7 (A, B e C).

Figura 7 - Proposta de mecanismo de interação entre PANI-MWTC's-Tricafina.



Fonte: Do autor (2018)

Na Figura 7A, está representada uma possibilidade de interação por ligação de hidrogênio pelo grupo amina ($R-NH_2$), entre PANI-tricaína. Já para a interação entre PANI e MWTC's o mais provável é que essa interação ocorra por meio dos pares de elétrons não ligantes da PANI e os hidrogênios ionizáveis dos grupos carboxílicos presentes nas unidades de MWTC's. Essa ligação com outro átomo se estabelece devido à carga parcial positiva do hidrogênio, aceitando um par eletrônico (ligação covalente coordenada), explicada principalmente pelas forças dipolo-dipolo. No caso destas interações, o par de elétrons compartilhado está na PANI, no átomo de nitrogênio (mais eletronegativo).

Na Figura 7B, propõe-se que a interação ocorra por ligação de hidrogênio por meio do grupamento éster ($R-COOR'$), caso o grupo amino esteja em pH favorável à sua protonação, o que o torna um grupamento não nucleofílico. Tal como descrito anteriormente, a ligação de hidrogênio será forte, devido à carga parcialmente positiva do hidrogênio, a qual aceita um par eletrônico. Entretanto, a interação descrita entre PANI-tricaína, ocorrerá entre o átomo de hidrogênio e o grupamento éster, onde o par de elétrons compartilhado está na tricaína, no átomo de oxigênio (mais eletronegativo).

Uma terceira provável interação nesse sistema pode ser visualizada na Figura 7C, o qual a interação entre PANI-MWTC's pode ocorrer conforme descrito anteriormente, porém a interação entre PANI-Tricaína ocorreria por interação π - π . Neste tipo de atração, ocorre uma interação não covalente entre anéis aromáticos, por meio da interpenetração de orbitais atômicos (do tipo p) incompletos no eixo paralelo.

3.6 Validação da metodologia

Utilizando a técnica voltamétrica pulso diferencial, foi realizada a otimização dos parâmetros eletroquímicos para a análise do anestésico tricaína, de forma univariada, considerando a melhor relação entre I_{pa} vs $w_{1/2}$, as condições utilizadas foram: $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 2 \text{ ms}$. Observou-se que quanto maior a v e A_p menor deverá ser t_p .

Assim, foi realizada a construção da curva de calibração para a detecção do anestésico sem a presença da amostra de peixe (Figura 8A) a fim de verificar a sensibilidade do eletrodo GCE/PANI-MWTC's. As análises foram realizadas por meio de adições sucessivas de tricaína em solução eletrólito tampão fosfato (pH 7,2), 25°C. Em seguida foi utilizado o método de padronização externa com adições sucessivas de tricaína na mistura de extrato de peixe (1 mL) e solução eletrólito tampão fosfato (pH 7,2), 25°C, conforme a Figura 8B.

Para verificar a linearidade da metodologia desenvolvida a fim de realizar a análise residual de tricaína em filés de peixe. Os voltamogramas gerados possuem deslocamento de potencial de pico em $\pm 0,1\text{V}$. O intervalo linear do trabalho para ambas as curvas foi de $4,61 \times 10^{-8}$ a $1,13 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 6$).

Figura 8 - (A) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (—) adições sucessivas de solução de tricaína. (B) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo extrato de filé de peixe obtido durante o procedimento de extração; (—) adições sucessivas de solução de tricaína. Análises realizadas utilizando a técnica DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 20 \text{ ms}$. Em detalhes: regressão linear da curva analítica. (Continua)

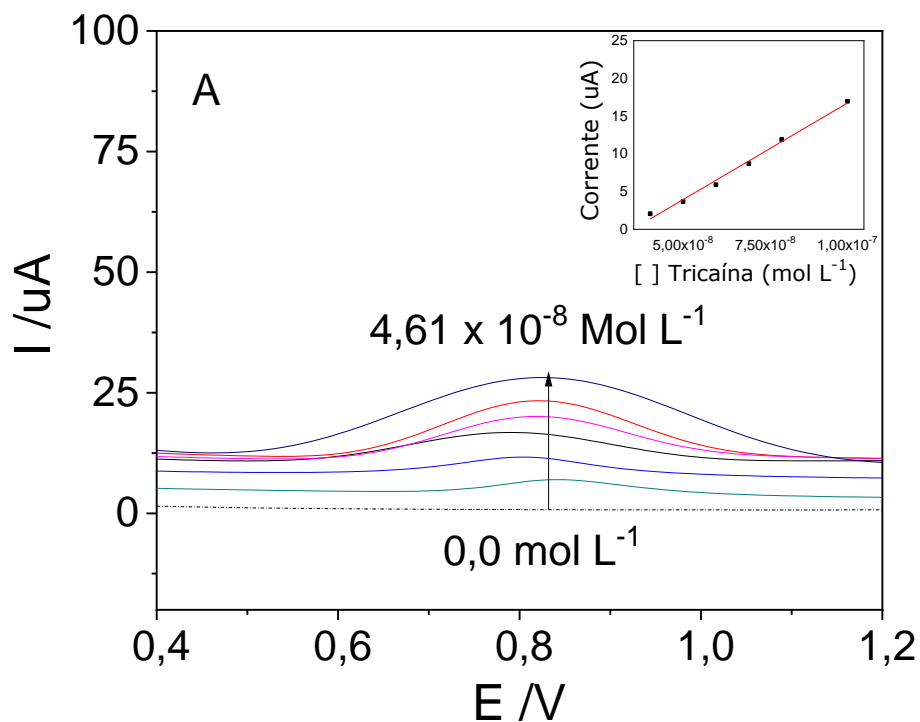
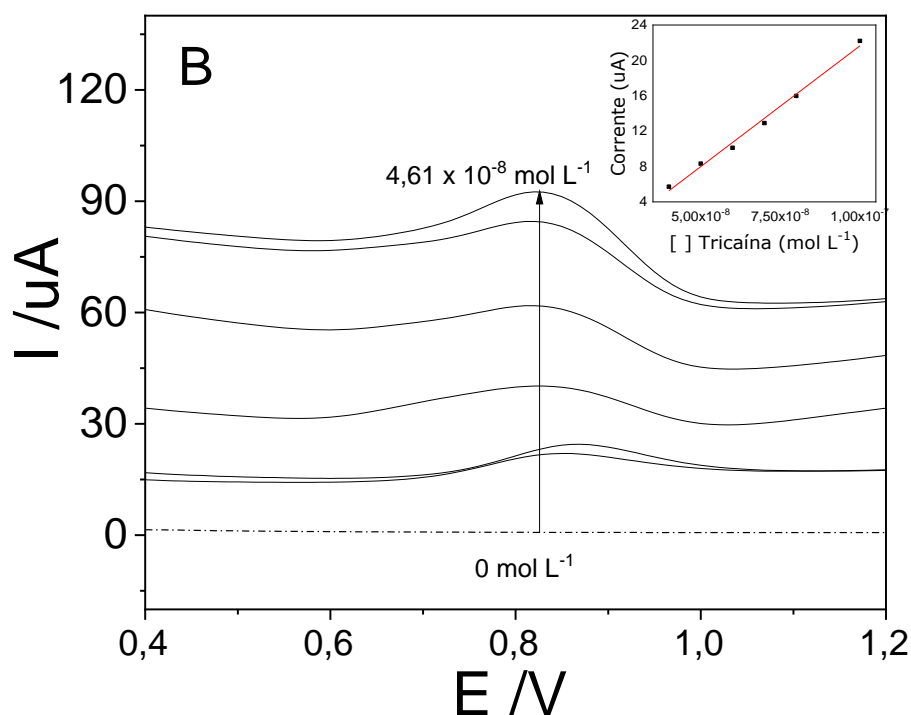


Figura 8 - (A) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (—) adições sucessivas de solução de tricaína. (B) (---) Voltamograma da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo extrato de filé de peixe obtido durante o procedimento de extração; (—) adições sucessivas de solução de tricaína. Análises realizadas utilizando a técnica DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 20 \text{ ms}$. Em detalhes: regressão linear da curva analítica. (Conclusão)



Fonte: Do autor (2018)

A equação da curva analítica foi calculada pelo método de regressão linear por meio da medida dos sinais analíticos (corrente/ μA) em função de crescentes concentrações (mol L^{-1}) de tricaína. Foram considerados os picos anódicos em $0,8\text{V}$ ($\pm 0,1\text{V}$). Os valores obtidos na equação da reta foram $-3,291$ para inclinação e $2,309$ para a intercessão da linha padrão. O coeficiente de correlação foi de $0,9924$, demonstrando boa correlação entre as concentrações adicionadas e as correntes aferidas. Os LOD e LOQ foram calculados de acordo com os parâmetros da curva analítica, e os resultados foram $2,08 \times 10^{-8}$ e $4,61 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Para as análises de recuperação e exatidão os filés de peixe foram fortificados com três concentrações diferentes, separadamente. Para a amostra fortificada com uma concentração de $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a taxa de recuperação foi de $94,0\%$, assim como para as amostras de $6,0 \times 10^{-8}$ e $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, com $92,0$ e $91,0\%$ de recuperação, respectivamente. Foi possível observar que a metodologia possui boa seletividade, uma vez que não existe nenhum outro pico de oxidação respondendo com o anestésico tricaína. Os resultados obtidos nestas análises foram

realizados de acordo com as recomendações da agência reguladora EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014).

Neste método de extração foi utilizada uma solução tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, o que gerou um aumento da força iônica no meio. Além disso, os procedimentos adotados minimizaram o efeito da gordura na amostra de tecido de peixe sobre o sinal eletroquímico, tornando-se eficiente para a aplicação nas análises envolvendo amostras biológicas provenientes do setor de aquicultura.

CONCLUSÃO

Foi possível realizar o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de tricaína no filé do pescado empregando um sensor de GCE\PANI-MWTC's. Para isso foi utilizado um preparo de amostra empregando uma solução tampão fosfato, e as leituras eletroquímicas foram realizadas utilizando a técnica DPV. A tricaína apresentou um comportamento de oxidação irreversível com um pico anódico em 0,7 V com deslocamento de até $\pm 0,14$ V. O eletrodo modificado demonstrou eficácia nas varreduras eletroquímica, com boa relação entre o potencial de corrente de pico e intensidade de corrente de pico. A melhor relação de I_{pa} foi obtida com a voltametria de pulso diferencial, com as condições em $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 20 \text{ ms}$. O método apresentou limites de detecção de $2,08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e de quantificação de $4,61 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação de 0,9905, para determinação de tricaína. O método de extração apresentou eficiência na extração da tricaína do filé de peixe com recuperação de $90\% \pm 4\%$. O eletrodo modificado GCE\PANI-MWTC's foi caracterizado por espectroscopia por impedância eletroquímica (EIS), demonstrando que em cada novo ciclo de varredura de potencial ocorre a formação de nova cadeia polimérica, entretanto, com melhores resultados para ser empregado como sensor eletroquímico utilizando 2 ciclos de varredura de potencial.

Foram realizados testes em ferrocianeto de potássio e os melhores resultados foram entre sinal analítico e espessura do filme. Além disso, de acordo com as possíveis interações entre as estruturas da polianilina (PANI), nanotubo de carbono funcionalizado com ácido carboxílico (MWTC's) e o anestésico tricaína, foram propostos três diferentes possíveis mecanismos de interação. Sendo uma interação por ligação de hidrogênio pelo grupo amino (R-NH_2), entre PANI-MWTC's e PANI-Tricaína. Outra interação por ligação de hidrogênio pelo grupamento éster ($\text{R-COOR}'$), caso o grupo amino esteja em pH favorável à protonação, e uma última provável estrutura de ligação, por interações π - π .

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the Cordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Rede Mineira de Química (RQ-MG) financed by the Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support. The authors are grateful for Departamento de Zootecnia (DZO) for the

donation of the fish samples, the Departamento de Química (DQI/UFLA), Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE), Laboratório de Análises Físico Químicas de Aguardente de Cana, Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Diamantina, Minas Gerais, Brasil) by electrochemical impedance spectroscopy analysis.

REFERENCES

- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v. 14, n. 3, p. 203-210, 2015.
- BABAIEE, M.; PAKSHIR, M.; HASHEMI, B. Effects of potentiodynamic electropolymerization parameters on electrochemical properties and morphology of fabricated PANI nanofiber/graphite electrode. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 199, p. 110–120, Jan. 2015.
- BARD, A. J.; STRATMANN, M.; URWIN, P. R. **Instrumentation and electroanalytical chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 679 p.
- BHADRA, S. *et al.* Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 34, n. 8, p. 783-810, Aug. 2009.
- BONASTRE, O. M. C. *et al.* The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, Amsterdam, n. 433, p. 491–495, Sept. 2014.
- BOTREL, B. M. C. *et al.* Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC-MS. **Food Chemistry**, London, n. 229, p. 674-679, Aug. 2017.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2014. 60 p. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc. Acesso em: 25 fev. 2018.
- CAETANO, F. R. *et al.* Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application. **Sensors and Actuators B. Chemical**, Lausanne, n. 243, p. 43-50, 2017.
- CASTRUCCI, F. *et al.* Large photocurrent generation in multiwall carbon nanotubes. **Applied Physics Letters**, New York, n. 89, p. 253107, June 2006.
- CHEN, X. *et al.* Enhanced ammonia sensitive properties and mechanism research of PANI modified with hydroxylated single-walled nanotubes. **Materials Chemistry and Physics**, Lausanne, v. 226, n. 3, p. 378–386, Mar. 2019.
- COYLE, S.D.; DURBORROW, R. M.; TIDWELL, J. H. **Anaesthetics in aquaculture**. Texas: SRAC, 2004. 6 p. (SRAC Publications, 3900).
- DAVIS, M. W.; STEPHENSON, J.; NOGA, E. J. The effect of tricaine on use of the fluorescein test for detecting skin and corneal ulcers in fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Hoboken, v. 20, n. 2, p. 86-95, June 2008.
- DRESSELHAUS, M. S.; ENDO, M. Relation of carbon nanotubes to other carbon materials. **Topics in Applied Physics**, Berlin, n. 80, p. 11–28, Mar. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Food safety and quality**. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>. Acesso em: 16 fev. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). GLOBEFISH Highlights: a quarterly update on world seafood markets. **Globefish Highlights**, Rome, n. 3, Jan./Mar. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014 (SOFIA)**. Rome: FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/097d8007-49a4-4d65-88cd-fcaf6a969776/>. Acesso em: 25 fev. 2018.

GAJENDRAN, P.; SARASWATHI, R. Polyaniline-carbon nanotube composites. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 11, p. 2377-2395, 2008.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, London, n. 354, p. 56-58, Nov. 1991.

INZELT, G. Conducting polymers: a new era in electrochemistry. *In*: SCHOLZ, F. (Ed.). **Monographs in electrochemistry**. 2. ed. Heidelberg: Springer, 2012. p. 149.

JINLEI, Z. *et al.* Study of nimesulide and its determination using multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. **Electrochimica Acta**, United Kingdom, v. 55, n. 7, p. 2522–2526, 2010.

KIESSLING, A. *et al.* Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*Salmosalar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3-4, p. 301–308, Jan. 2009.

KONDAWAR, S.; DESHPANDE, M. D.; AGRAWAL, S. P. Transport properties of conductive polyaniline nanocomposites based on carbon nanotubes. **International Journal of Composite Materials**, New York, v. 2, n. 3, p. 32-36, Aug. 2012.

LIN, W. *et al.* Polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites for structural vibration damping and strain sensing. **Journal of Materials Research**, Pittsburgh, v. 32, n. 1, p. 73-83, Jan. 2017.

LISBOA, F. S. *et al.* Carbon nanotubes/polyaniline thin films for development of electrochemical sensors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1093-1100, 2020.

LVOVICH, V. F. A perspective on electrochemical impedance analysis of polyaniline films on electrodes. **Interface**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 62-66, 2009.

MA, Y. *et al.* Improved conductivity of carbon nanotube networks by in situ polymerization of a thin skin of conducting polymer. **ACS Nano**, Washington, n. 2, p. 1197-1204, 2008.

MACDIARMID, A. G. "Synthetic Metals": a novel role for organic polymers (Nobel Lecture) Copyright((c)) the nobel foundation 2001. We thank the Nobel Foundation, Stockholm, for permission to print this lecture. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, Weinheim, v. 40, n. 14, p. 2581-2590, July 2001.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (Ed.). **Eurachem Guide**: the fitness for purpose of analytical methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2. ed. [S.l.]: Eurachem, 2014. 62 p.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 7, p. 62-77, 2012.

NASCIMENTO, G. M. do *et al.* Spectroscopic characterization of polyaniline formed in the presence of montmorillonite clay. **Polymer**, London, v. 47, n. 17, p. 6131-6139, 2006.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 4, p. 706-723, Apr. 1964.

OCHIAI, L. M. *et al.* Electroanalytical thread-device for estradiol determination using screen-printed carbonelectrodes modified with carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B. Chemical**, Lausanne, n. 241, p. 978-984, 2017.

OUÉINY, C.; BERLIOZ, S.; PERRIN, F.-X. Carbon nanotube: polyaniline composites. **Progress in Polymer Science**, London, n. 39, p. 707-748, 2014.

PÖHLS, J. H. *et al.* Physical properties of carbon nanotube sheets drawn from nanotube arrays. **Carbon**, Elmsford, v. 50, n. 11, p. 4175-4183, Sept. 2012.

RABIA, M. *et al.* Preparation of polyaniline/ PbS core-shell nano/ microcomposite and its application for photocatalytic H₂ electrogeneration from H₂O. **Scientific Reports**, Sydney, v. 8, n. 1107, p. 1-12, Jan. 2018.

RAO, A. M. *et al.* Diameter-selective raman scattering from vibrational modes in carbon nanotubes. **Science**, New York, v. 275, n. 5297, p. 187-191, Jan. 1997.

SAHOO, N. G. *et al.* Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 35, n. 7, p. 837-867, July 2010.

SALVATIERRA, R. V. *et al.* ITO-free and flexible organic photovoltaic device based on high transparent and conductive polyaniline/carbon nanotube thin films. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 23, n. 12, p. 1490-1499, 2013.

SALVATIERRA, R. V. *et al.* Resonant Raman spectroscopy and spectroelectrochemistry characterization of carbon nanotubes/polyaniline thin film obtained through interfacial polymerization. **Journal of Raman Spectroscopy**, Dordrecht, v. 43, n. 8, p. 1094-1100, 2012.

SALVATIERRA, R. V.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. One-pot synthesis and processing of transparent, conducting, and freestanding carbon nanotubes/polyaniline composite films. **Chemistry of Materials**, Washington, n. 22, p. 5222-5234, Aug. 2010.

SARAC, A. S.; ATES, M.; KILIC, B. Electrochemical Impedance Spectroscopic Study of Polyaniline on Platinum, Glassy Carbon and Carbon Fiber Microelectrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, Bor, v. 3, n. 7, p. 777-786, July 2008.

SHARMA, A. K. *et al.* Synthesis, characterization and study of optical property of (PANI)_{1-x}(MWCNT)_x nanocomposites. **Materials Today: proceedings**, Cleveland, v. 38, n. 3, p. 1214-1217, 2020.

SOBHA, A. P.; NARAYANANKUTTY, S. K. Improved strain sensing property of functionalised multiwalled carbon nanotube/polyaniline composites in TPU matrix. **Sensitive and Actuators A. Physical**, Lausanne, n. 233, p. 98-107, 2015.

TAGOWSKA, M.; PAŁYS, B.; JACKOWSKA, K. Polyaniline nanotubules: anion effect on conformation and oxidation state of polyaniline studied by Raman spectroscopy. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 142, n. 1-3, p. 223-229, Apr. 2004.

TONI, C. *et al.* Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of Lippia alba on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Research in Veterinary Science**, Oxford, n. 103, p. 20–27, Dec. 2015.

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4. ed. Flórida: Department of Health and Human Services, 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2013.

WU, T.-M.; LIN, Y.-W.; LIAO, C.-S. Preparation and characterization of polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites. **Carbon**, Elmsford, v. 43, n. 4, p. 734–740, Dec. 2005.

XAVIER, M. G. *et al.* Synthesis of nanoparticles and nanofibers of polyaniline by potentiodynamic electrochemical polymerization. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 9, n. 3, p. 2169-2172, Mar. 2009.

ZENGIN, H. *et al.* Carbon nanotube doped polyaniline. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 14, n. 20, p. 1480-1483, Oct. 2002.

ARTIGO 3**DETERMINATION OF BENZOCAINE AND TRICAINE IN FISH FILLETS USING
BIA WITH AMPEROMETRIC DETECTION****Artigo publicado na Revista Electroanalysis**

DOI: 10.1002/elan.201700554

Electroanalysis, 2017, 29, 1 – 6 1

© 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Received: September 11, 2017

Accepted: November 25, 2017

Rafael Machado Felix de Lima^[a], Michele Dorcília de Oliveira Silva^[a], Fabiana Silva Felix^[a],
Lucio Angnes^[b], Wallans Torres Pio dos Santos^[c] and Adelir Aparecida Saczk^{*[a]}

[a] R.M.F. de Lima, M. D. de Oliveira Silva, F.S. Felix, A.A. Saczk. Departamento de Química,
Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil. E-mail:
adelir@dqi.ufla.br

[b] L. Angnes. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP 05508-000, São Paulo,
São Paulo, Brazil.

[c] W. T. P. dos Santos. Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, CEP 39100000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

A system based on batch injection analysis (BIA) associated with amperometric detection at screen- printed carbon electrode was used for the precise and rapid quantification of the anesthetics compounds benzocaine and tricaine in fresh fish fillets. Along this study, the best conditions for the BIA-amperometry system were established for the rapid determination of these compounds. The results obtained demonstrate that the proposed method is an interesting alternative to the chromatographic methods, once it allows to perform rapid analysis (more than 300 injections per hour) with low limits of detection ($3.023 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for benzocaine and $3.19310^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for tricaine), using just 80 mL of sample for each analysis. Furthermore, it was possible to obtain high repeatability for both compounds analyzed, demonstrating good performance. The simple sample preparation developed in this study drastically reduced the amount of fat in the fish extract, favoring precision, as shown by the results of the recovery studies of both anesthetics contained in the fish samples (values above 99 % for both analytes).

Keywords: Batch Injection Analysis; Screen Printed Electrode; Benzocaine; Tricaine; Fish; Anesthetics.

1 Introduction

Benzocaine (Ethyl 4-aminobenzoate) and tricaine (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate) are anesthetics widely used in aquaculture management. In view of the low solubility (0.4 g L⁻¹ in water) of benzocaine, was synthesized tricaine, which presents very high solubility (1 g in 0.8 mL of water). Both anesthetics are derived from p-aminobenzoic acid [1]. Tricaine is one of the only approved compounds for the application in some families of fish according to the Food and Drug Administration (FDA). Some studies have been developed for the inclusion of benzocaine in the list of drugs released by the FDA, with a debugging time of 12 hours [1–5].

