



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOSÉ CARLOS DOS SANTOS JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO
EM *CARBON DOTS* SUPORTADOS EM ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROXICLOROQUINA**

***DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON
CARBON DOTS SUPORTED ON REDUCED GRAPHENE OXIDE
FOR HYDROXICHLOROQUINE DETERMINATION***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ CARLOS DOS SANTOS JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO
EM *CARBON DOTS* SUPORTADOS EM ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROXICLOROQUINA**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliana Midori Sussuchi

Coorientador Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

***DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON
CARBON DOTS SUPORTED ON REDUCED GRAPHENE OXIDE
FOR HYDROXYCHLOROQUINE DETERMINATION***

Dissertation presented to the Graduate Programm in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237d Santos Junior, José Carlos dos
Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em *carbon dots* suportados em óxido de grafeno reduzido para determinação de hidroxicloroquina / José Carlos dos Santos Junior ; orientadora Eliana Midori Sussuchi. – São Cristóvão, SE, 2022.
95 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Grafeno. 2. Cloroquina. 3. COVID-19 (Doença). I. Sussuchi, Eliana Midori, orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de José Carlos dos Santos Júnior apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/01/2022.

Eliana Midori Sussuchi

Prof^a. Dr^a. Eliana Midori Sussuchi
Departamento de Química - UFS

Iara de Fatima Gimenez

Prof^a. Dr^a. Iara de Fatima Gimenez
Departamento de Química- UFS

Julio R. Salazar Banda

Prof. Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda
Universidade Tiradentes

RESUMO

O uso de modificadores em eletrodos de pasta de carbono (EPC) vem crescendo a cada ano, devido à possibilidade de melhorar o desempenho do eletrodo em relação a determinação seletiva de diversos analitos. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de eletrodos modificados com um material híbrido baseado em *carbon dots* e óxido de grafeno reduzido (CD-OGr), que possua um baixo custo de preparação, alta sensibilidade e rápida resposta para detecção de hidroxiquina. O óxido de grafeno (OG) foi sintetizado pelo método de Hummers modificado, em condições brandas, e reduzido com ácido L-ascórbico para obtenção do óxido de grafeno reduzido (OGr), em seguida os *carbon dots* foram sintetizados *in situ*, em matriz de OGr, utilizando como precursores ureia e glicose, por rota hidrotermal a 180 °C por 5 horas. O material híbrido obtido foi caracterizado usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de emissão fluorescente (PL), de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia Raman e vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) além de difratometria de raios x (DRX). Após as caracterizações do CD-OGr o eletrodo de pasta de carbono modificado (ECO) foi aplicado na determinação voltamétrica de hidroxiquina em comprimidos comerciais e urina sintética. Os parâmetros como meio eletrolítico, composição do ECO e parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial, foram otimizados e a caracterização eletroquímica mostrou que o eletrodo ECO apresentou maior sensibilidade na determinação de hidroxiquina que o EPC. As otimizações dos parâmetros do meio eletrolítico e da técnica de VPD resultaram em um ganho de corrente expressivo para o sinal analítico da HCQ. Com o desenvolvimento da curva analítica obteve-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 2,40 pmol·L⁻¹ e 7,99 pmol·L⁻¹, respectivamente, em um intervalo de resposta linear de 19,90 a 138 pmol·L⁻¹ e a precisão do método desenvolvido mostrou resultados satisfatórios de repetibilidade e reprodutibilidade, apresentando recuperações de 101,55 a 106,83 %, possibilitando o uso do ECO como sensor eletroquímico para a determinação de hidroxiquina.

Palavras-chave: Grafeno; Carbon dots; Hidroxiquina; Covid-19.

ABSTRACT

The use of modifiers in carbon paste electrodes (CPE) has been growing every year due to the possibility of improving the performance of the electrode in relation to the selective determination of several analytes. The objective of this work is the development of modified electrodes with a hybrid material based on carbon dots and reduced graphene oxide (CD-rGO), which has a low cost of preparation, high sensitivity, and fast response for the determination of hydroxychloroquine. Graphene oxide (GO) was synthesized by the modified Hummer's method under mild conditions and reduced with L-ascorbic acid to obtain reduced graphene oxide (rGO), then the carbon dots were synthesized in situ, on rGO matrix, using urea and glucose as precursors, by a hydrothermal route at 180 °C for 5 hours. The hybrid material obtained was characterized using scanning electron microscopy (SEM), fluorescence emission spectroscopy (PL), molecular absorption in the ultraviolet-visible region (UV-Vis), Raman and vibrational spectroscopy in the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and x-ray diffractometry (XRD). After the characterizations of CD-rGO, the modified carbon paste electrode (ECO) was applied to the voltammetric determination of commercial hydroxychloroquine tablets and synthetic urine. Parameters such as electrolyte medium, ECO composition, and parameters of differential pulse voltammetry technique were optimized and the electrochemical characterization showed that the ECO electrode has higher sensitivity in the hydroxychloroquine determination than CPE. The optimizations of the parameters of the electrolyte medium and the VPD technique resulted in a significant current gain for the analytical signal of HCQ. With the development of the analytical curve, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 2.40 pmol·L⁻¹ and 7.99 pmol·L⁻¹, respectively, were obtained in a linear response range of 19.90 to 138 pmol·L⁻¹ and the precision of the developed method showed satisfactory results of repeatability and reproducibility, presenting recoveries between 101.55 and 106.83 %, enabling the use of the ECO as an electrochemical sensor for hydroxychloroquine determination.

Keywords: *Graphene; Carbon dots; Hydroxychloroquine; Covid-19.*

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura química da hidroxiclороquina e cloroquina. Fonte: Autoria própria.....	2
Figura 2: Mecanismo de oxidação da hidroxiclороquina. Fonte: Adaptado de [12] .2	
Figura 3: Fluxograma dos métodos eletroanalíticos mais comuns. O parâmetro medido aparece entre parênteses. (I ou i = corrente, E = potencial, R = resistência, G = condutância, Q = quantidade de carga, t = tempo, vol = volume de solução-padrão, m = massa de uma espécie eletrodepositada). Fonte: [17].....	3
Figura 4: Classificação dos métodos voltamétricos e seus respectivos sinais de excitação e voltamogramas característicos. Fonte: Adaptado de [10].	5
Figura 5: Representação de uma cela eletroquímica contendo três eletrodos.....	6
Figura 6: Representação esquemática das etapas de uma medida voltamétrica. Fonte: Adaptado de [15].....	7
Figura 7: Representação dos tipos de transporte de massa de espécies químicas eletroativas em uma análise voltamétrica. Fonte: [25]	8
Figura 8: Quantidade de artigos encontrados em busca pelo termo “ <i>carbon dots</i> ” na base de dados da <i>Web of Science</i> , em 20 de dezembro de 2021.	11
Figura 9: Representação das estruturas do grafite, grafeno, óxido de grafeno e óxido grafeno reduzido obtidos por A) Oxidação e intercalação; B) Redução com ácido L-ascórbico; C) Folha de grafeno sem defeitos (<i>pristine</i>). Fonte: Autoria própria.....	14
Figura 10: Fluxograma representativo de rotas de síntese <i>ex situ</i> (em vermelho) e <i>in situ</i> (em azul). Fonte: Autoria própria.	15
Figura 11: Rota sintética para obtenção de óxido de grafeno reduzido. Fonte: Autoria própria.....	20
Figura 12: Rota de síntese do material híbrido <i>carbon dots in situ</i> em matriz de óxido de grafeno reduzido. Fonte: Autoria própria.	21
Figura 13: Representação de um eletrodo de trabalho preparado manualmente. Fonte: Autoria própria.....	23