The analysis of anesthetics in fishes were usually performed using chromatographic techniques [1–4, 6]. For these analyses, different sample preparation procedures were proposed. Sample preparation is usually laborious and time-consuming, what turn them inappropriate for a simple quality control involving activities in aquaculture.

Voltammetric techniques, among them amperometry, are able to reach limits of detection and quantification as low as those obtained with some chromatographic techniques, with the advantage of requiring much simpler sample treatment. Amperometric sensors using carbon printed electrodes (CPEs) have many advantages such as being portable and disposable, as well as being able to be used successfully for the quantification of different compounds [7–11]. In addition, CPEs can be easily coupled to batch injection analysis (BIA) for rapid analyses with high sensitivity [12–16].

A search in the literature detected few scientific studies involving the detection of benzocaine in different samples [17–29], predominantly using chromatographic techniques. To the best of our knowledge, this is the first study that explores BIA associated with amperometry using screen-printed electrode for quantification of benzocaine and tricaine in fish tissues. In the following sections the advantages of the proposed methodology are presented, highlighting the good sensitivity and high repeatability achieved.

2 Experimental

2.1 Reagents and Solutions

Standard benzocaine (98.0%) and tricaine (99.0%) salts were acquired from Sigma-Aldrich. To prepare buffer solutions, the following reagents of analytical degree were utilized:

monobasic potassium phosphate, dibasic potassium phosphate, acetic acid, boric acid, and potassium hydroxide, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis/Missouri, USA). The o-phosphoric acid utilized was obtained from Synth.

Two different supporting electrolytes were explored during cyclic voltammetric experiments: Britton-Robinson buffer (0.10 mol L^{-1} , pH 2–12, in the preliminary studies) and phosphate buffer solution (0.10 mol L^{-1}). The 0.10 mol L^{-1} Britton-Robinson (B-R) buffer at different pH values was prepared by mixing solutions of 0.10 mol L^{-1} boric acid, 0.10 mol L^{-1} of o-phosphoric acid and 0.10 mol L^{-1} of acetic acid. A 1.0 mol L^{-1} sodium hydroxide solution was used to obtain the desired pH. Phosphate buffer was adopted for the following measurements. A phosphate buffer solution (0.10 mol L^{-1}) was prepared by mixing 0.033 mol L^{-1} of monobasic potassium phosphate and 0.067 mol L^{-1} of dibasic potassium phosphate, at pH 7.0. All solutions were prepared using pure water, which was double-filtered, purified by reverse osmosis and then passed through a Milli-Q (Millipore® Corporation, Bedford, USA) system. The resistivity measured after this treatment was not lower than 18.2 MW cm . During preliminary studies, the low solubility of the anesthetic benzocaine was verified. To overcome this drawback, alcoholic solution containing 20% ethanol and 80% phosphate buffer solution was utilized for complete solubilization of the benzocaine.

2.2 Preparation of Standard Solutions and Fish Samples

From the standard stock solutions containing benzocaine and tricaine ($1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), standard solutions were prepared (separately) in electrolyte (B-R buffer solution and phosphate buffer solution).

For the preparation of the samples, was followed the methodology described by Botrel et al. (2017), with some adaptations [30]. To extract the anesthetics from fish tissue, 2,00 g of fish fillets was macerated and transferred to a plastic tube with conical bottom (total volume: 15 mL) and set in freeze-drying procedure. In sequence, was introduced 13.00 mL of phosphate buffer solution (0.5 mol L^{-1}) pH 7.0 into the tube. Next, this mixture was vortexed (in a vortex mixer) during 5 minutes, followed by centrifugation (356 rads^{-1}) for 5 minutes. After this process, the tube was frozen ($-18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). During this process, the fish fat floats and comes to the surface of the solution, favoring its removal. The final extract was thawed and filtered through a 25 mm porous membrane with pores of 0.45 mm (from Millipore Corporation – Bedford, USA), then transferred to a clean flask and from there to the electrochemical cell for

analysis. The fish fillets analyzed in this study were donated by the Laboratório de Metabolismo de Peixes, Departamento de Zootecnia, Setor de Piscicultura from UFPA.

2.3 Voltammetric Measurements

All electrochemical measurements were carried out using a u-Autolab Type III potentiostat (EcoChemie, Utrecht Netherlands) and the data collection was obtained by GPES 4.9 software (EcoChemie®). For amperometric and voltammetric analyses, the screen printed carbon electrodes (SPEs, DS 110, Metrohm, Switzerland) were used: the working (diameter of 4.0 mm) and auxiliary electrodes were made of carbon, while the reference electrode was made of silver (Ag pseudo-reference electrode). Cyclic voltammetry studies were performed in a conventional 10 mL cell, while the BIA analysis was performed using the wall-jet cell previously described [31]. It was used a motorized electronic micropipet tip, Multipette Stream from Eppendorf (Hamburg, Germany) for the injections of standard benzocaine and tricaine solutions and samples.

To optimize the BIA-amperometric determinations, the following parameters were explored: To determine the best potential of the working electrode, a series of experiments in the interval situated between 0.60 and 0.95 V (vs. Ag/AgCl KCl_{sat}) was performed. The best volume injection was evaluated in the interval situated between 10 and 100 mL and to elect the best injection speed, experiments using speeds between 24.1 and 271 μLs^{-1} were done.

3 Results and Discussion

3.1 Voltammetric Studies

The electrochemical behavior of benzocaine and tricaine was initially explored over the pH range from 2.0 to 12.0 using a Britton-Robinson (B-R) buffer medium. This study shows that the increase of the pH in the BR buffer solution shifted the anodic potential towards to less positive values. At pH 7.0 the highest current was observed. This value is close of the pH of the fish tissues, so as similar to the conditions under which the analyzed anesthetics are usually administered in aquaculture [32,33].

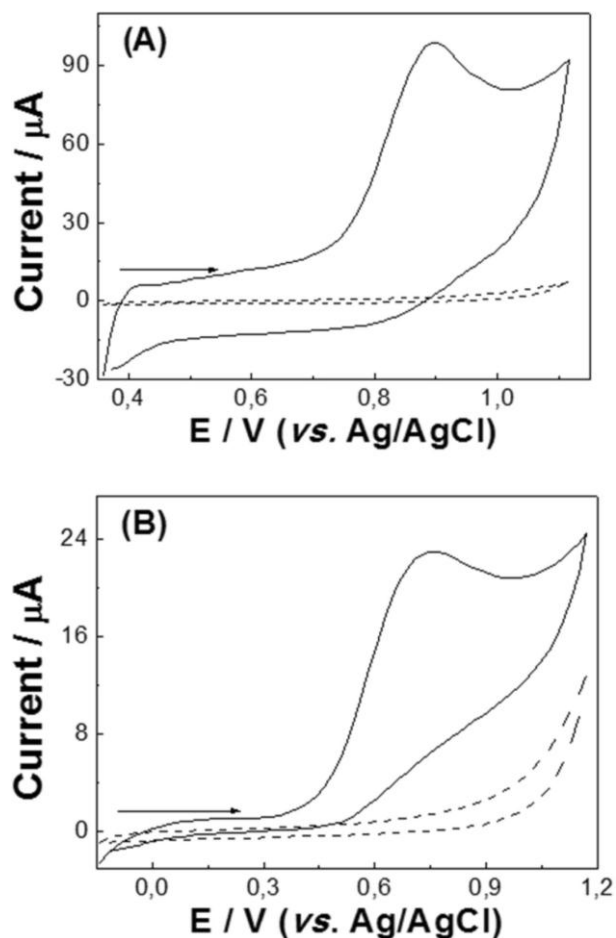
This condition (pH=7.0) was also tested in phosphate buffer solution 0.1 molL^{-1} , leading to results similar to the ones obtained with B-R buffer. Therefore, the analysis on this condition at pH 7.0 (phosphate buffer solution 0.1 molL^{-1}) represents a good compromise with peak

current and ambient conditions. Figure 1 shows the cyclic voltammograms in phosphate buffer solution 0.1 molL^{-1} at pH 7.0 and in presence of $1.0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ benzocaine (A) and tricaine (B).

It was observed in Figure 1, at the anodic region (from 0.00 V to 1.10 V and 1.18 V respectively), for the both anesthetics, a single well-defined peak of oxidation at 0.897 V and 0.757 for benzocaine and tricaine, respectively. It was not possible to verify reverse peaks in the studied region, suggesting that the oxidation involves an irreversible process. Considering studies of oxidative polymerization of benzocaine, as well as the similarity in the structures of the benzocaine and tricaine, the oxidation of both analytes can occur in the primary amine, involving the release of the H^+ ions into the solution, generating cationic species with highly reactivity and hybrid resonance centers [27,34].

The oxidation peak potential of benzocaine (0.897 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$) in Figure 1 presented a less positive oxidation potential value in comparison to Reddy et al. (2006), (1.03V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$) [27]. In this study the authors used glassy carbon electrode modified with Nafion as working electrode. Other studies were performed to evaluate the nature of the electrochemical process of benzocaine and tricaine [35]. For this it was studied the scan rate (v) from 5 to 300 mVs^{-1} . It was used the standard solution ($1.00 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) of the anesthetics in a phosphate buffer medium 0.1 molL^{-1} , pH 7. Analyzing the results it was observed the dependence of v as a function of intensity peak current for the both anesthetics. For linear relationships of I_p and v ; I_p and $v^{1/2}$; $I_p/v^{1/2}$ and v , the electrochemical process occurs by irreversible form. Furthermore, it was verified the chemical reactions coupled to the charge transfer, because the I_p varied linearly with the $v^{1/2}$, indicating that the process is controlled by diffusion. Other evidence over the diffusion process was obtained by the relationship between $\log I_p$ in function of $\log v$, showing a linear tendency ($\log I_p/\log v \sim 0.5$) [35].

Figure 1 - Cyclic voltammograms in phosphate buffer solution 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0 (dashed line) and with $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (A) benzocaine (solid line) (B) tricaine (solid line). Scan rate: 100 mV s^{-1} .



3.2 Batch Injection Analysis (BIA) with Amperometric Detection

The effect of the main parameters involving BIA associated with amperometric detection (working electrode potential, speed of injection and volume injected) was investigated in order to find the most suitable conditions for benzocaine and tricaine quantification in phosphate buffer solution 0.1 mol L^{-1} (pH 7.0). The main parameters for the quantification of both anesthetics have been optimized. About the working electrode potential, were used 0.90 V and 0.75 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$) for benzocaine and tricaine, respectively. As well in the other parameters were set optimized the same value for tricaine and benzocaine. The most favorable time to set in the electronic was found to be 271 mL s^{-1} , (the fastest rate of the pipette used) as well as the best volume to inject was determined to be 80 μL . These values were fixed for all the measurements done during this study.

The linearity between the anodic currents and the anesthetics concentrations were found in a concentration range from 1.00×10^{-7} to 8.00×10^{-6} molL⁻¹ (Figure 2). The linear regression parameters of both series of measurements were: calibration plot intercept at $3.49 \times 10^{-6} \pm 2.31 \times 10^{-7}$ A and a slope of 2.77 ± 0.07 A/molL⁻¹ ($r=0.998$) for benzocaine, and intercept at $2.27 \times 10^{-7} \pm 1.02 \times 10^{-7}$ A and a slope of 0.76 ± 0.03 A/molL⁻¹ ($r=0.994$) for tricaine. Figure 2 presents the concentration ranges studied for benzocaine (A) and tricaine (B). The estimated detection limits were 3.02×10^{-8} molL⁻¹ for benzocaine and 3.19×10^{-8} molL⁻¹ for tricaine. The values for quantification limit were 9.07×10^{-8} molL⁻¹ for benzocaine and 9.57×10^{-8} molL⁻¹ for tricaine.

Comparing the detection and quantification limits obtained for benzocaine using BIA associated with amperometric detection, it was verified in the literature that the values are similar to others studies involving electrochemical techniques, applied to different samples [16–29]. However, it was not possible to make this comparison for tricaine, since there are still no reports in the literature.

Figure 3 shows repetition studies of successive injections of standard solutions of benzocaine (A) and tricaine (B) in a concentration of 4.0×10^{-7} molL⁻¹ in phosphate buffer medium 0.1 molL⁻¹ (pH 7.0). In these experiments, there is no memory effect during the injections, demonstrating that the washout is effective and that there is no poisoning of the electrode surface for the both anesthetics. The analysis of this series of injections generated relative standard deviations of 1.80% for benzocaine and 2.07% for tricaine. Moreover, analytical frequency of 360 injections per hour for the benzocaine and 450 injections per hour for the tricaine were observed. Determination of residual clove oil, tricaine and benzocaine in fillets of two fish species (Nile tilapia and cachadia) using UPLC-DA [36]. In this study, samples ($n=4$) of each fish species were evaluated after submitted to anesthesia in different dosages and taking into account four depuration times (0 h, 12 h, 24 h and 48 h). Soon after the anesthesia (0 h) both species, tilapia and cachadia, presented residues of benzocaine (1.46 mgg⁻¹ and 2.60 mgg⁻¹) and tricaine (0.40 mgg⁻¹ and 2.17 mgg⁻¹). Fishes depurated after 12 hour did not show detectable values, as well as samples analyzed after 24 and 48 hours. These results suggest significant decrease of both anesthetics with time, since the quantification limits (0.015 mgg⁻¹ and 0.025 mgg⁻¹ for benzocaine and tricaine, respectively) found in the proposed method are expressively smaller than the lower concentrations detected soon after its application.

Figure 2 - Results for BIA with amperometric detection using a carbon printed electrode, in a phosphate buffer médium 0.1 molL^{-1} , pH 7.0, after injections of (a) 1.0×10^{-7} , (b) 2.0, (c) 4.0, (d) 6.0, (e) 8.0, (f) 1.0×10^{-6} , (g) 2.0, (h) 4.0, (i) 6.0 e (j) $8.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (A) benzocaine (B) tricaine. Working electrode potential at 0.90 V and 0.75 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{KCl}_{\text{sat}}}$ for benzocaine and tricaine, respectively. Injected volume: 80 mL. Speed of injection: 271 mLs⁻¹. Inset: linear regressions for each analyte.

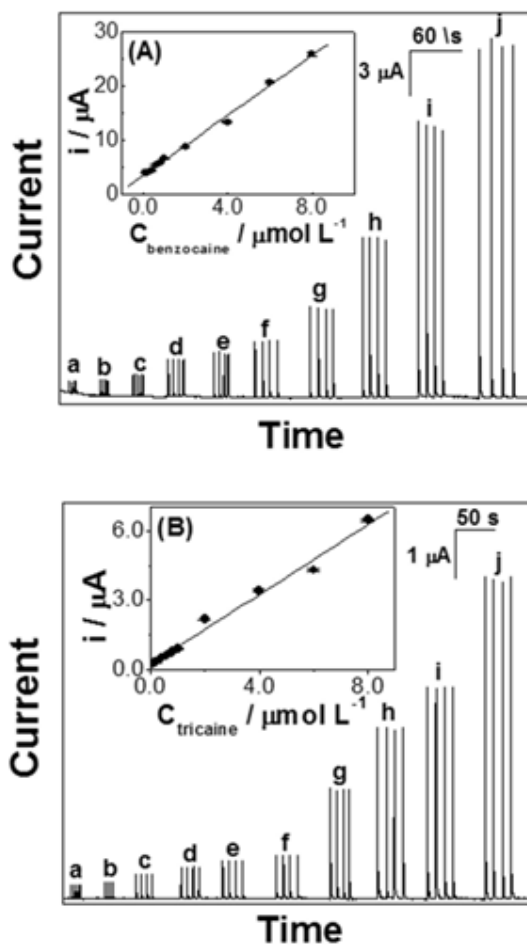
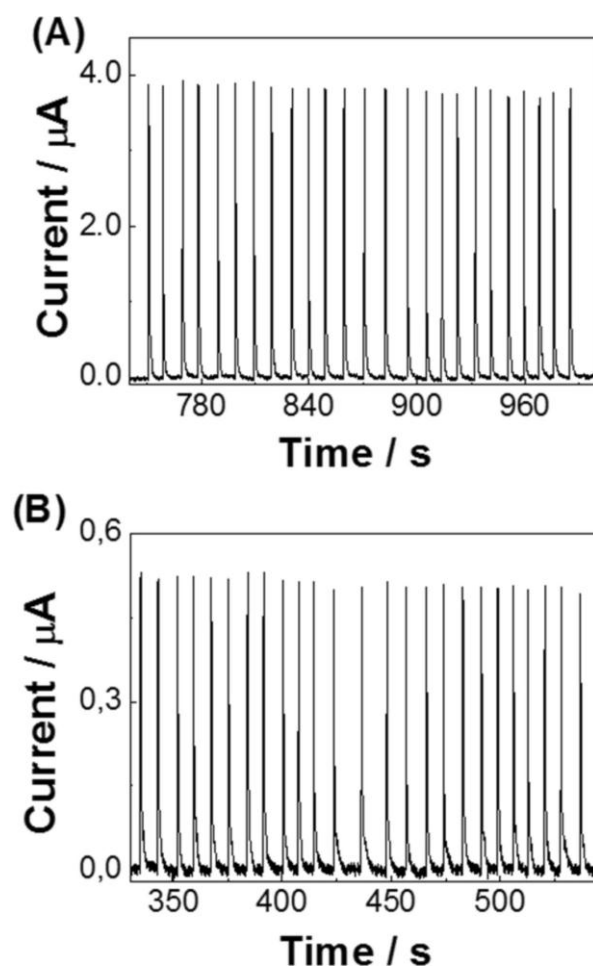


Figure 3 - BIA with amperometric detection results for 25 repetitive injections of (A) benzocaine and (B) tricaine $4.0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$, in a phosphate buffer medium 0.1 molL^{-1} (pH 7.0). Applied potencial: 0.90 V and 0.75 V vs. Ag/AgClKClsat, for benzocaine and tricaine, respectively. Injected volume: 80 μL . Injection speed: 271 mLs^{-1} .



4 Conclusions

In this study was developed a BIA-amperometric methodology using screen-printed carbon electrode for benzocaine and tricaine in fish tissues. A procedure for sample preparation (reducing significantly the presence of fats in the extraction solution) was developed. The detection limits attained was comparable with the ones achieved with chromatographic techniques ($3.02 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ for benzocaine and $3.19 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ for tricaine), and a differentiated sampling rate (360 injections per hour for benzocaine and 450 injections per hour for tricaine) was recorded. A very satisfactory recovery of anesthetics in fish fillets was attained ($99.5\% \pm 1.7\%$ for benzocaine and $99.6\% \pm 1.2\%$ for tricaine) when the anesthetics were spiked in the fillet and rapidly extracted. The methodology developed represents a viable alternative to the traditional methods of analysis (chromatographic) in fish samples, with good sensitivity for analyzing the both anesthetics. The BIA-amperometric methodology here proposed have great potential for applications for quality control of different samples such commercial anesthetics, in the control of pharmaceutical and veterinary products.

Acknowledgements

The authors are grateful for the Cordenção de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Rede Mineira de Química (RQ-MG) financed by the Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support. The authors are grateful for Departamento de Zootecnia (DZO) for the donation of the fish samples.

References

- [1] G. R. Stehly, J. R. Meinertz, W. H. Gingerich, *Food Addit. Contam.* 2000, 17, 387–392.
- [2] G. R. Stehly, J. R. Meinertz, W. H. Gingerich, *J. Vet.Pharmacol. Ther.* 1998, 21, 121–127.
- [3] G. R. Stehly, Silver Spring: Food and Drug Administration 1995.
- [4] J. R. Meinertz, G. R. Stehly, T. D. Hubert, J. A. Bernardy, *J. Chromatogr. A* 1999, 855, 255–2602.
- [5] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA, 2011. Available in <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf> on aug 5th, 2017.
- [6] P. Scherpenisse, A. A. Bergwerff, *Anal. Chim.* 2007, 586, 1–2, 407–410.
- [7] E. Sánchez-Tirado, C. Salvo, A. Gonzaléz-Cortés, P. Yanez Sedenoa, F. Langab, J. M. Pingarróna, *Anal. Chim. Acta* 2017, 959, 66–73.
- [8] C. N. Hernandez, M. B. G. Garcia, D. H. Santos, M. A. Heras, A. Colina, P. Fanjul-Bolado, *Electrochem. Commun.* 2016, 64, 65–68.
- [9] P. Niu, C. Fernández-Sánchez, M. Gich, *Microchim. Acta* 2016, 183, 617–623.
- [10] A. Vasilescu, G. Nunes, A. Hayat, U. Latif, J. L. Marty, *Sensors* 2016, 16, 1863.
- [11] A. Hayat, J. L. Marty, *Sensors* 2014, 14, 10432–10453.
- [12] E. S. Almeida, A. J. L. Silva, R. M. F. Sousa, E. M. Richter, W. Christopher, C. E. Banks, R. A. A. Munoz, *Anal. Chim. Acta* 2016, 934, 1–8.
- [13] V. B. Nascimento, L. Angnes, *Quím. Nova* 1998, 21, 614–629.
- [14] F. S. Felix, L. Angnes, *J. Pharm. Sci.* 2010, 99, 4784–4804.
- [15] M. S. M. Quintino, L. Angnes, *Electroanalysis* 2004, 16, 7, 513–523.
- [16] P. Surmann, B. Peter, C. Stark, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996, 356, 192–196.
- [17] H. Dejmkova, V. Vokalova, J. Zima, J. Barek, *Electroanalysis* 2011, 23, 662–666.
- [18] L. M. Laird, R. L. Oswald, *J. Inst. Fish. Manage.* 1975, 6, 92–94.
- [19] K. T. W. Coltro, *Sens. Actuator B-Chem.* 2016, 226, 196–203.
- [20] R. T. Kachoosangi, G. G. Wildgoose, R. G. Compton, *Electroanalysis* 2008, 20, 2495–2500.
- [21] R. A. Weber, J. B. Peleteiro, L. O. García Martín, M. Aldegunde, *Aquaculture* 2009, 288, 147–150.
- [22] G. Dutu, C. Cristea, B. Ede, V. Harceaga, A. Saponar, E. J. Popovici, R. Sandules, *Farmacia* 2011, 59, 147–149.

- [23] A. Samide, B. Tutunaru, G. Bratulescu, C. Ionescu, *J. Appl. Polym. Sci.* 2013, 130, 687–697.
- [24] H. Dejmkovala, V. Vokalova, J. Zima, J. Barek, *Electroanalysis* 2011, 23, 662–666.
- [25] S. Komorsky-Lovric, N. Vukasœinovic, R. Penovskib, *Electroanalysis* 2003, 15, 5–6.
- [26] R. T. Kachoosangi, G. G. Wildgoose, R. G. Compton, *Electroanalysis* 2008, 20, 2495–2500.
- [27] T. M. Reddy, K. Kodigutta, S. Reddy, J. Reddy, *Croat. Chem. Acta, CCACAA* 2006, 79, 253–259.
- [28] Y. M. Issa, S. H. Mohamed, M. A. Baset, *Talanta* 2016, 155, 158–167.
- [29] J. J. Freitas, D. L. O. Ramos, R. M. F. Sousa, T. R. L. C. Paixao, M. H. P. Santana, R. A. A. Munoz, E. M Richter, *Sens. Actuator B-Chem.* 2017, 243, 557–565.
- [30] B. M. C. Botrel, D. C. P. Abreu, A. A. Saczk, M. J. F. Bazana, C. N. Nascimento; P. V. Rosa, *Microchem. J.* 2017, 133, 70–75.
- [31] J. S. Stefano, D. S. Cordeiro, M. M. C. Marra, E. M. Richter, R. A. A. Munoz, *Electroanalysis* 2016, 28, 350–357.
- [32] L. G. Ross, B. Ross, *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.
- [33] L. G. Ross, J. A. Geddes, *Aquaculture* 1979, 16, 183–186.
- [34] B. Marjanovic, I. Juranic, G. C iric-marjanovic, I. Pasti, M. Trchova, P. Holler, *React. Funct. Polym.* 2011, 71, 704.
- [35] R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* 1964, 36, 706–723.
- [36] R. A. Pereira, A. A. Saczk, D. Okamura, M. G. Cardoso, L. S. Costa, W. D. Santiago, T. M. Souza, R. M. F. Lima, P. V. Rosa, *Journal of Advances in Chemistry* 2014, 10, 2661–2668.