Figura 14: Espectros de absorção molecular na região UV-visível obtidos em suspensões aquosas de OG, OGr, CD-OGr (1,0 mg mL ⁻¹) e CD. Gráfico inserido: Ampliação do espectro de absorção do OGr.....	27
Figura 15: Espectros vibracionais na região do infravermelho do CD, grafite, OG, OGr e CD-OGr, utilizando KBr como agente dispersante.	28
Figura 16: Espectro vibracional na região do IV para o CD-OGr, utilizando KBr como agente dispersante.....	29
Figura 17: a) Espectros de emissão fluorescente em diferentes comprimentos de onda de excitação, do material filtrado coletado na lavagem da síntese do material híbrido CD-OGr; b) Imagens da dispersão de CD em (1) e água destilada em (2) sob luz ambiente e luz UV 365 nm.....	31
Figura 18: Espectros Raman do grafite, OG, OGr e CD-OGr.....	33
Figura 19: Difrátogramas de raios X do OG, OGr e CD-OGr	35
Figura 20: Imagens obtida por MEV do grafite, a) OG, b) OGr e c) CD-OGr com ampliação de 6000 vezes, utilizando aceleração do feixe de elétrons de 15 kV, sob vácuo.....	36
Figura 21: Imagens de MET dos materiais a) OG e b) OGr com ampliação de 10.000 vezes.....	38
Figura 22: Voltamogramas cíclicos em solução de 1,0 mol·L ⁻¹ de KCl contendo 1,0 mmol·L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} , empregando os eletrodos a) EPC e b) ECO em diferentes velocidades de varredura.	39
Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de 0,5 μmol·L ⁻¹ de HCQ utilizando o ECO. Parâmetros experimentais: Tampão B-R (pH 8,0); tempo de pré-concentração = 180,0 s; velocidade de varredura 10,0 mV·s ⁻¹ ; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.	41
Figura 24: Voltamogramas de pulso diferencial anódico do ECO na presença de 0,5 μmol·L ⁻¹ de HCQ em tampão BR, fosfato e borato. Parâmetros experimentais: teor de modificante = 5,0%; pH 8,0; tempo de pré-concentração = 180,0 s; v = 10,0 mV s ⁻¹ ; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.....	43

- Figura 25: Gráfico de distribuição das espécies da hidroxicloroquina com a variação de pH. Fonte: Disponível em: <<https://chemicalize.com>>. Acessado em 07/01/2021. 44
- Figura 26: (a) Voltamogramas de pulso diferencial anódico na presença de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em tampão B-R para diferentes valores de pH, utilizando o ECO; (b) variação da I_p e de $W_{1/2}$, em função do pH; condições do experimento: 5,0% do teor de modificante, pH 8,0, pré-concentração 180,0 s, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms. 45
- Figura 27: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do teor de modificante no ECO. Condições experimentais: pH 8,0; tempo de pré-concentração = 180,0 s, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms. 46
- Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pré-concentração, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificador = 10,0 %, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms. 48
- Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função da amplitude de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$, tempo de pré-concentração = 300,0 s; tempo de pulso 50,0 ms. 49
- Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV. 50
- Figura 31: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = (5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 \text{ e } 30,0 \text{ mV s}^{-1})$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV. 51

- Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em tampão B-R pH 8,0 para o ECO..... 53
- Figura 33: Curva de calibração para diferentes concentrações de HCQ (19,96; 39,84; 59,64; 79,36; 119,00 e 138,06 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV..... 54
- Figura 34: Variação relativa das correntes de pico anódicos para $59,6 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV; $n=10$ 57
- Figura 35: Variação relativa das correntes de pico anódicos para $59,6 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV; $n = 6$ 58
- Figura 36: Variação das correntes de pico anódicas obtidas para $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função de substâncias interferentes inorgânicas e orgânicas, em concentrações de a) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e b) $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 59
- Figura 37: Curva de calibração para diferentes concentrações de HCQ (19,96; 39,84; 59,64; 79,36; 119,00 e 138,06 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em urina sintética, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV. 61
- Figura 38: Curva de calibração obtida para diferentes concentrações de HCQ (10,00; 29,91; 49,75; 69,51; 89,19; 108,80 e 128,33 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$), para comprimidos comerciais, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV..... 63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Reagentes utilizados na parte experimental deste estudo.	18
Tabela 2: Atribuições das bandas dos grupos funcionais nos espectros de FTIR dos materiais sintetizados CD, OG, OGr, CD-OGr.	30
Tabela 3: Parâmetros operacionais otimizados para determinação voltamétrica de HCQ em tampão B-R.	52
Tabela 4: Comparativo entre os parâmetros utilizados antes e após as otimizações para determinação voltamétrica de HCQ em tampão B-R.	53
Tabela 5: Comparativo entre diferentes eletrodos modificados para determinação de HCQ.	56
Tabela 6: Resultados das recuperações referentes às concentrações de HCQ em urina sintética e seus respectivos desvios padrão relativos.	62
Tabela 7: Resultados das recuperações referentes às concentrações de HCQ em comprimidos comerciais e seus respectivos desvios padrão relativos.	63
Tabela 8: Critério de aceitação para recuperação.....	64

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Hidroxiclороquina	1
1.2	Métodos eletroanalíticos	3
1.3	Eletrodos modificados	9
1.4	Carbon dots.....	10
1.5	Óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGr)	12
1.6	Material híbrido <i>carbon dots</i> /óxido de grafeno reduzido (CD-OGr)	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Reagentes.....	17
3.2	Síntese do óxido de grafeno reduzido (OGr).....	19
3.3	Síntese <i>in situ</i> do material híbrido <i>carbon dots</i> suportados em óxido de grafeno reduzido (CD-OGr).....	20
3.4	Preparo de soluções	21
3.4.1	Soluções eletrolíticas	21
3.5	Preparação dos eletrodos de trabalho	23
3.6	Técnicas de caracterizações dos materiais sintetizados.....	24
3.6.1	Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-vísivel (UV-Vis)	24
3.6.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR).....	24
3.6.3	Espectroscopia de emissão fluorescente na região do ultravioleta-vísivel (PL)	24
3.6.4	Espectroscopia Raman	25
3.6.5	Difração de Raios X (DRX)	25
3.6.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	25
3.6.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25
3.6.8	Procedimentos eletroquímicos.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Espectroscopia de absorção molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis)	26
4.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	27
4.3	Espectroscopia de emissão fluorescente na região do ultravioleta-visível (PL)	30
4.4	Espectroscopia Raman	32

4.5	Difração de Raios X (DRX)	34
4.6	Microscopia eletrônica de varredura	36
4.7	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	37
5	Caracterização eletroquímica dos eletrodos.....	38
5.1	Detecção voltamétrica de HCQ.....	40
5.2	Influência do meio	42
5.2.1	Eletrólito de suporte	42
5.2.2	Influência do pH	44
5.3	Influência do teor do modificante	46
5.4	Influência do tempo de pré-concentração	47
5.5	Influência da amplitude de pulso.....	48
5.6	Influência do tempo de pulso	50
5.7	Influência da velocidade de varredura.....	51
6	Validação do método	54
7	Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade	56
7.1	Estudo de Substâncias Interferentes.....	58
8	Determinação de HCQ em amostras fortificadas.....	60
8.1	Urina sintética	60
8.2	Formulação farmacêutica (comprimidos)	62
9	Conclusão.....	65
10	Perspectivas do trabalho	66
11	Produção científica	66
12	Referências.....	67

"Você não pode parar e esperar o tempo ruim vir te abraçar. Acreditar que sonhar sempre, é preciso, é o que mantém os irmãos vivos".

(Pedro Paulo "Mano Brown" S. Pereira)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela oportunidade de realizar o mestrado. À CAPES, pelo auxílio financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-UFS) e a todos os professores do PPGQ-UFS e da graduação, por possibilitarem o aprendizado e a formação profissional.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) da Universidade Federal de Sergipe pelo suporte às análises e ao Departamento de Física (DFI e DFCI-UFS).