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantidade de dados obtidos durante o experimento eletroquímico representa um desafio ao analista quanto a gerenciar, analisar e correlacionar os dados. Ao todo foram cerca de 4 mil dados coletados para o desenvolvimento do sensor. A utilização do planejamento fatorial fracionado reduziu o número de dados, que em um sistema univariado atingiria cerca de 10 mil dados facilmente. A técnica estatística permitiu correlacionar os resultados e obter o melhor conjunto de variáveis para a obtenção do sensor. Desta forma, na eletroquímica, o uso de técnicas estatística deve ser explorado, visando ao menor consumo de reagente e tempo de análise.

Os resultados obtidos no primeiro artigo permitiram a aplicação na determinação de triclaína residual em peixes, no segundo artigo, com bons limites de detecção e quantificação.

No terceiro artigo envolvendo a metodologia BIA foi possível otimizar e diminuir consideravelmente a quantidade de tempo para a realização de experimentos.

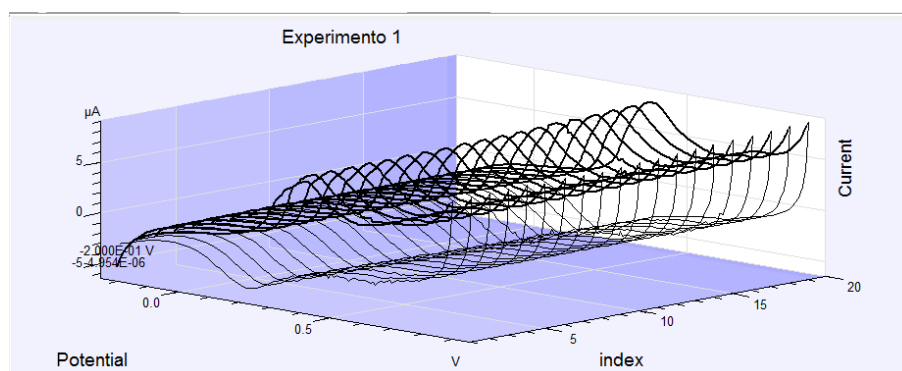
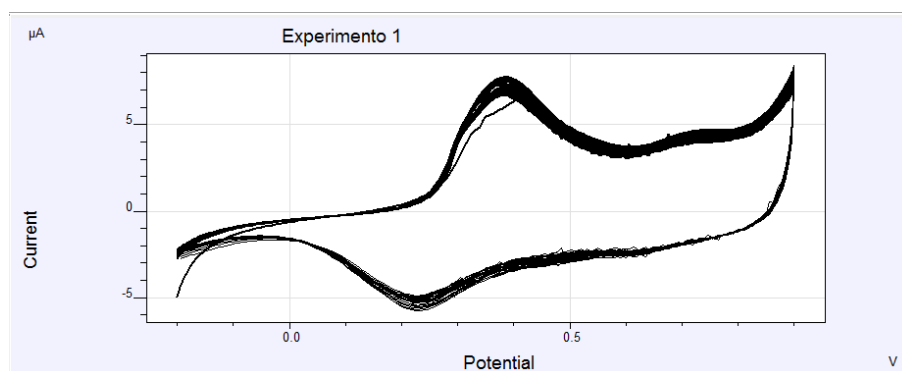
PERSPECTIVAS FUTURAS

Podem ser realizadas, concomitantemente com este trabalho, análises quanto à cinética da formação do filme de PANI-WMTC's sobre GCE, além da expansão para a determinação de outros anestésicos.

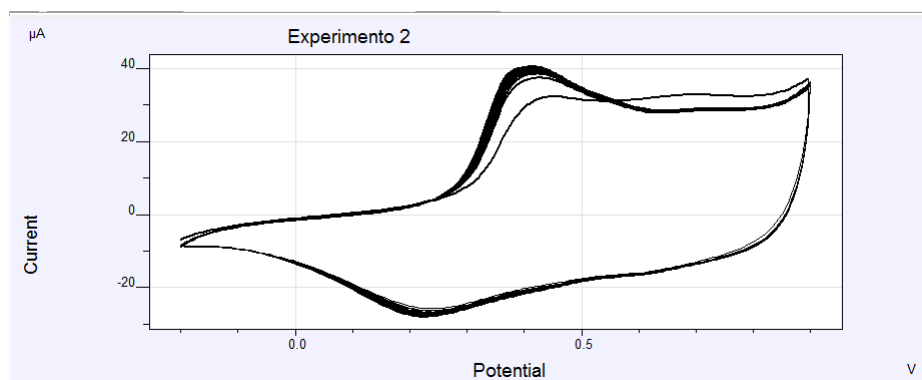
ANEXOS

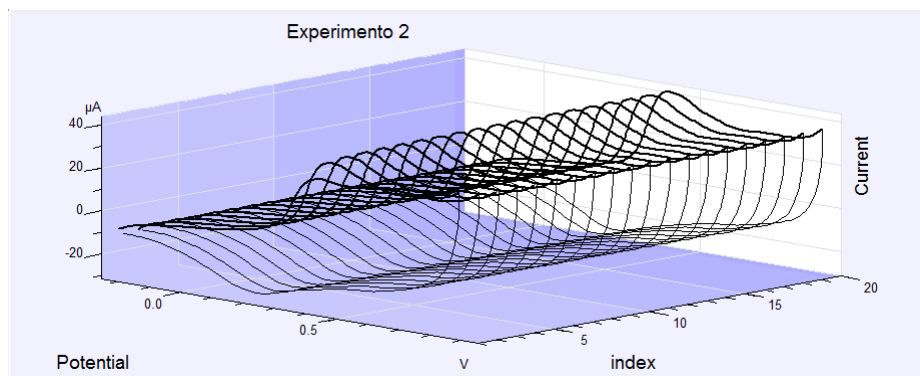
Anexo 1 – Voltamogramas em 2D e 3D dos experimentos (1 ao 32) gerados pela Tabela 1 do Artigo 1.

Experimento 1

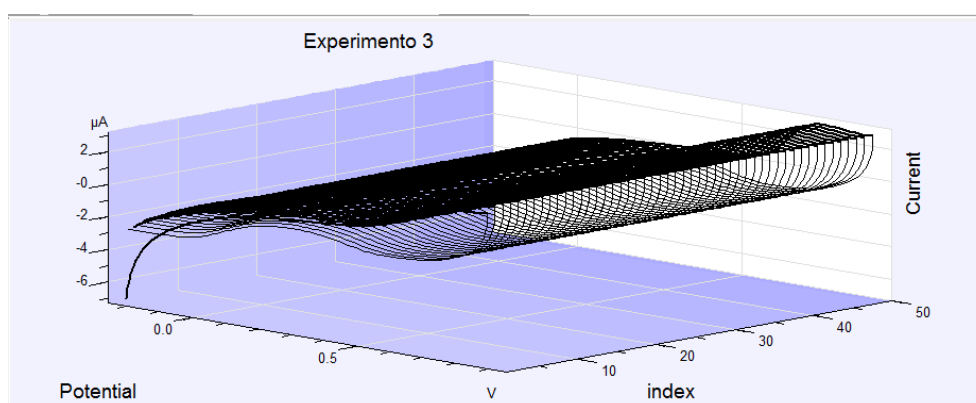
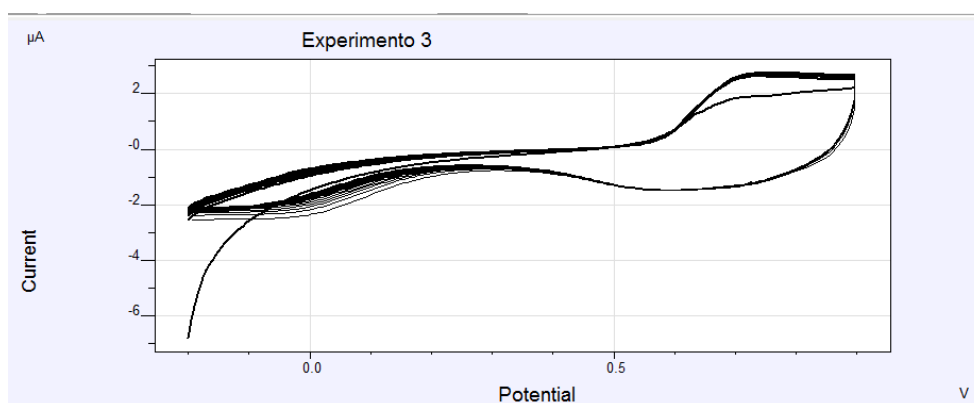


Experimento 2

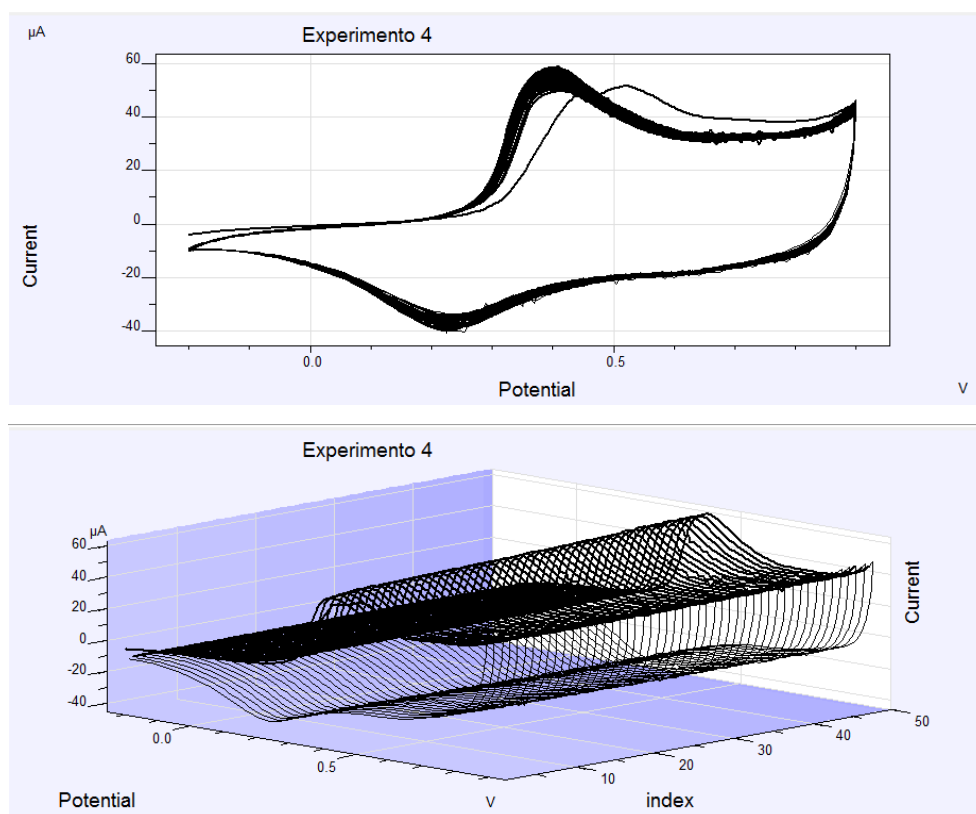




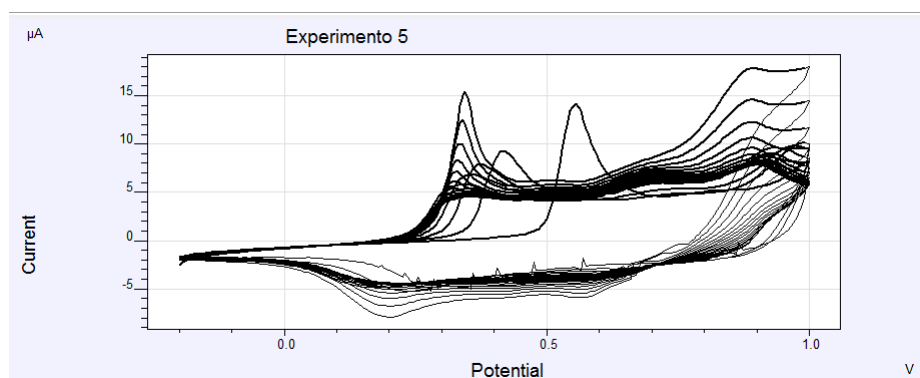
Experimento 3

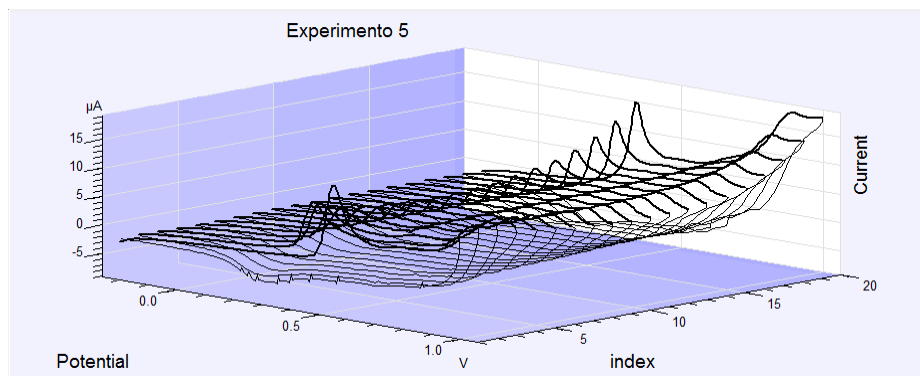


Experimento 4

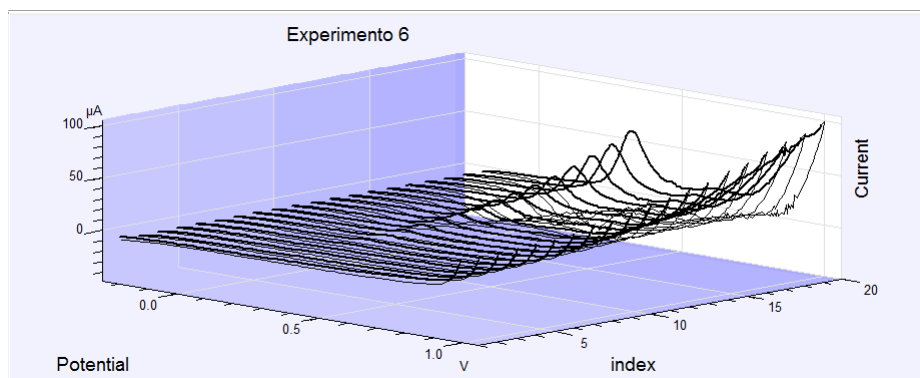
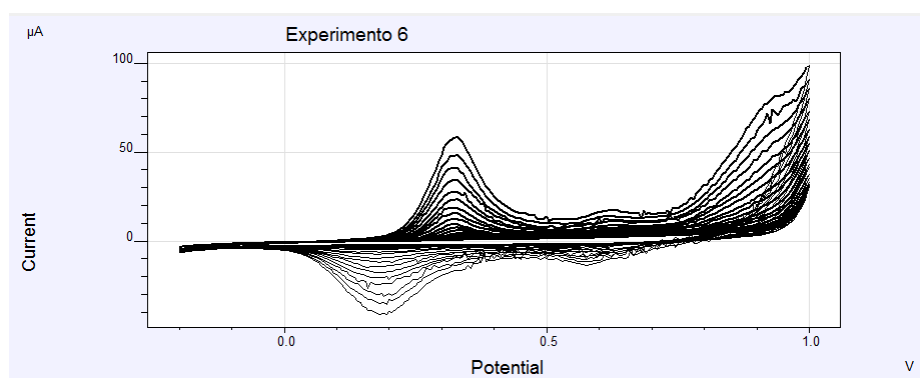


Experimento 5

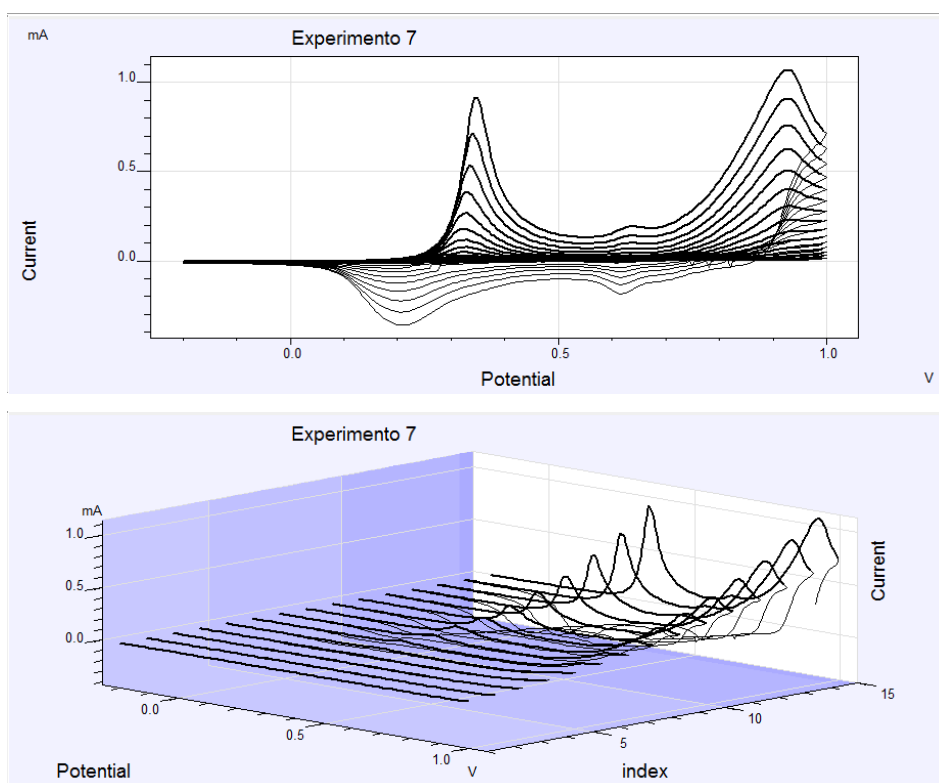




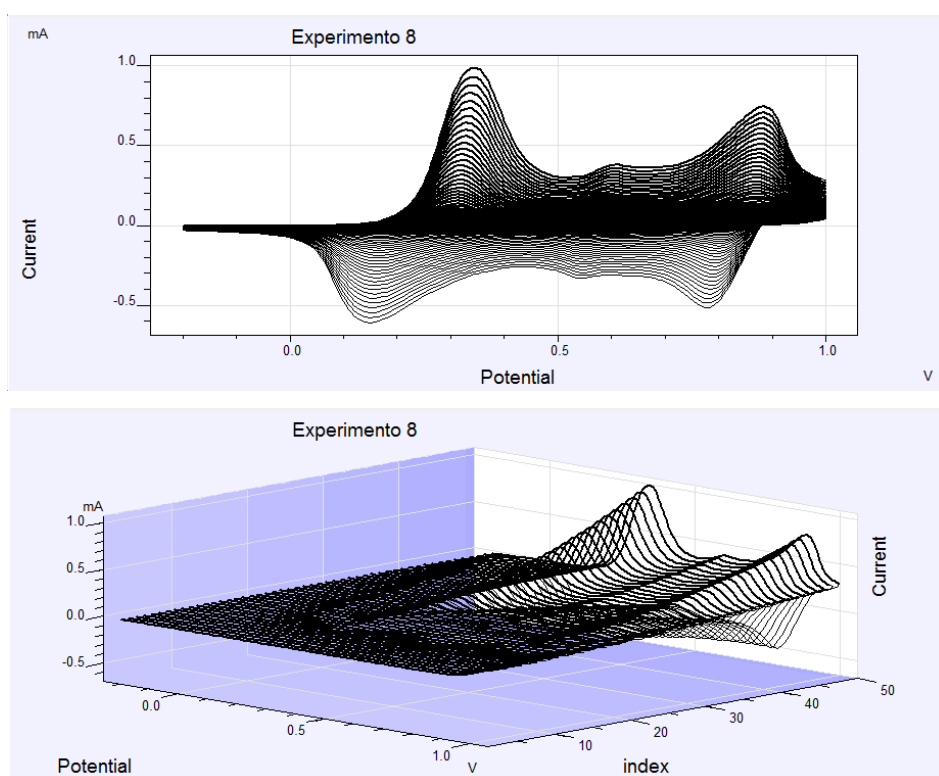
Experimento 6



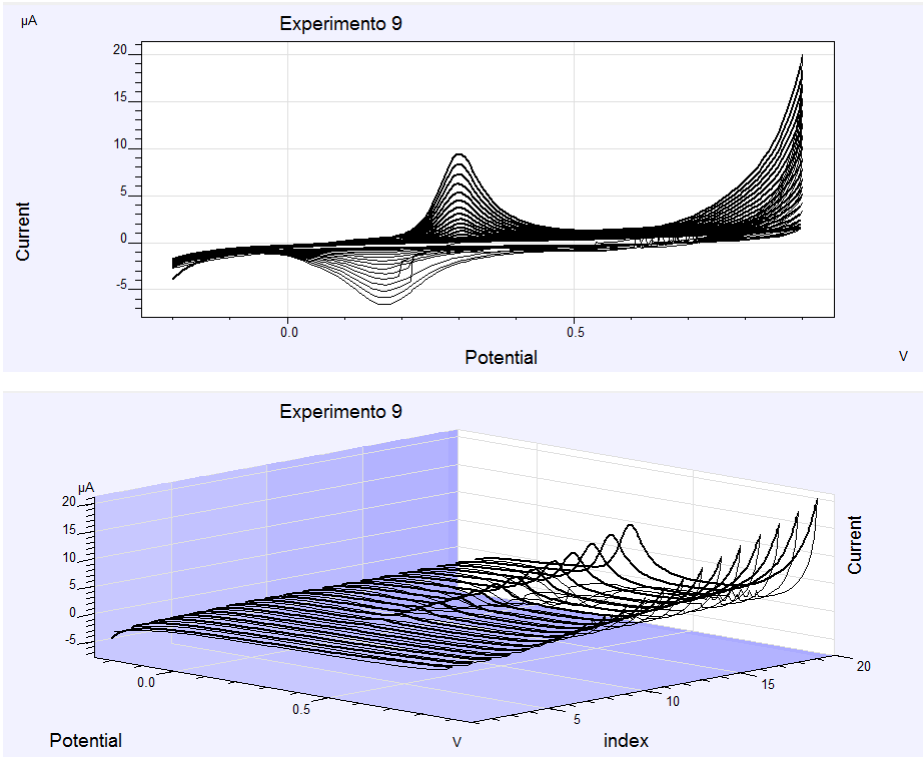
Experimento 7



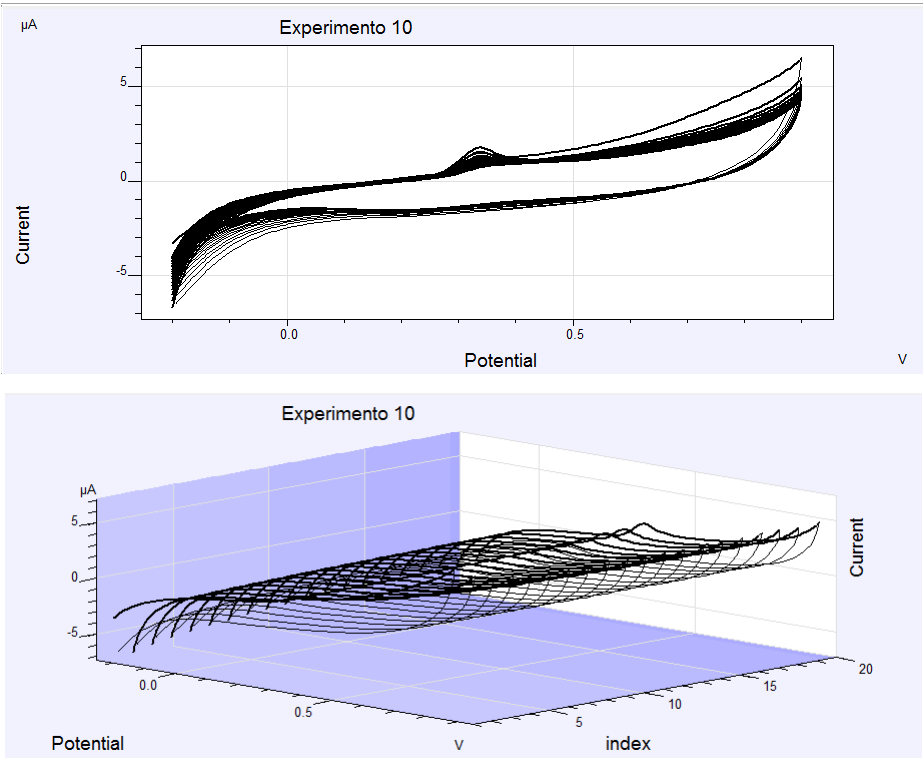
Experimento 8



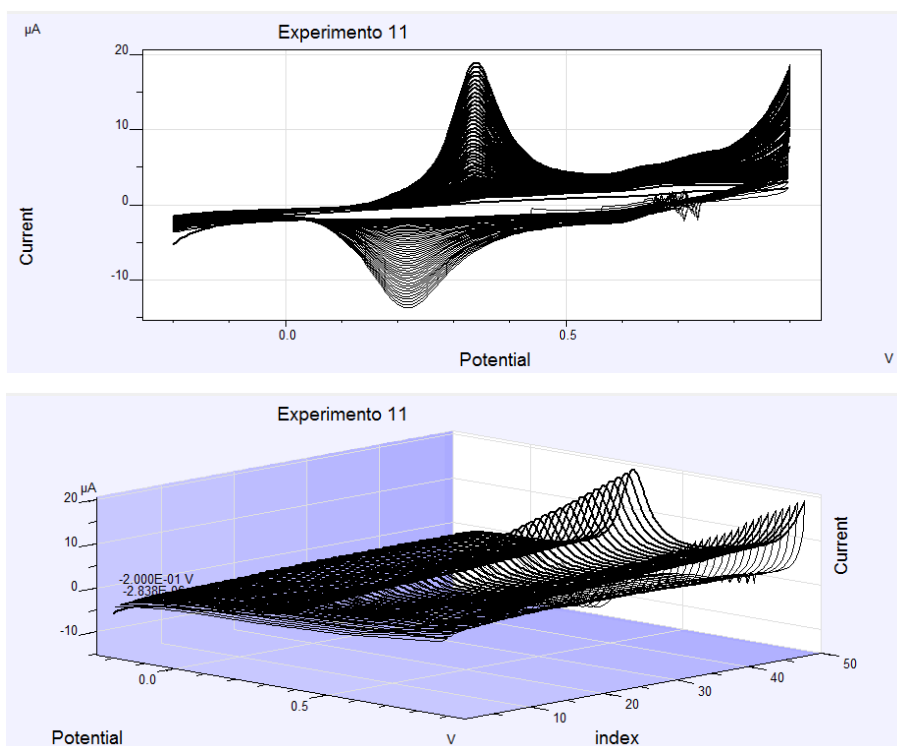
Experimento 9



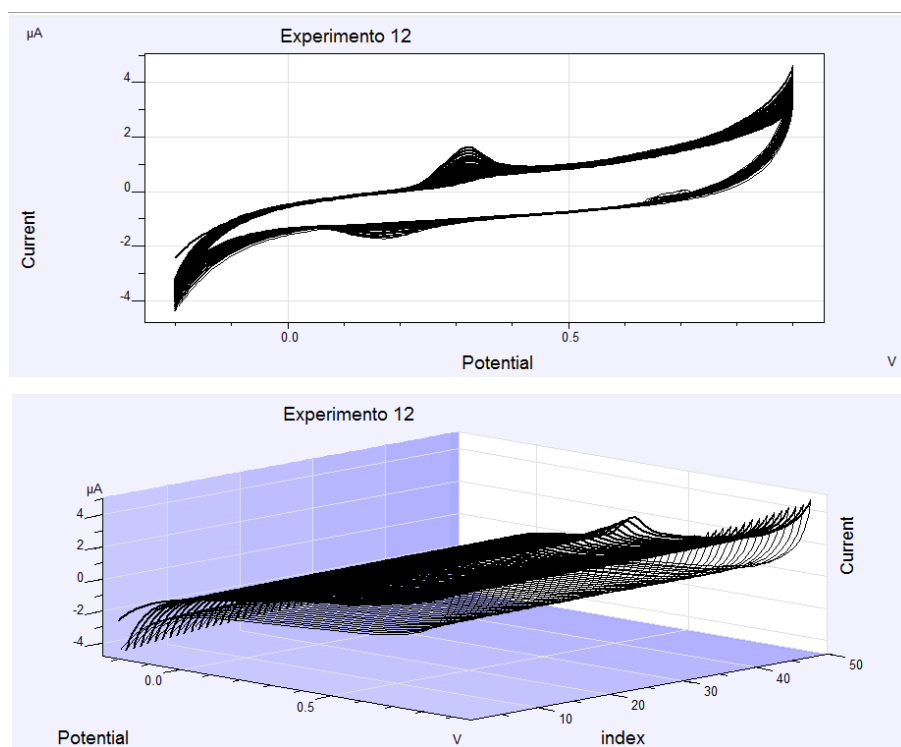
Experimento 10



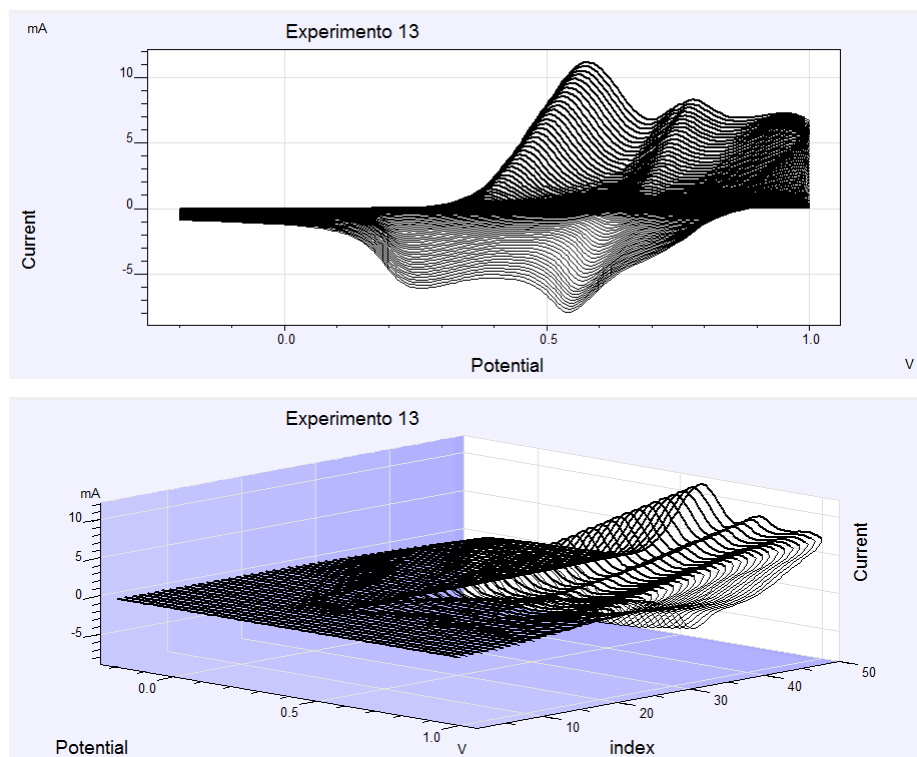
Experimento 11



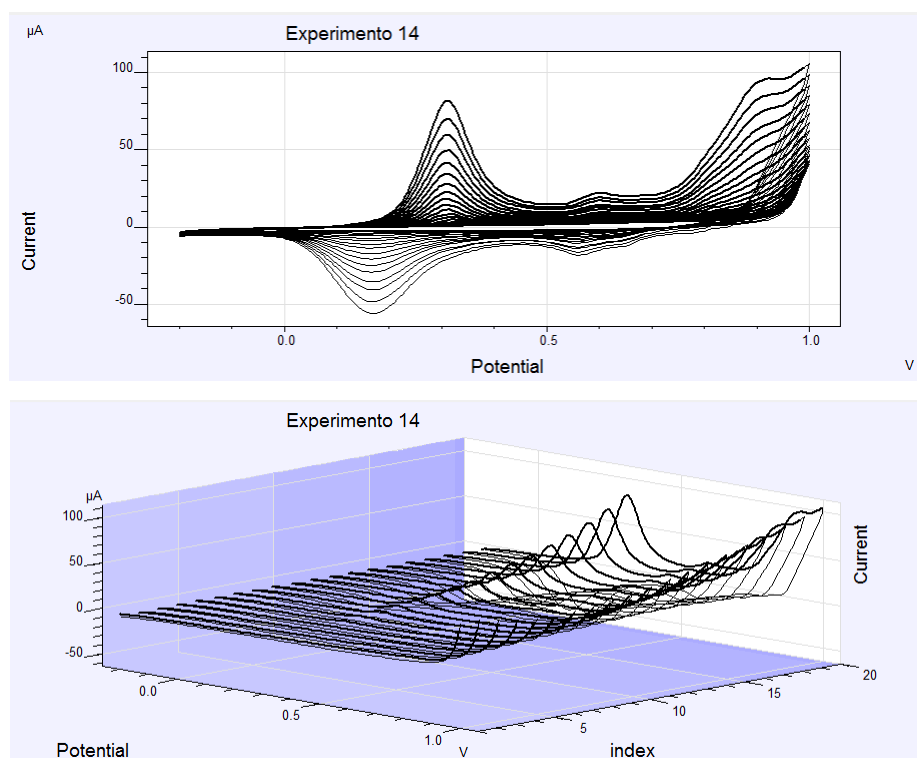
Experimento 12



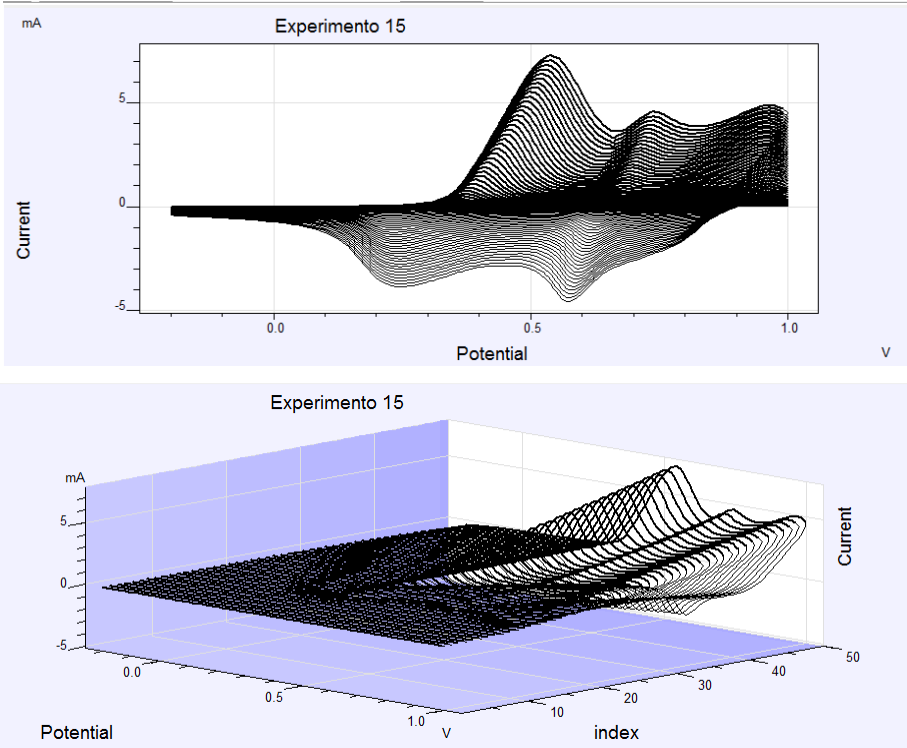
Experimento 13



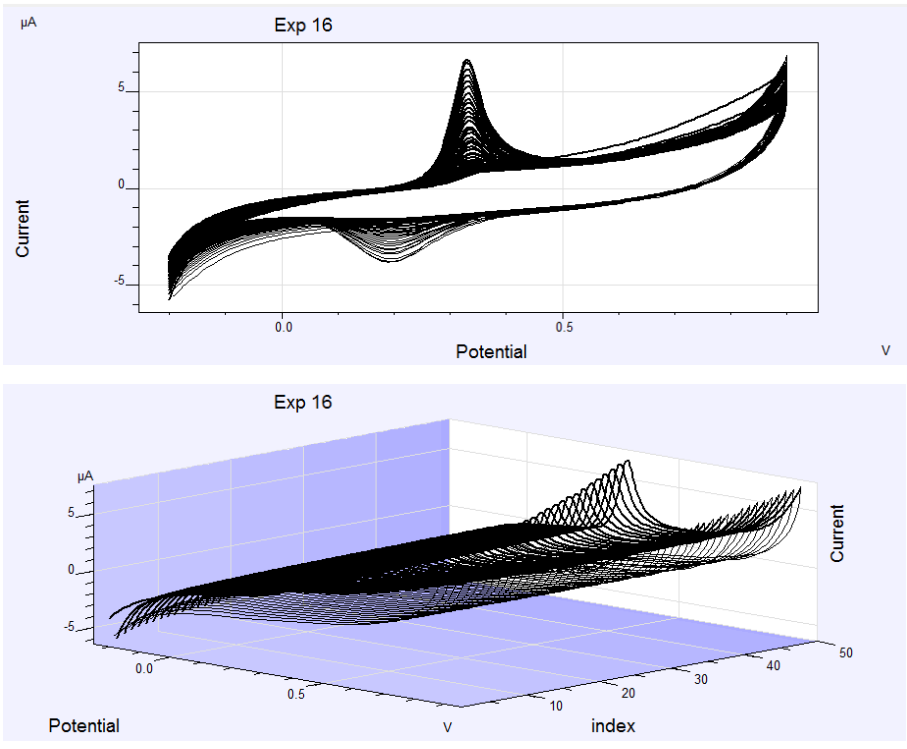
Experimento 14



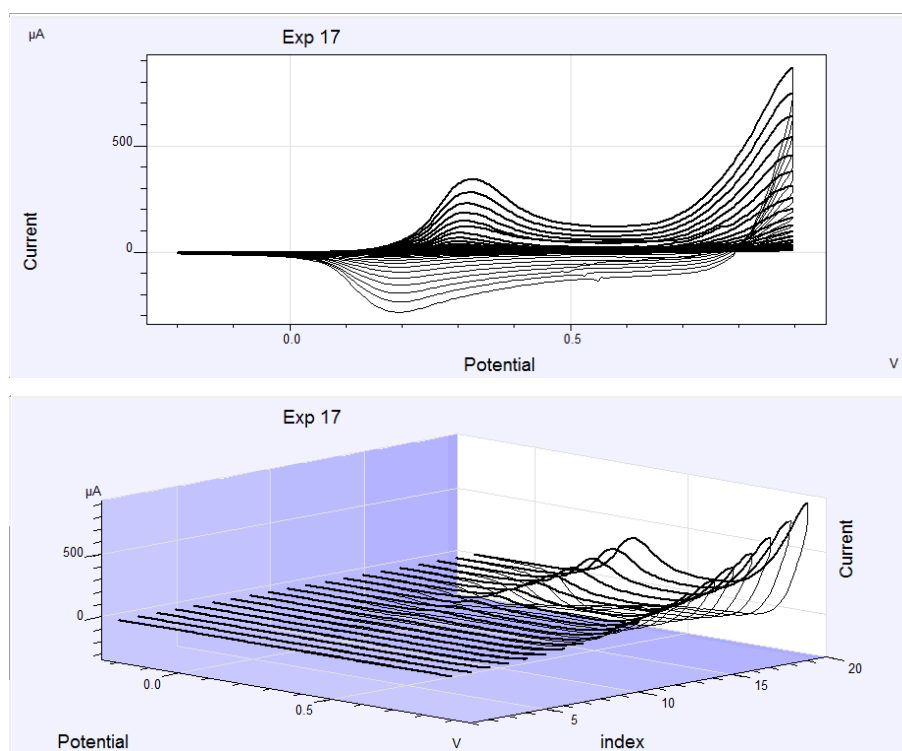
Experimento 15