Ao Núcleo Regional de Competência em Petróleo, Gás e Biocombustíveis de Sergipe (NUPEG), à PETROBRAS e ao Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia pela infraestrutura fornecida. Agradeço também a todos os colaboradores do LCNT pelo suporte e cooperação.

À Prof.^a Dr.^a Eliana Midori e ao Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues pelo incentivo, paciência e por todos os momentos nos quais a figura de um(a) orientador(a) se fez necessária.

Aos colegas e amigos do Grupo de Pesquisa em Sensores Eletroquímicos e Nanomateriais (GPSEnM) pela ajuda, dicas e contribuições valiosas, em especial, agradeço aos amigos Fernando Macedo, Jonatas Oliveira, José Felipe, Lucas Lima, Mércia Sant'Anna, Michael Monteiro e Wandson Almeida pela parceria e cumplicidade.

Aos professores da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar o presente trabalho.

À minha esposa, Marta, e ao meu filho, José Neto, pelo apoio e amor incondicional nos momentos mais difíceis. Aos meus pais, José Carlos e Alaide Batista, minha irmã Ana Carla, meu cunhado Adson Oliveira, e sobrinhos Ane Karoline e o Moreno (Junior Mota), Lorena Franklim, Vitor Hugo e Ana Liz (Bibica), por depositar em mim a confiança e a esperança de dias melhores.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A** – Área
- AOAC** – *Association of Official Analytical Chemists* (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
- B-R** – Britton–Robinson
- CD** – *Carbon dots*
- CD–OGr** – *Carbon dots* suportados em óxido de grafeno reduzido
- CE** – Contra–eletrodo
- Covid-19** – Do inglês *Corona vírus disease – 2019* (Doença do corona vírus, descoberto no ano de 2019)
- CQ** – Cloroquina
- D** – coeficiente de difusão da espécie eletroativa
- DPP** – Diferença de potencial
- DQV** – Deposição química de vapor
- DRX** – Difração de Raios–X
- E** – Potencial
- ECO** – Eletrodo de pasta de carbono, quimicamente modificado com *carbon dots* suportados em óxido de grafeno reduzido
- E_{pa}** – Potencial de pico anódico
- E_{pc}** – Potencial de pico catódico
- EPC** – Eletrodos de pasta de carbono
- EQM** – Eletrodos Quimicamente Modificados
- ER** – Eletrodo de referência
- ET** – Eletrodo de trabalho
- FTIR** – Do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia vibracional na região do infravermelho)
- HCQ** – Hidroxicloroquina
- I_{pa}** – Corrente de pico anódica
- I_{pc}** – Corrente de pico catódico
- MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- n** – número de elétrons envolvidos na reação
- OG** – Óxido de grafeno

- OGr** – Óxido de grafeno reduzido
- OMS** – Organização mundial da saúde
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- PL** – Espectroscopia de emissão fluorescente na região do ultravioleta-vísivel
- ppb** – Partes por bilhão
- ppm** – Partes por milhão
- SARS-CoV-2** – Do inglês "*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*" (síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2)
- TC** – Tempo de pré-concentração
- TP** – Tempo de pulso
- v** – Velocidade de varredura
- VC** – Voltametria cíclica
- VOQ** – Voltametria de onda quadrada
- VPD** – Voltametria de pulso diferencial
- VVL** – Voltametria de varredura linear
- W_{1/2}** – Largura à meia-altura