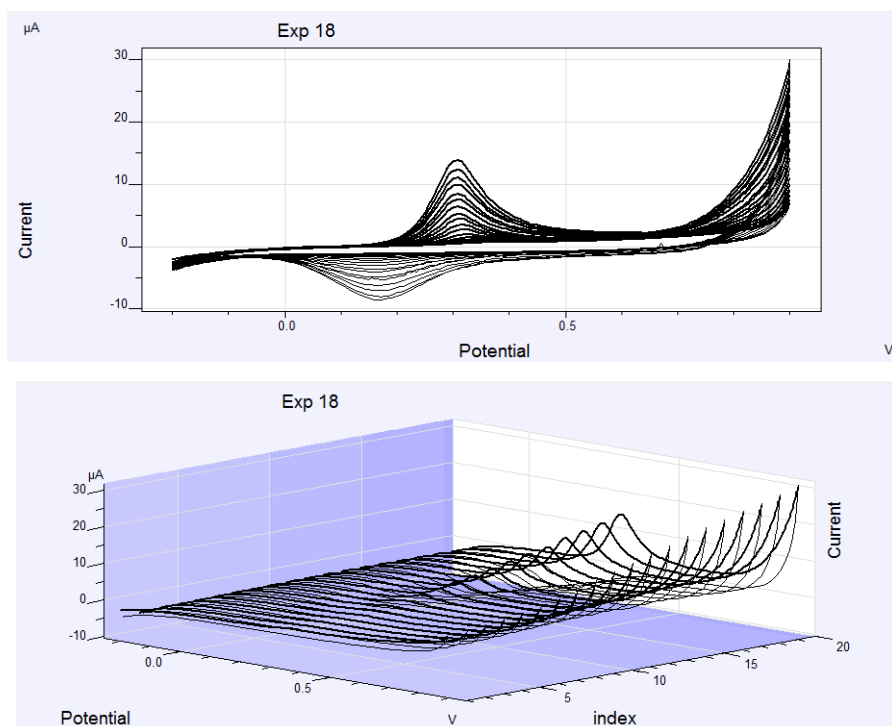
Experimento 16



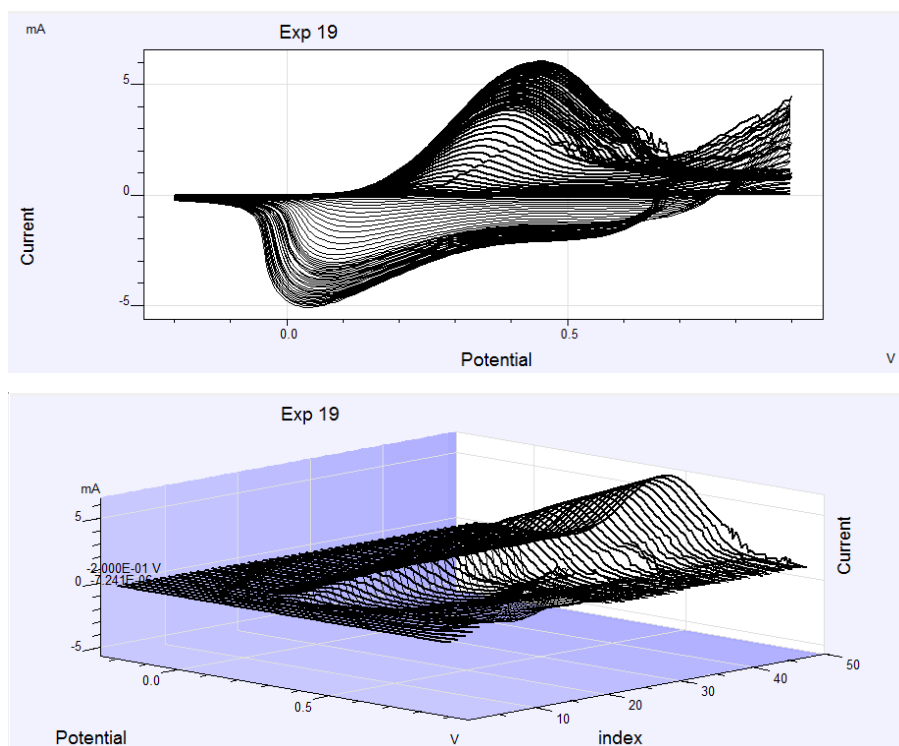
Experimento 17



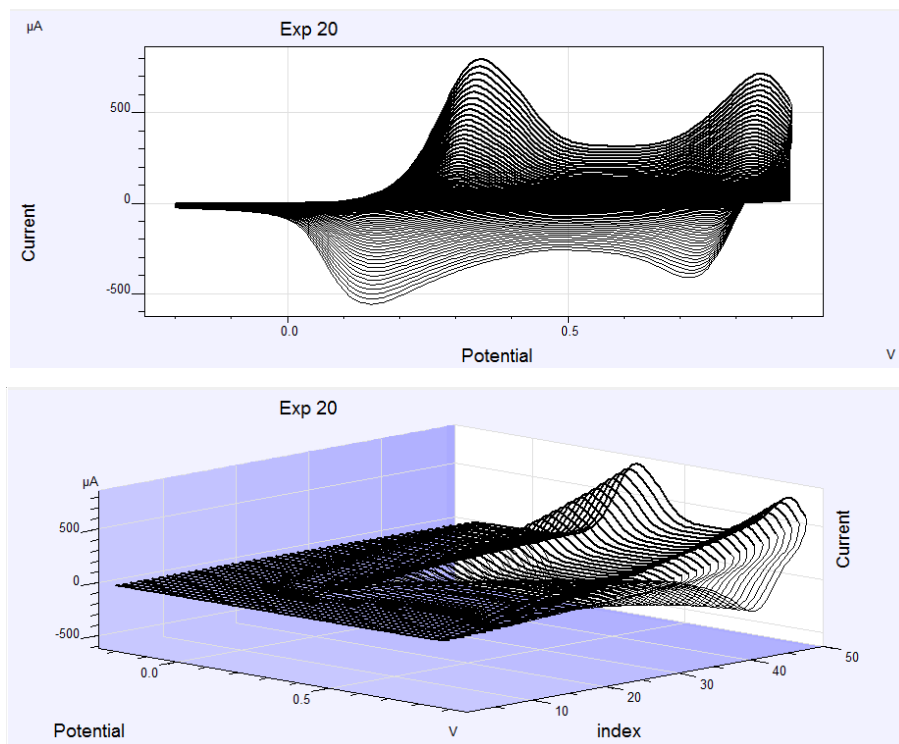
Experimento 18



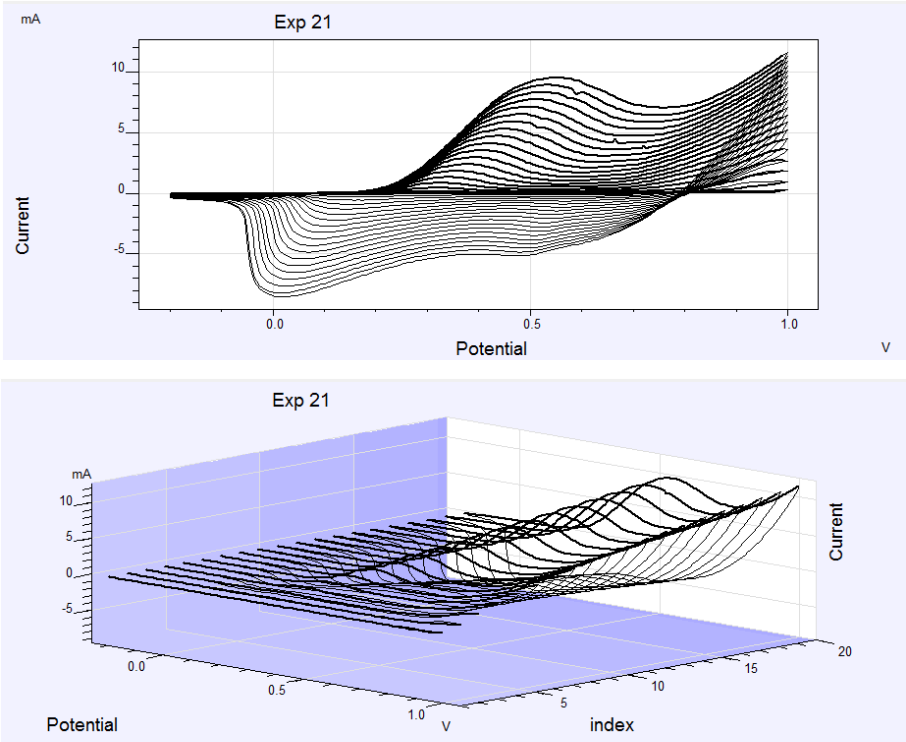
Experimento 19



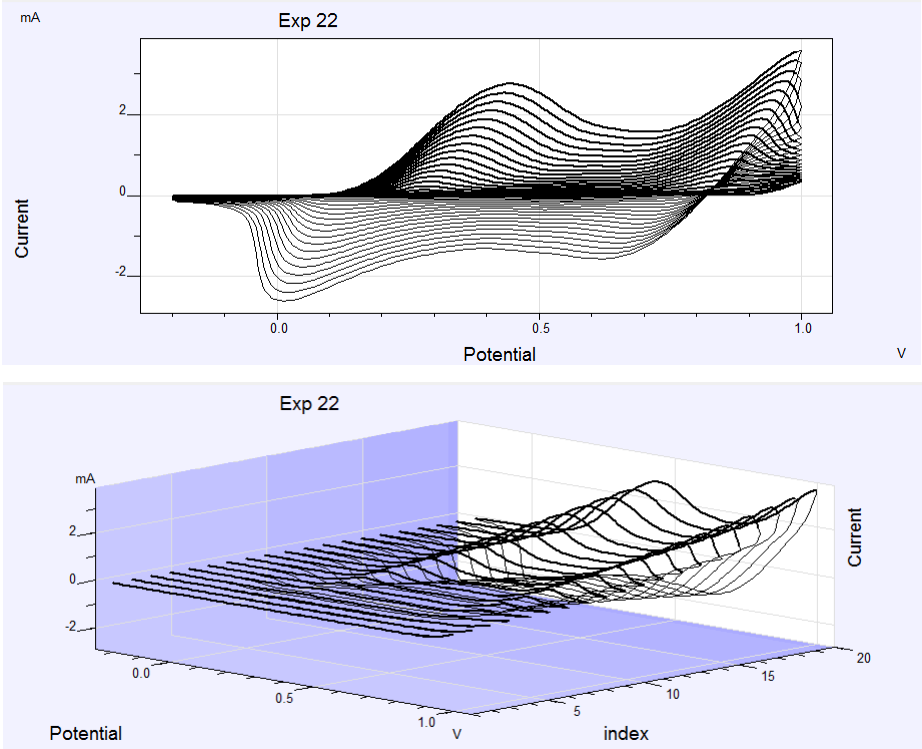
Experimento 20



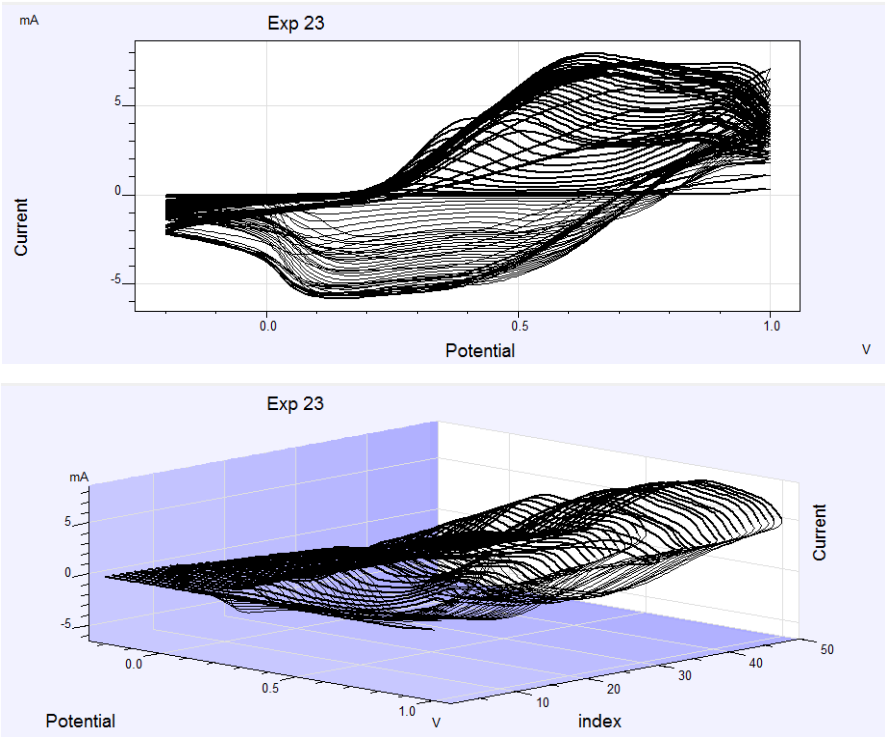
Experimento 21



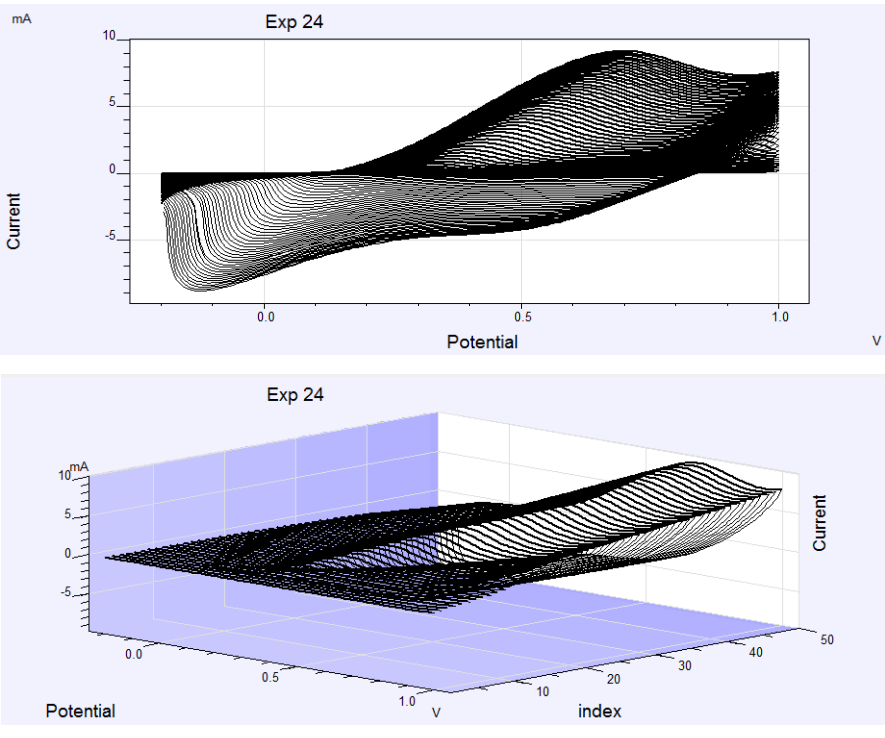
Experimento 22



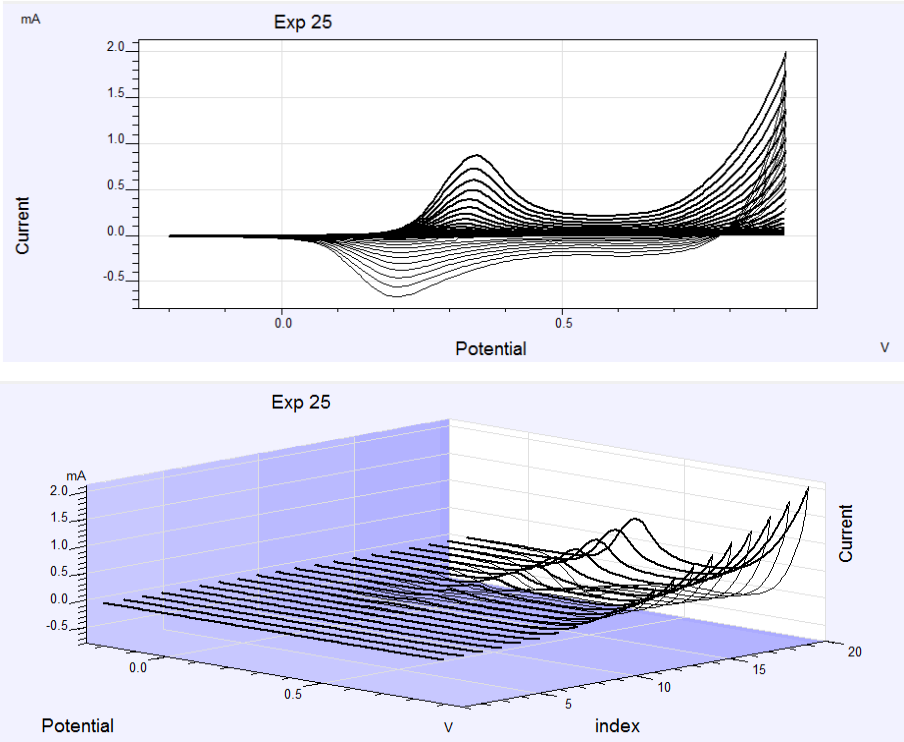
Experimento 23



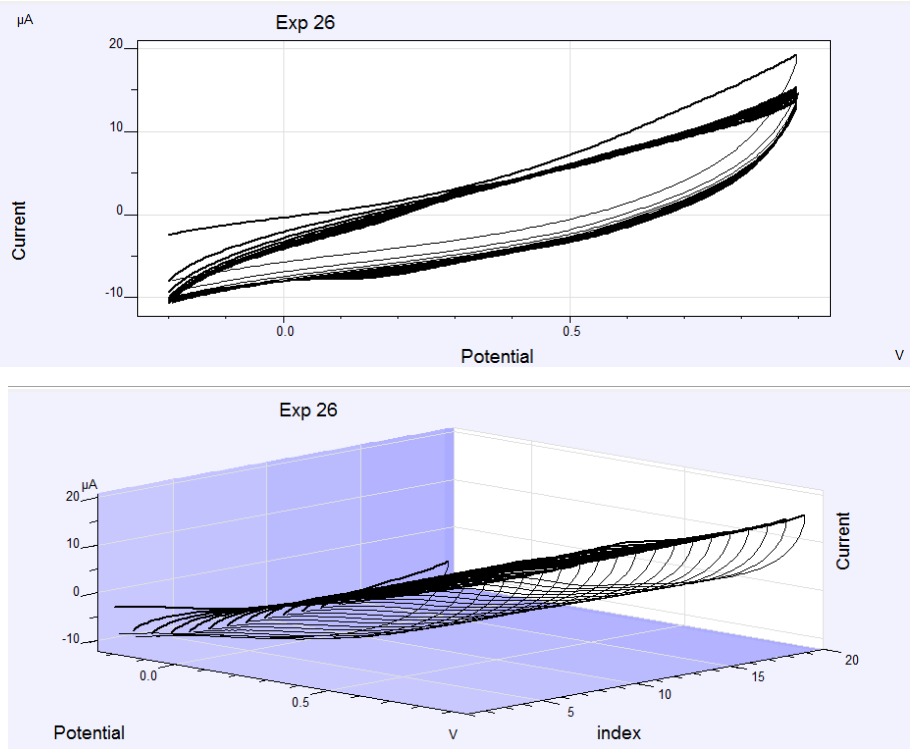
Experimento 24



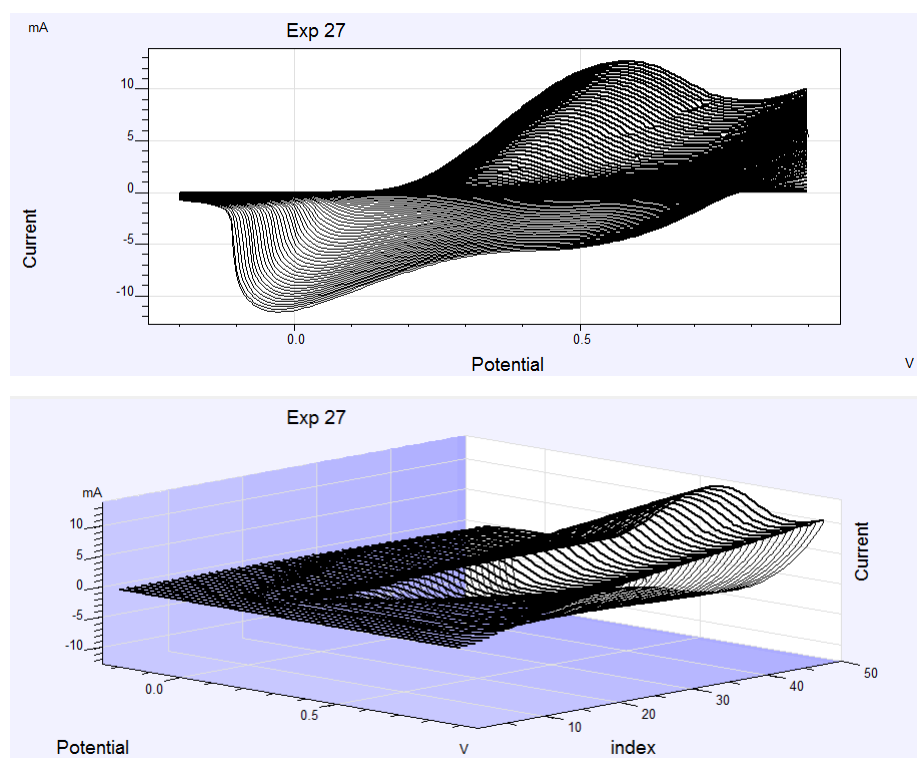
Experimento 25



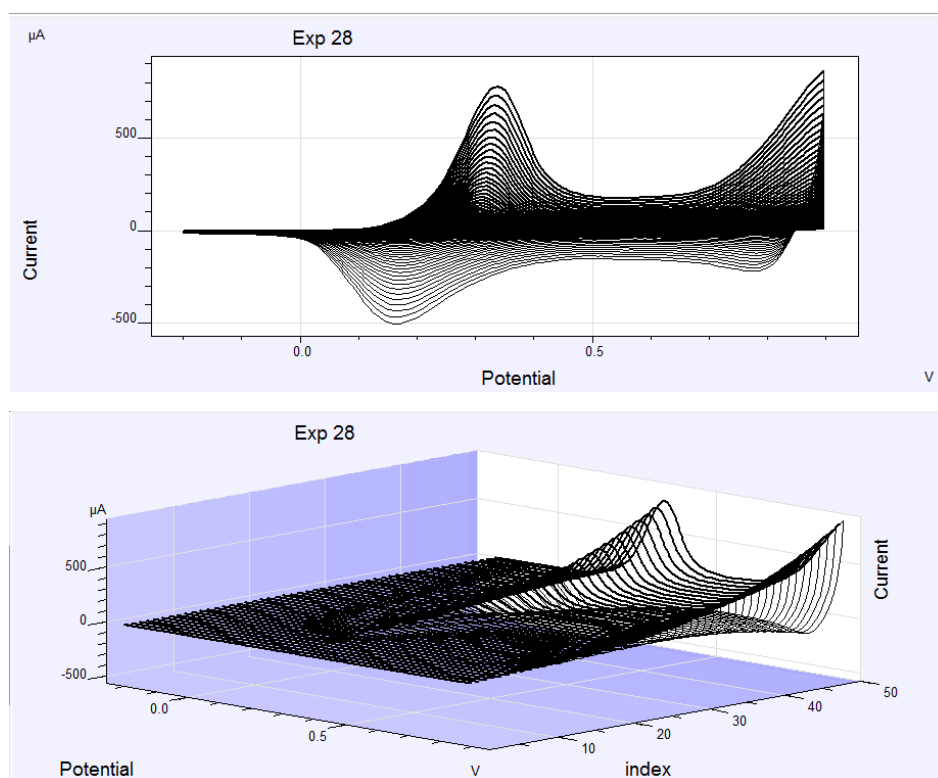
Experimento 26



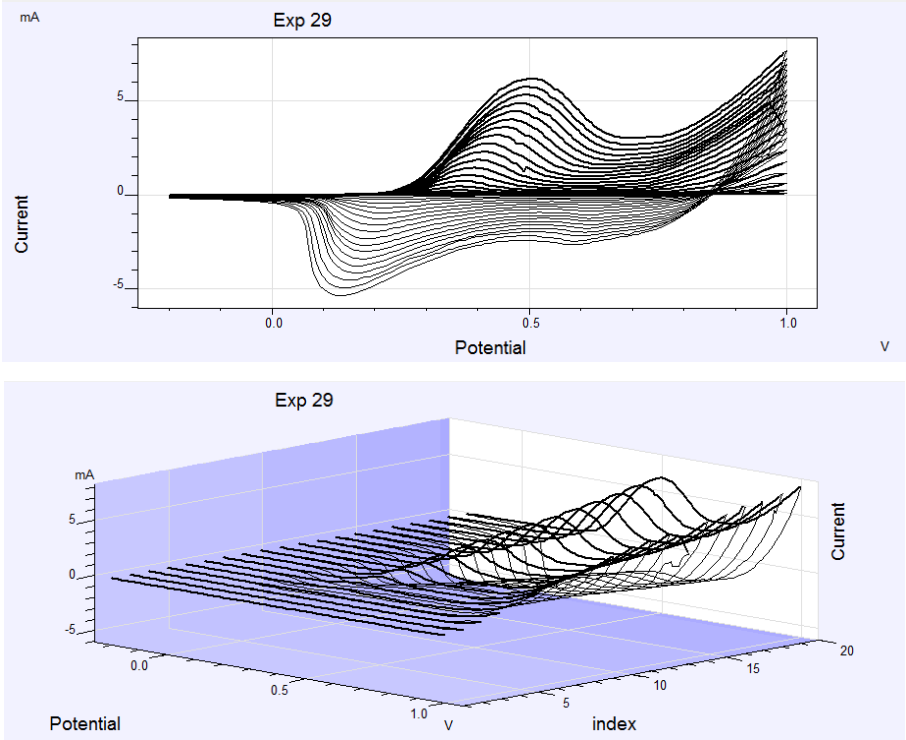
Experimento 27



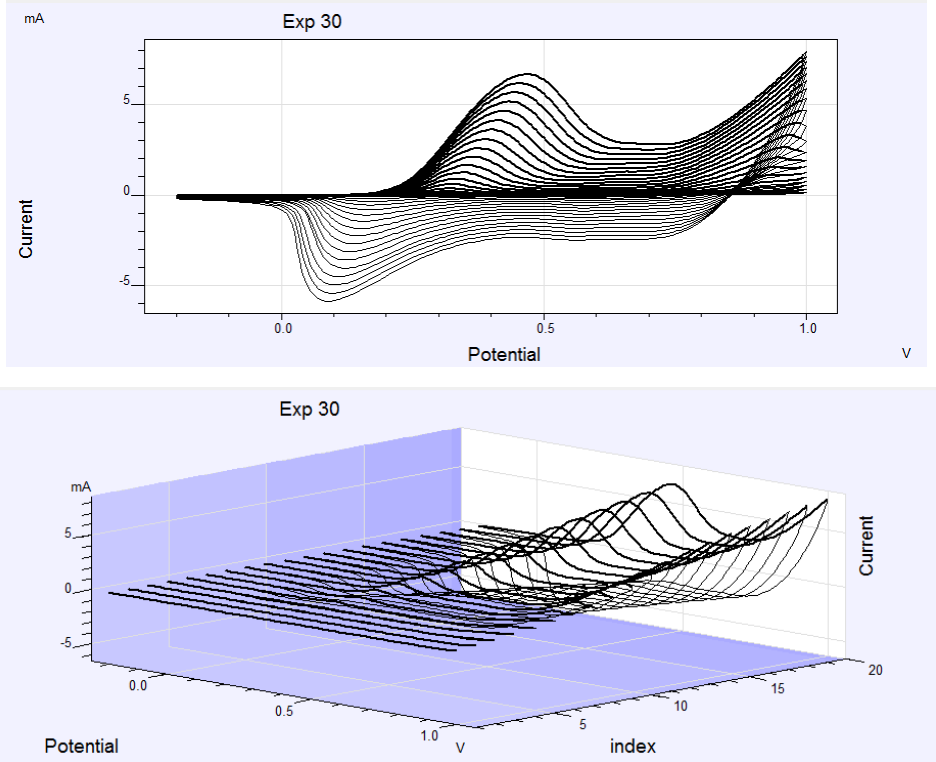
Experimento 28



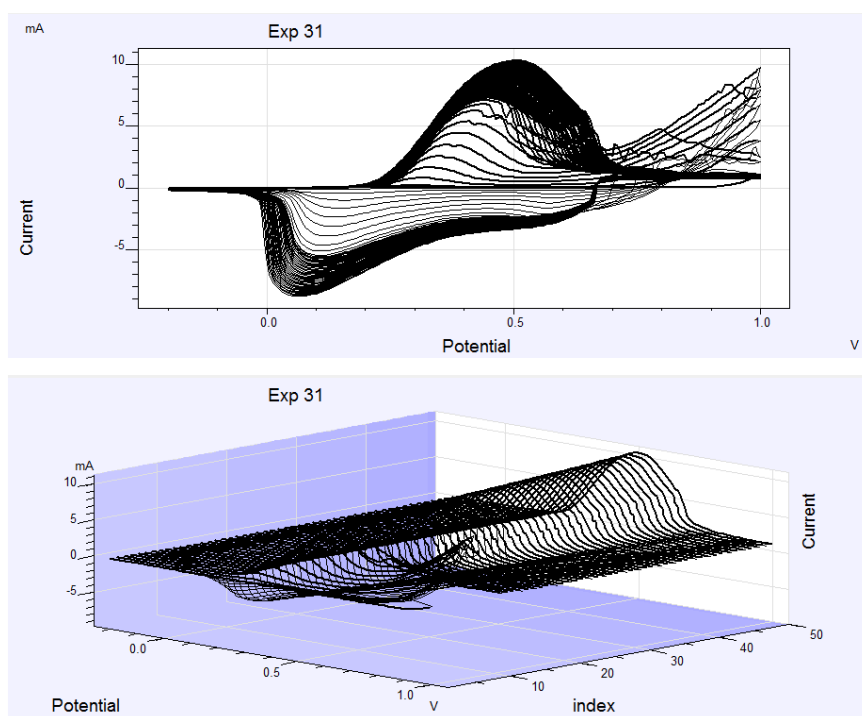
Experimento 29



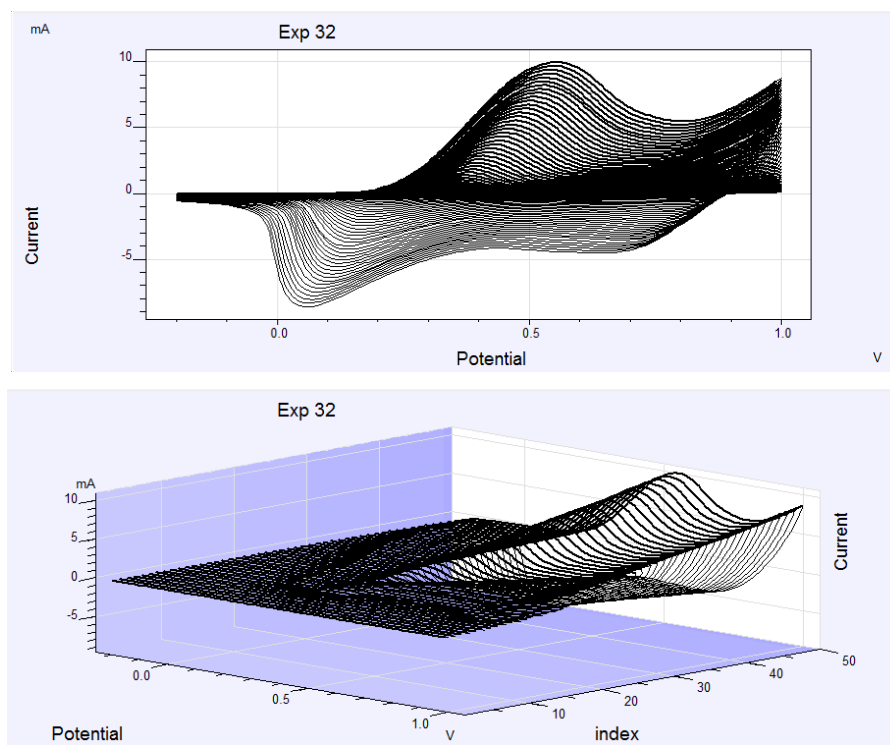
Experimento 30



Experimento 31

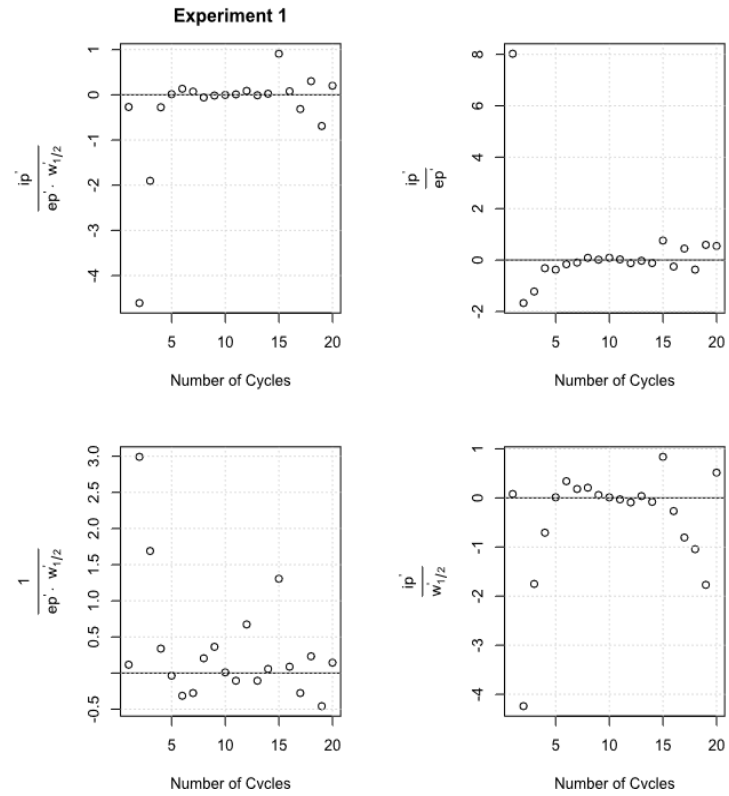


Experimento 32

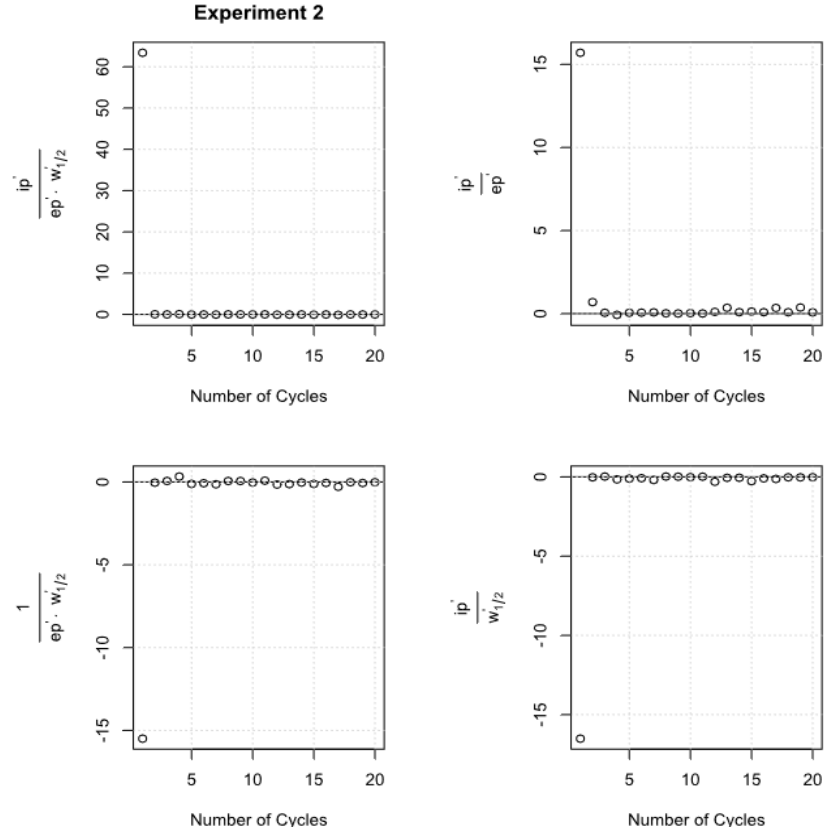


Anexo 2 – Perfil dos experimentos (1 ao 32) de acordo com as Equações 1 a 4 proposta no Artigo 1.

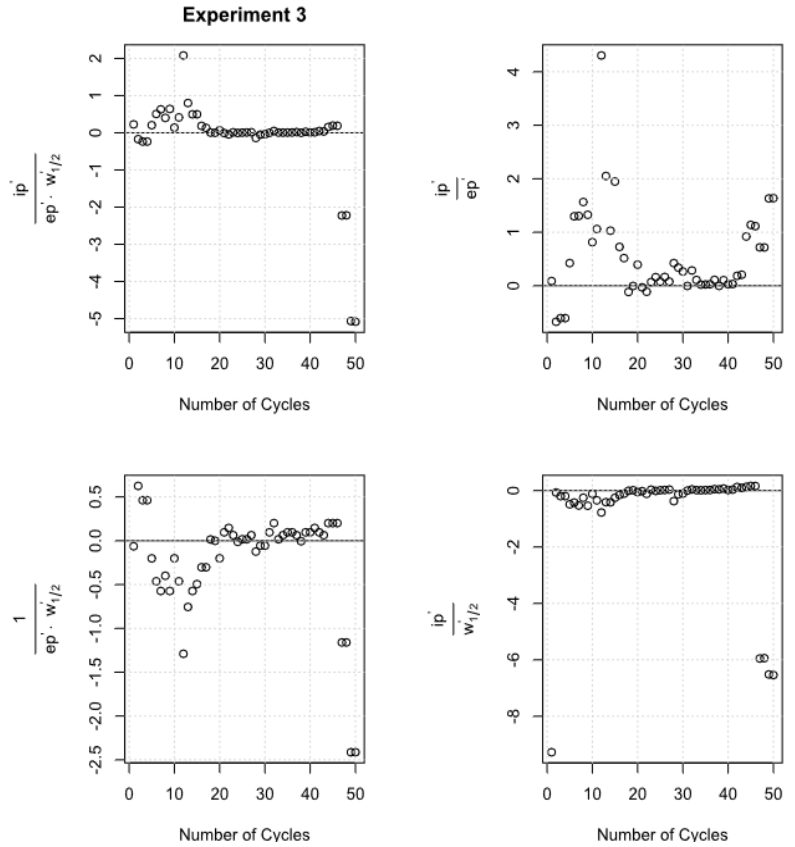
Experimento 1



Experimento 2

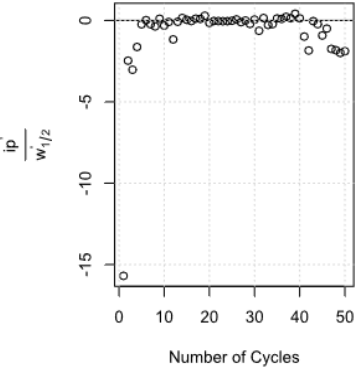
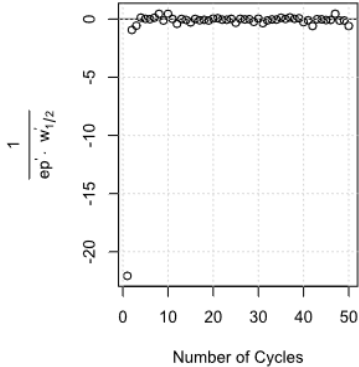
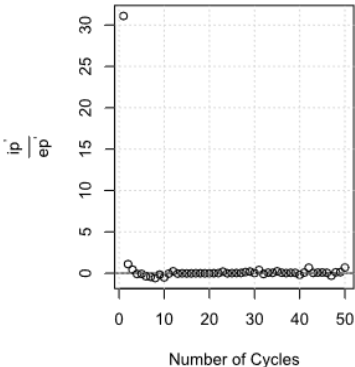
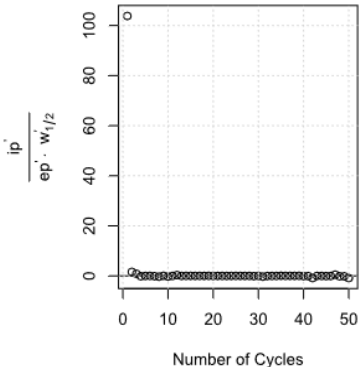


Experimento 2

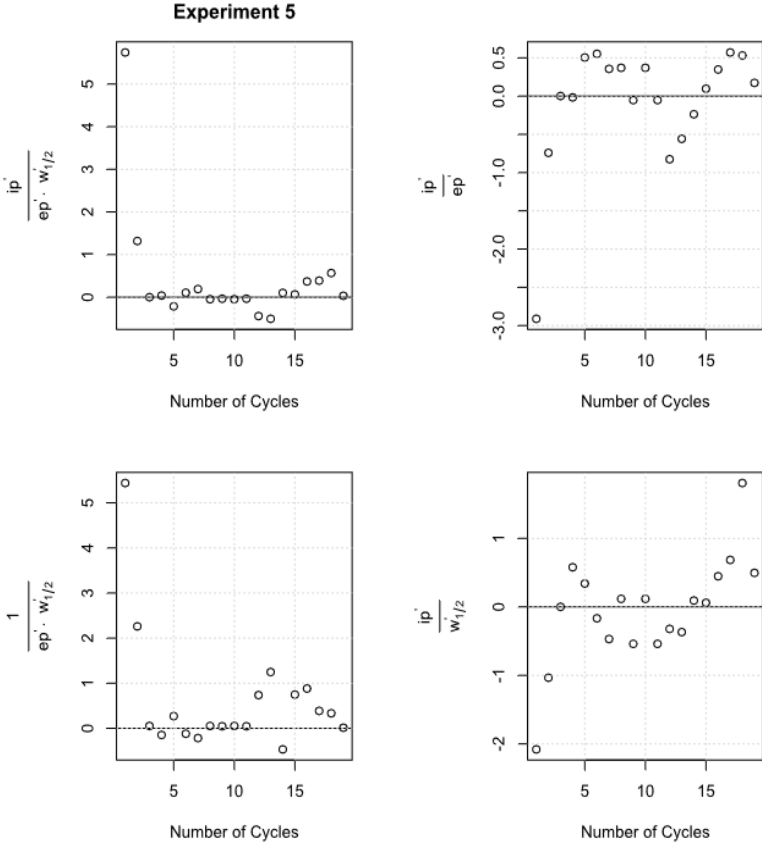


Experimento 4

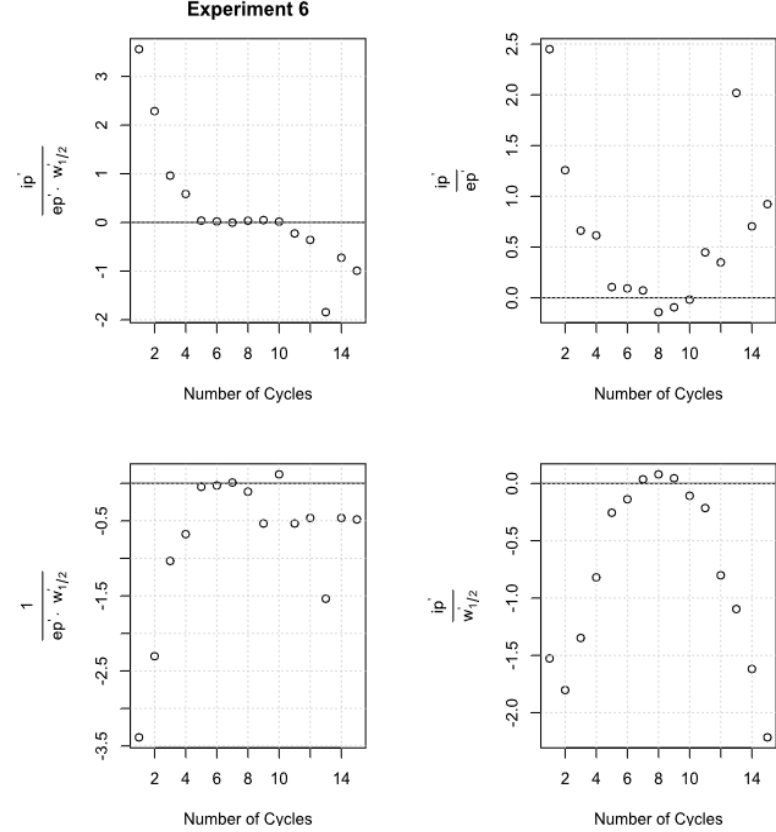
Experiment 4



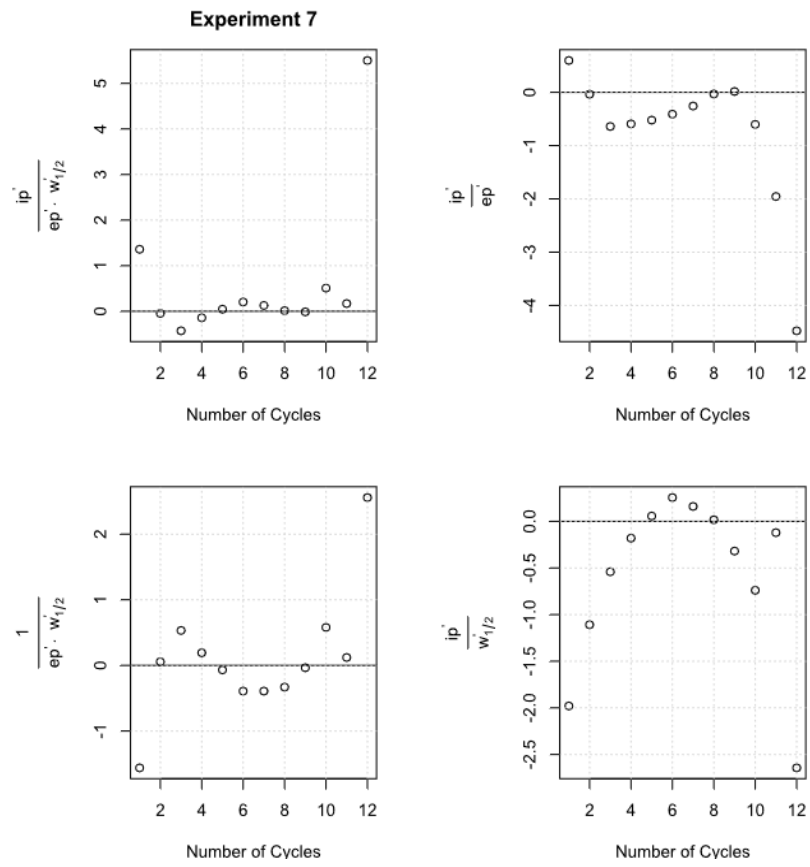
Experimento 5



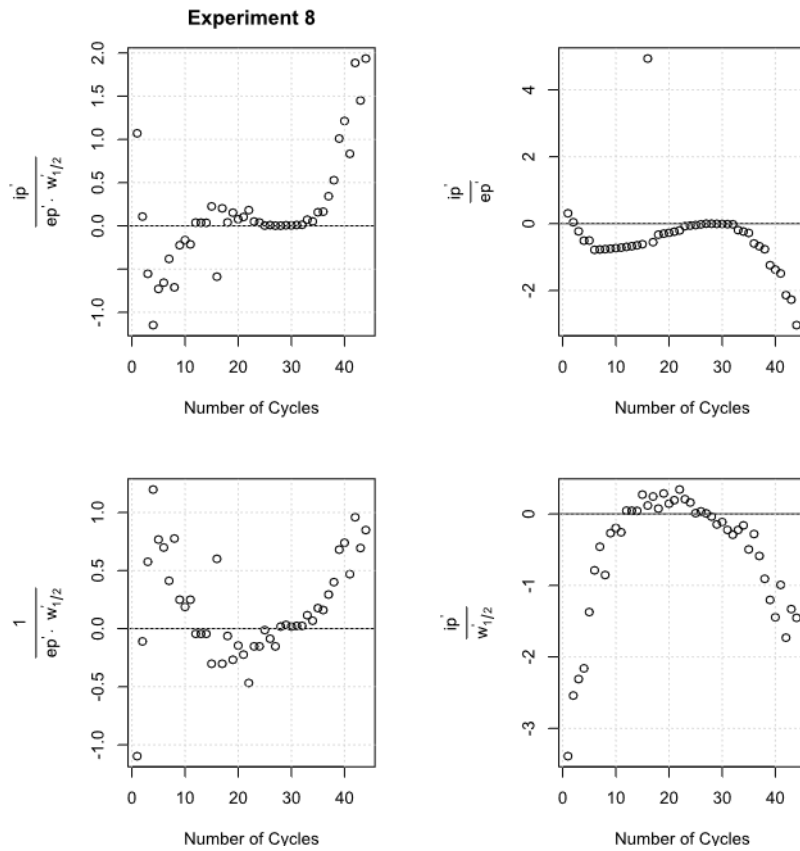
Experimento 6



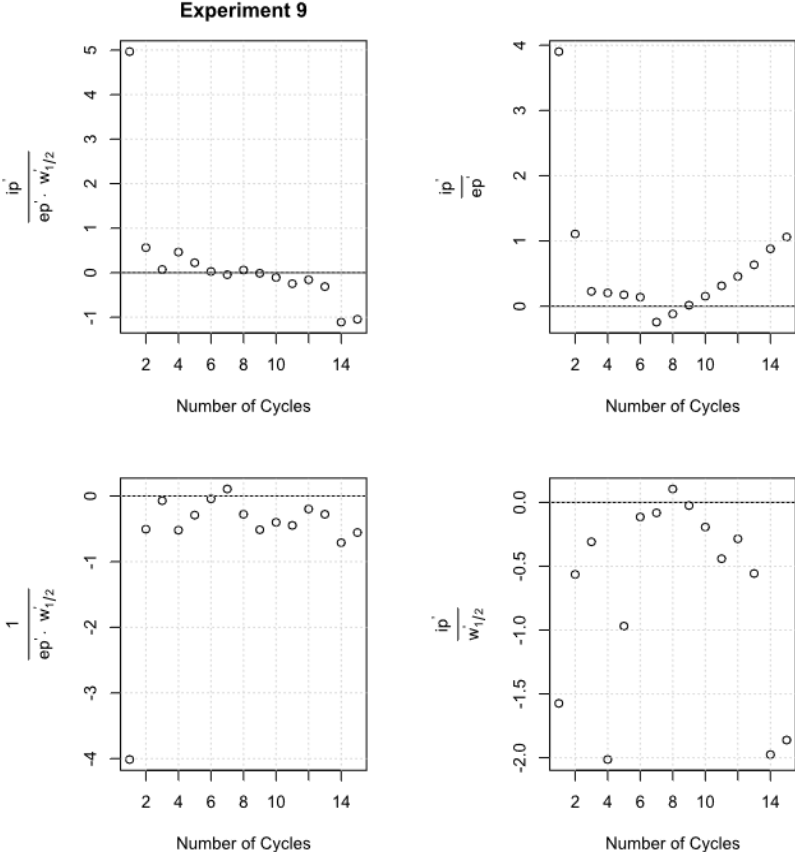
Experimento 7



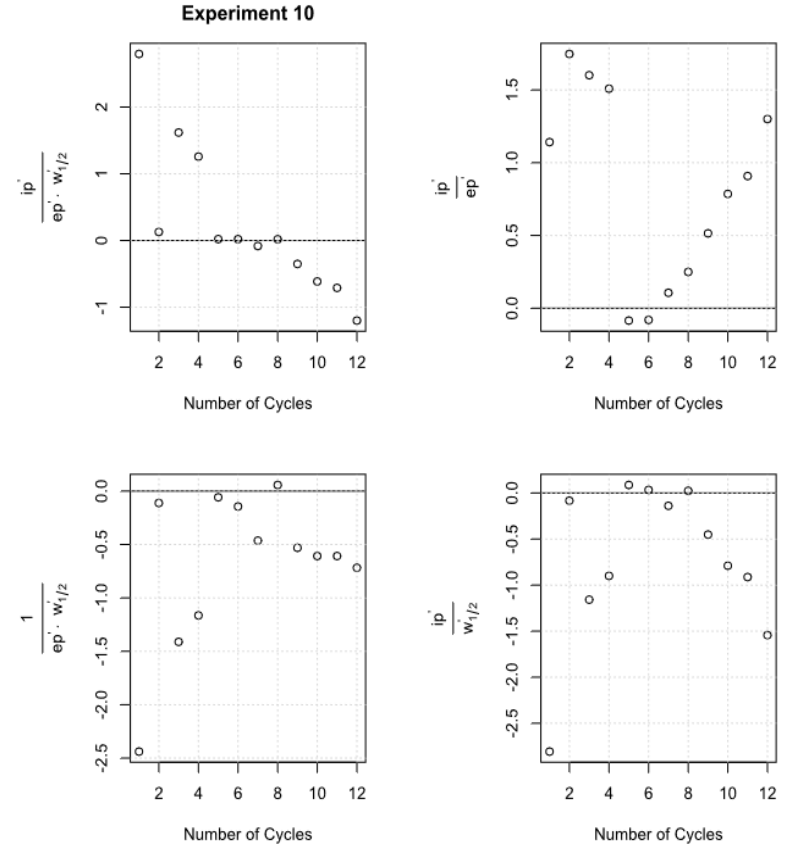
Experimento 8



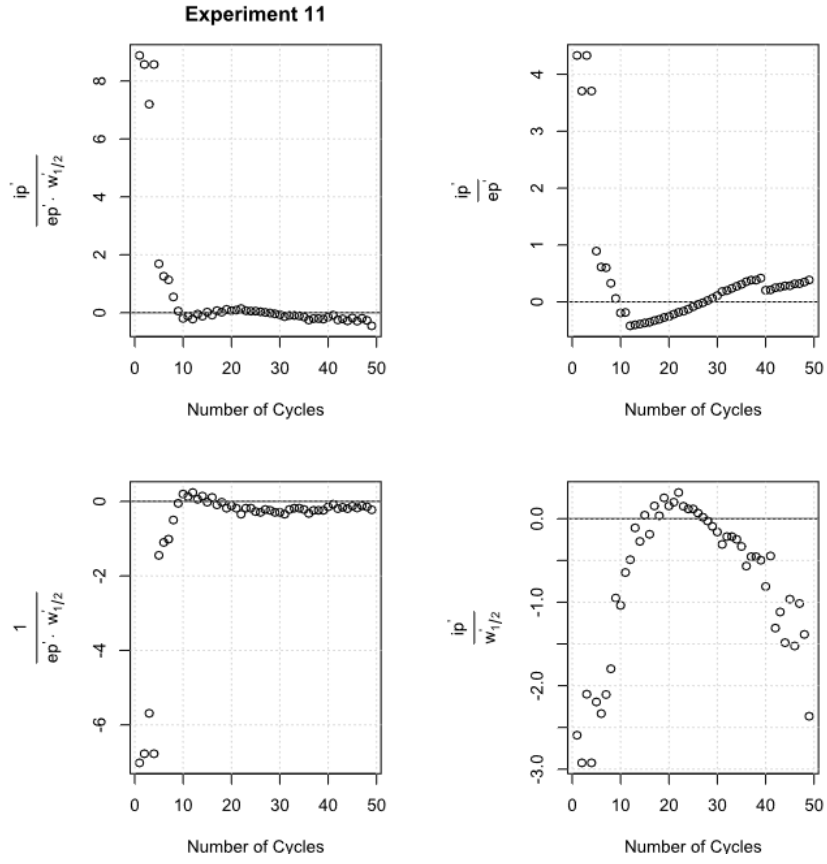
Experimento 9



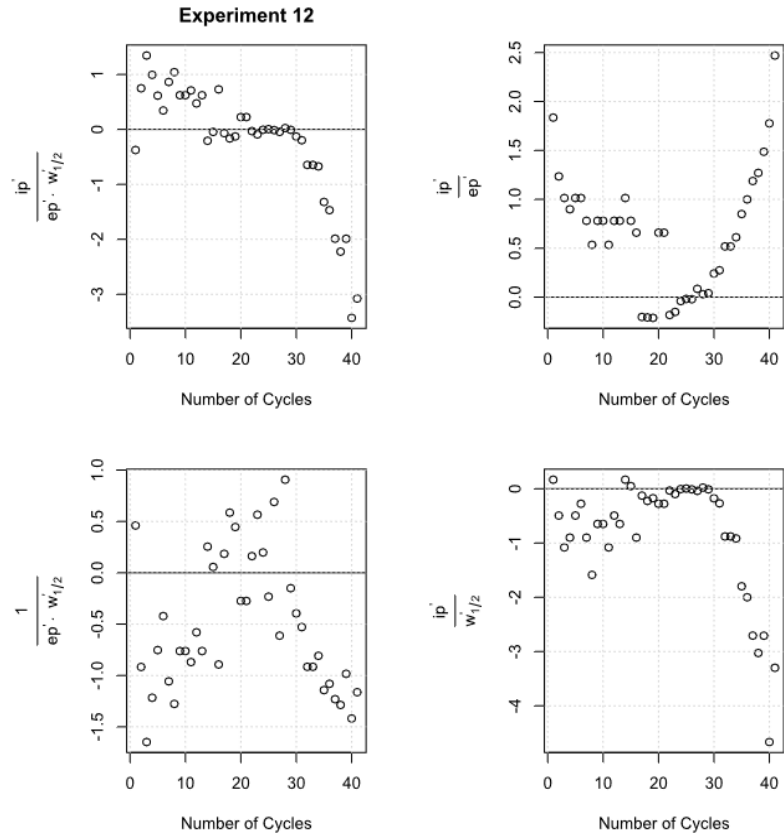
Experimento 10



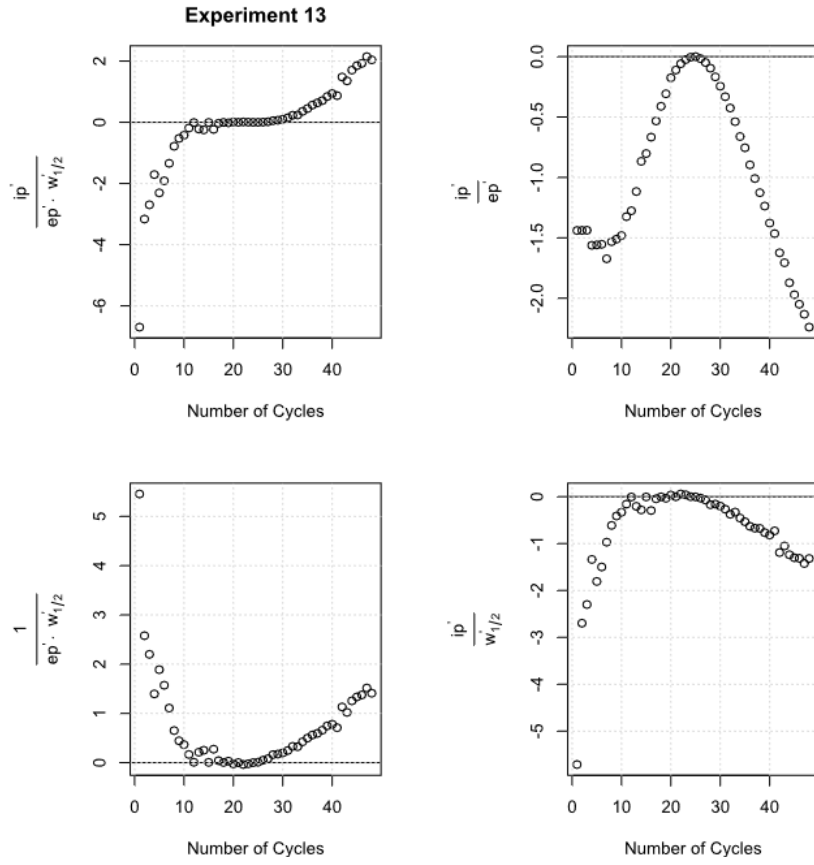
Experimento 11



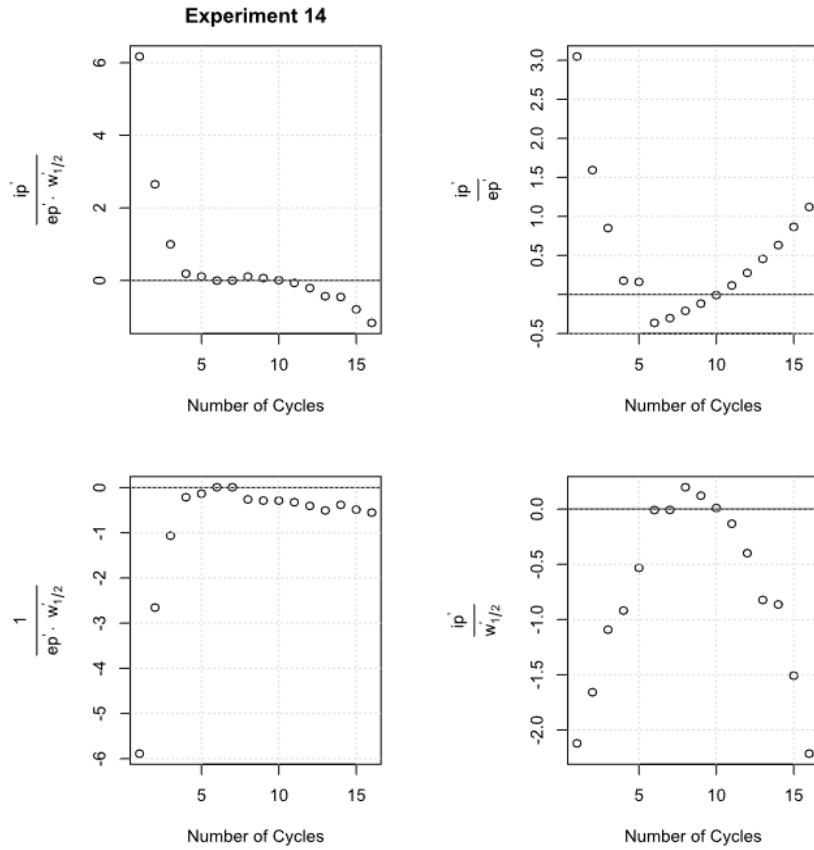
Experimento 12



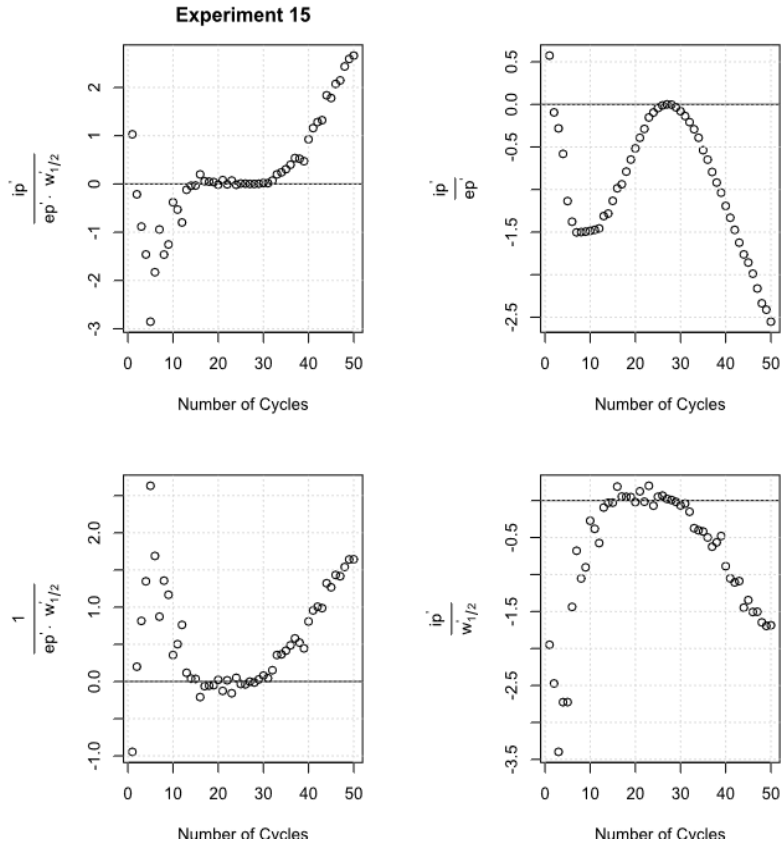
Experimento 13



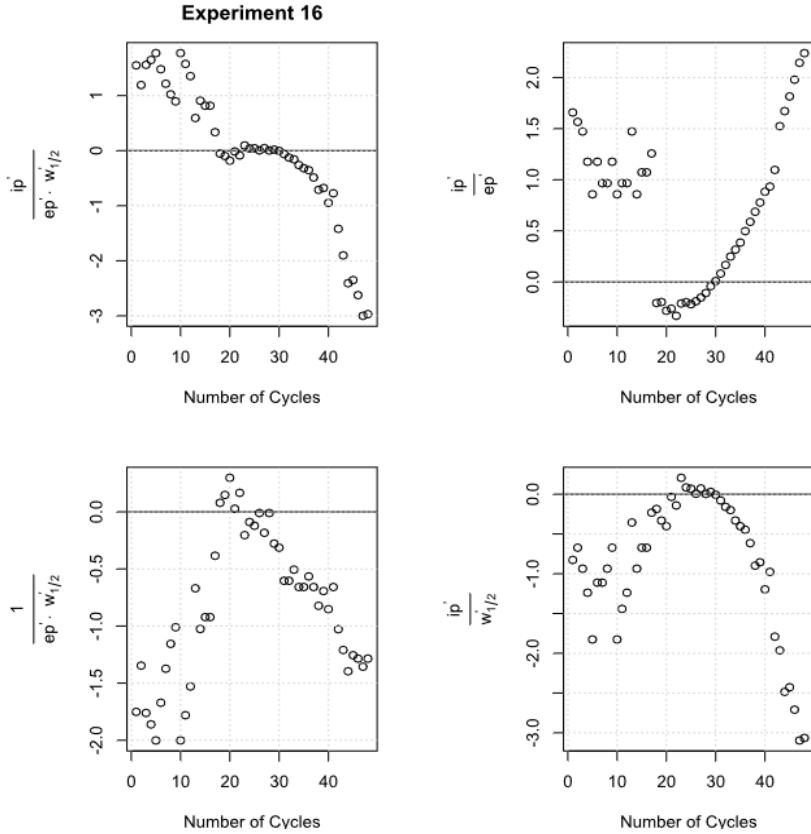
Experimento 14



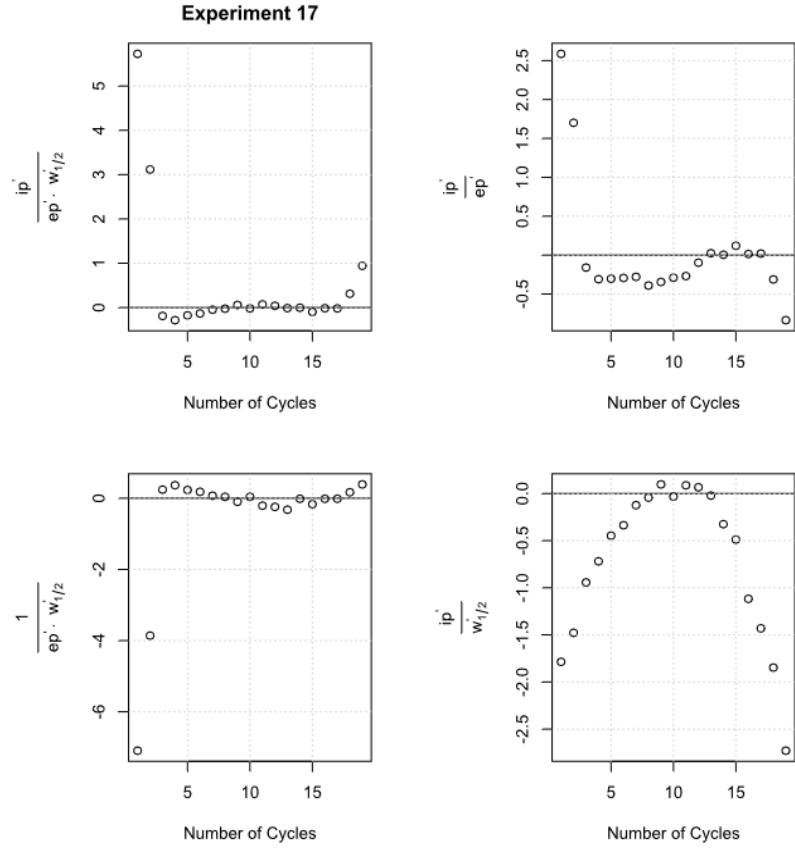
Experimento 15



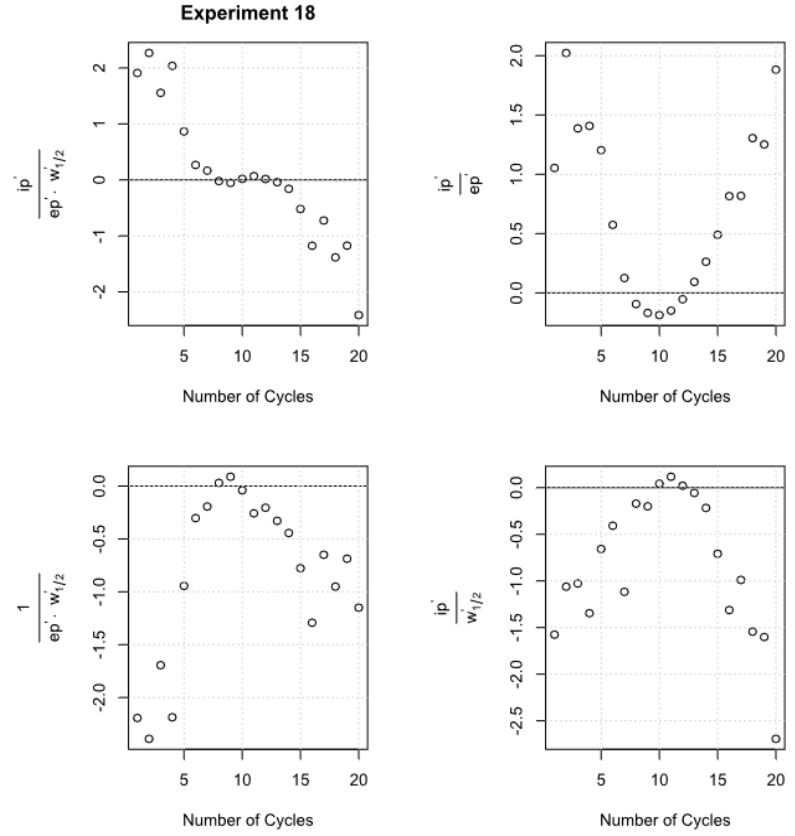
Experimento 16



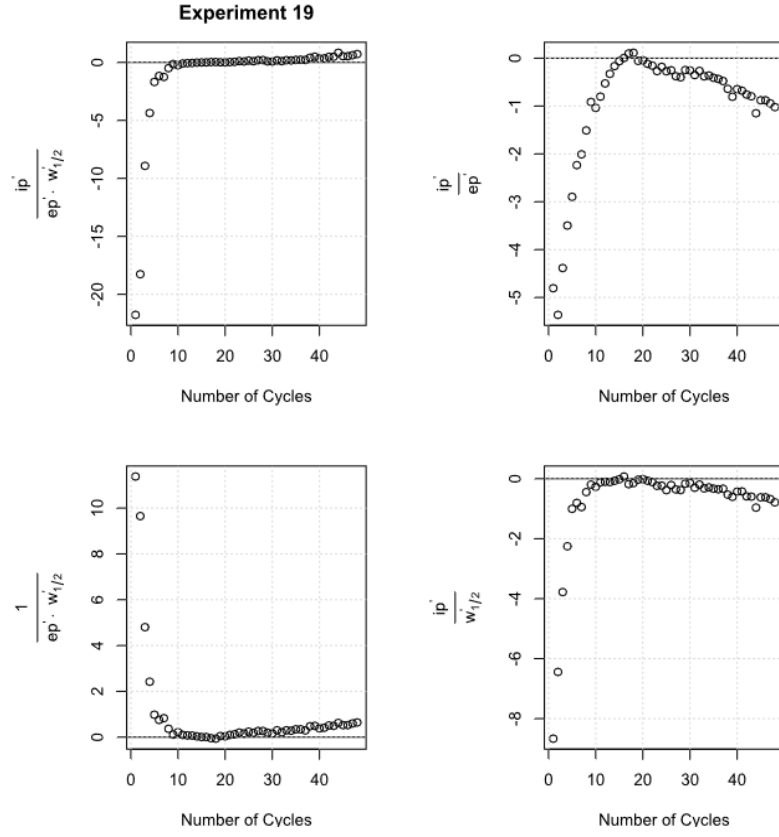
Experimento 17



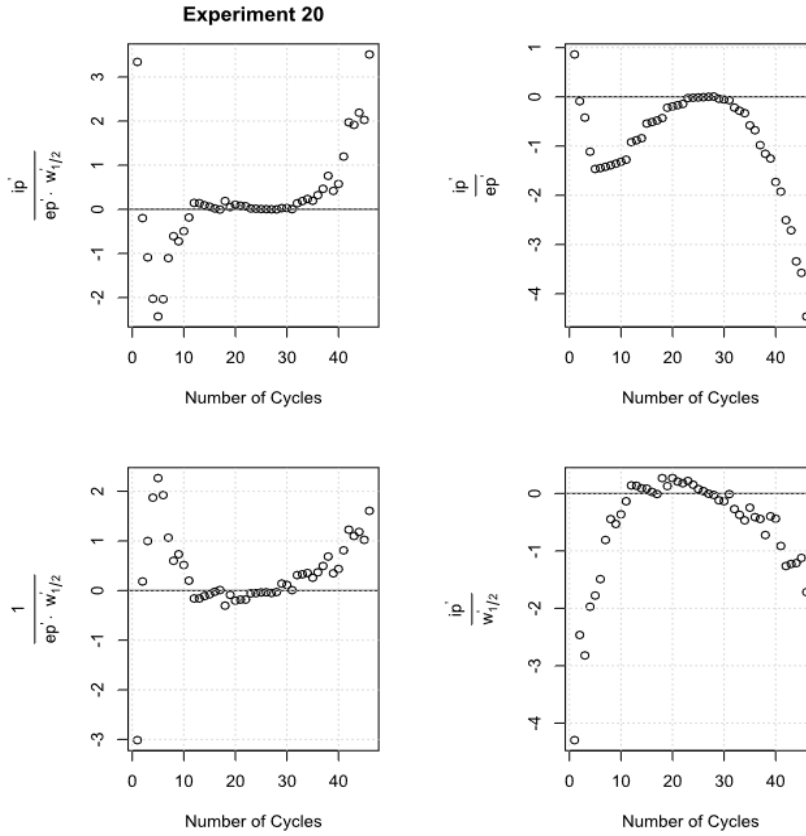
Experimento 18



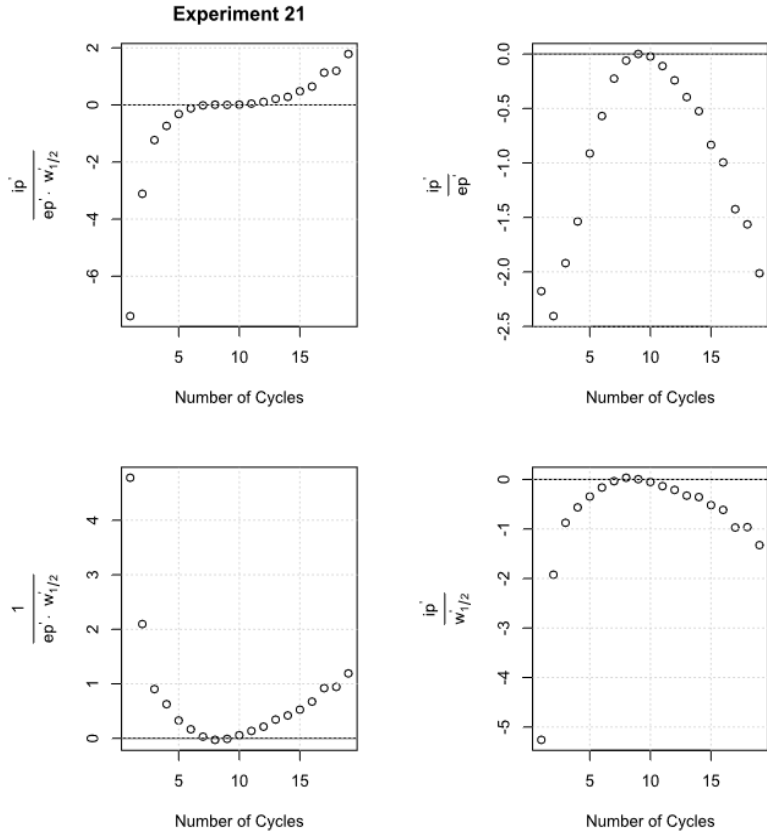
Experimento 19



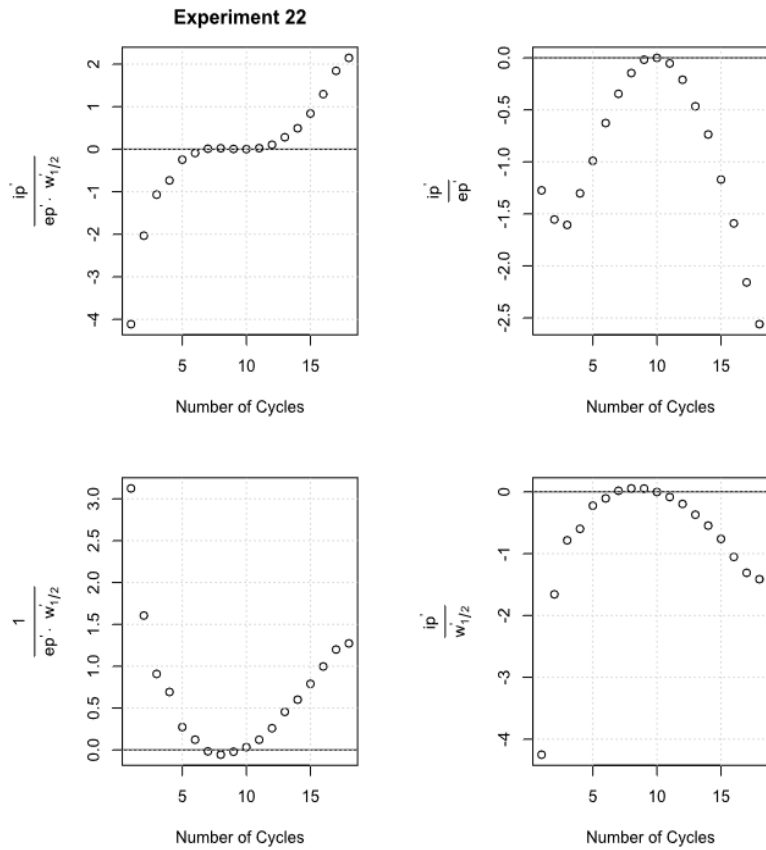
Experimento 19



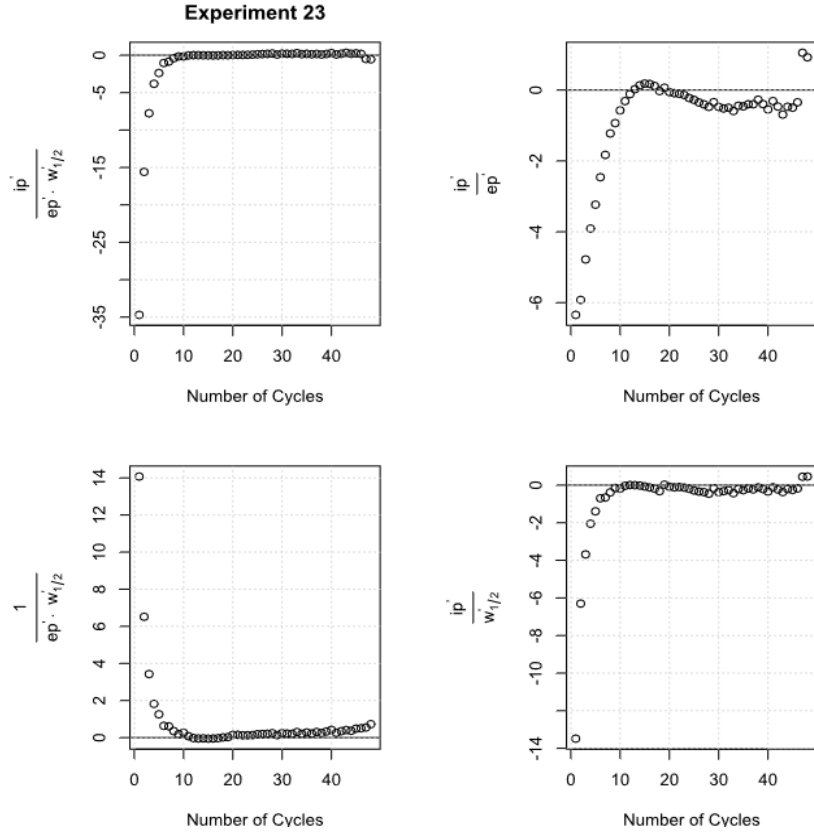
Experimento 21



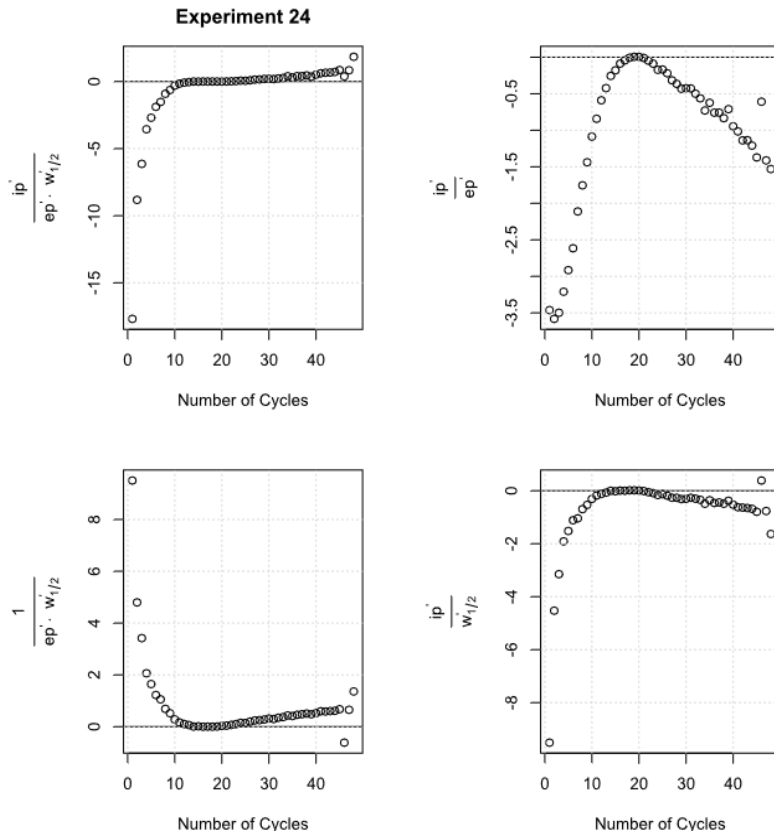
Experimento 22



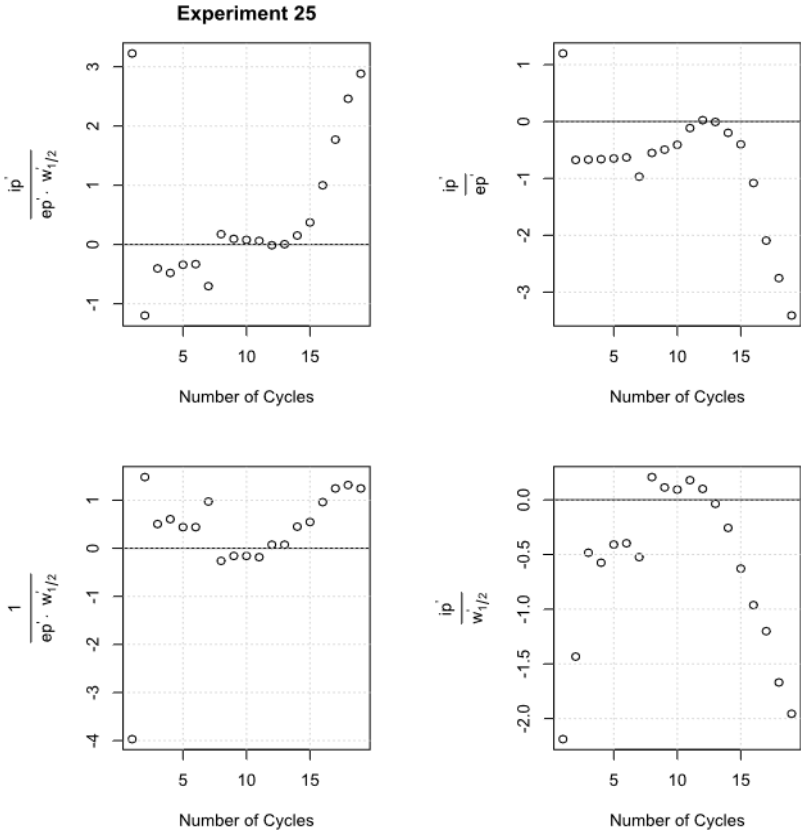
Experimento 23



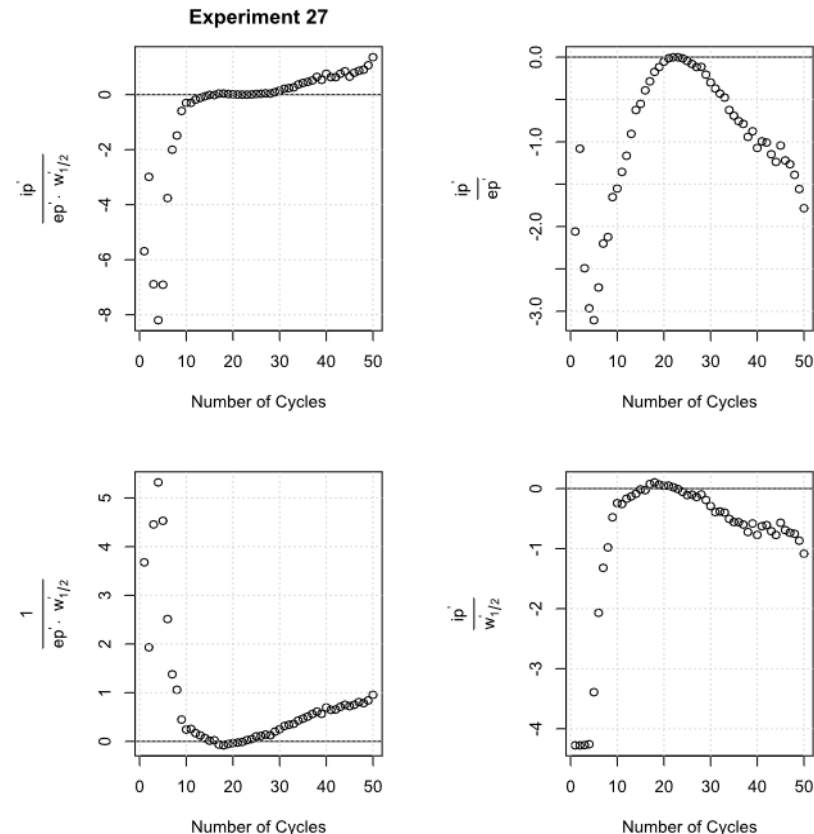
Experimento 24



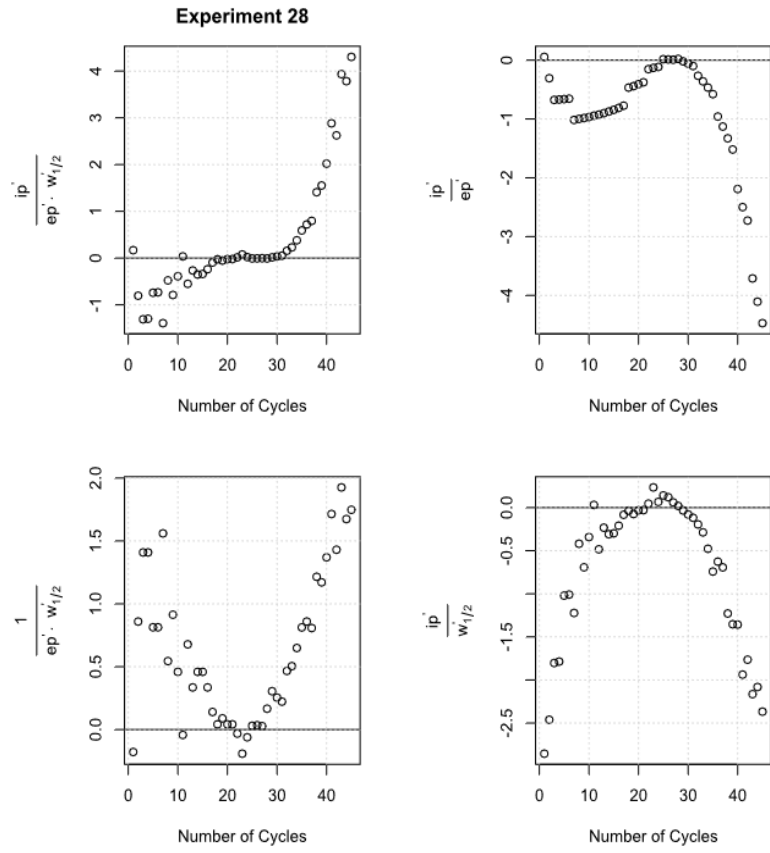
Experimento 25



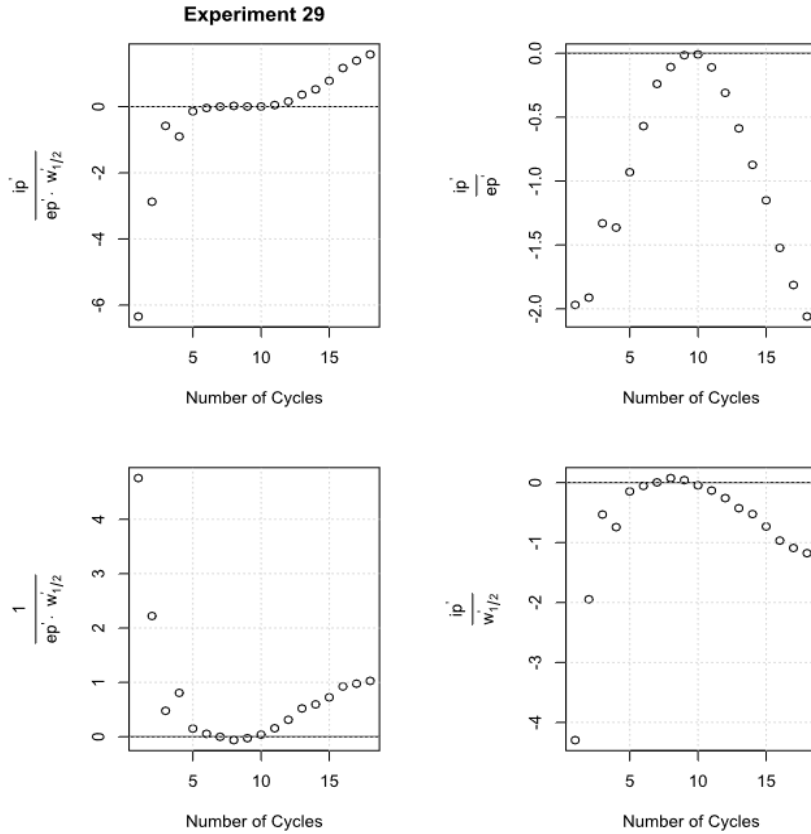
Experimento 27



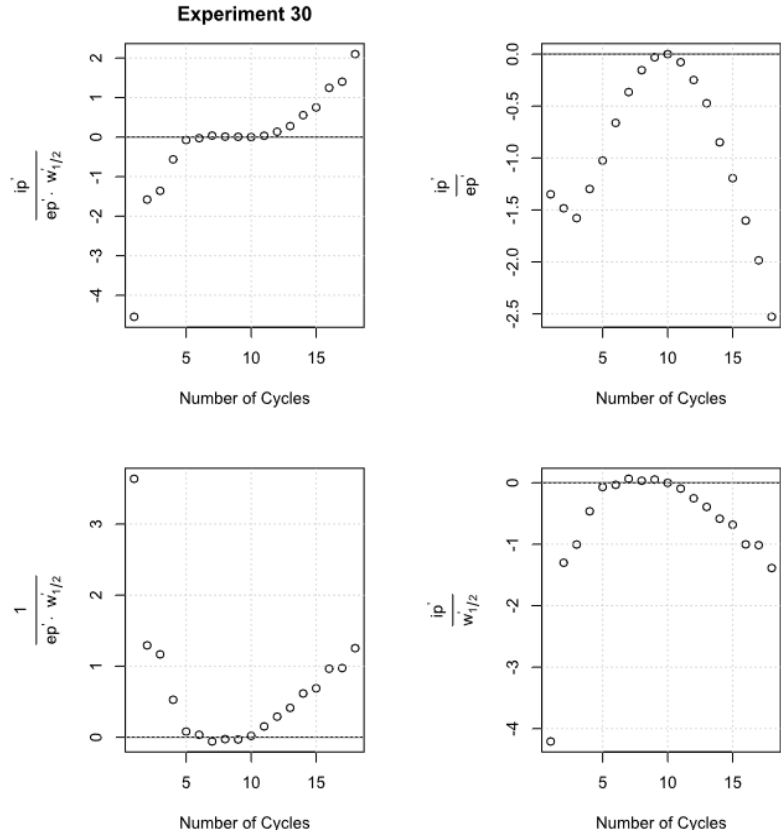
Experimento 28



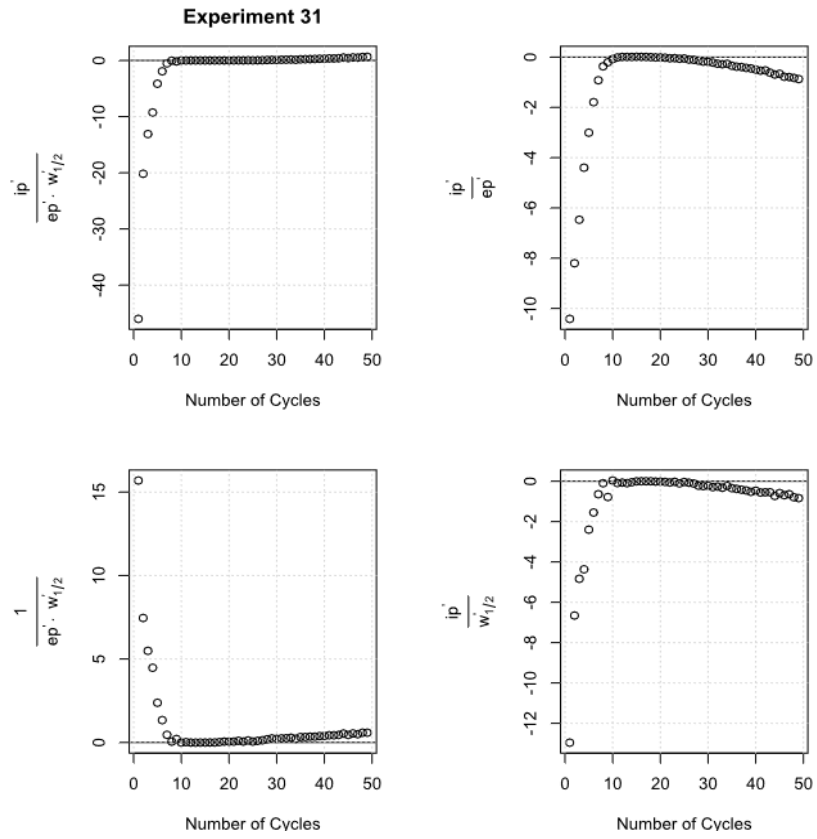
Experimento 29



Experimento 30



Experimento 31



Experimento 32

Experiment 32