1 INTRODUÇÃO

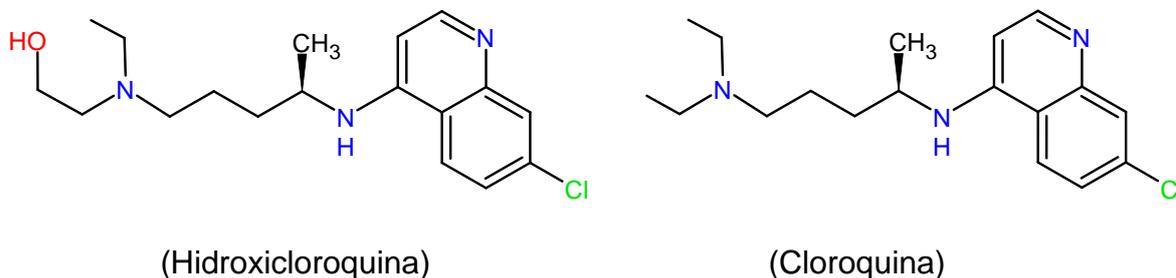
1.1 Hidroxicloroquina

Em decorrência da pandemia de covid-19, decretada em março do ano de 2020 no Brasil, causada pelo corona vírus (SARS-CoV-2), milhões de pessoas foram acometidas pela doença em todo o mundo [1]. A hidroxicloroquina (HCQ) foi indicada para o tratamento da covid-19, chegando a ter seu uso autorizado em alguns países, por autoridades governamentais, causando uma procura em massa pelo medicamento, assim como a automedicação por parte da população. Mas estudos posteriores em pacientes hospitalizados, recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), concluíram que a HCQ, dentre outros medicamentos, tem pouco ou nenhum efeito no combate à covid-19 [2,3].

O Brasil foi chamado de celeiro de covid-19, logo após ultrapassar o número de 22 milhões de pessoas infectadas por pelo menos uma das cinco variantes do SARS-CoV-2 (*alpha, beta, gamma, delta e ômicron*), alcançando a infeliz marca de mais de 611 mil vítimas fatais, associadas à covid-19 [4,5]. Após vinte e seis meses do início da pandemia, apesar das recomendações dos órgãos competentes na área da saúde, o governo brasileiro, na pessoa do atual presidente da república, ainda insiste no uso de medicamentos sem eficácia comprovada, como um tratamento precoce de uma doença cuja a única solução que se mostrou eficaz é composta por vacina, distanciamento social, uso de máscara protetora e higienização das mãos [6–8].

A HCQ é um fármaco pertencente à classe das 4-aminoquinolinas, derivada da cloroquina (CQ), que apresenta grande atividade biológica, sendo utilizada como medicamento antimalárico, no tratamento de lúpus eritematoso, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias e de pele. Na Figura 1 estão representadas as moléculas da HCQ e da CQ.

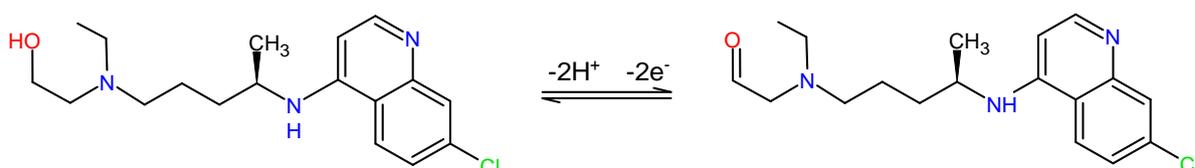
Figura 1: Estrutura química da hidroxicloroquina e cloroquina. **Fonte:** Autoria própria.



Os efeitos colaterais da HCQ no organismo humano podem estar associados à toxicidade na retina, ao desenvolvimento de anemia, à trombocitopenia ou leucopenia, bem como à distúrbios de eletrólitos séricos e/ou disfunção hepática e renal e até mesmo à morte de pacientes [3,9,10]. A HCQ é metabolizada principalmente em N-desetil-hidroxicloroquina e apresentando tempo de meia-vida, consideravelmente longo, variando de 30 a 60 dias e aproximadamente 20-25% da dose ingerida é eliminada como medicamento inalterado pela urina [11].

A HCQ é um composto eletroquimicamente ativo e pode ter sua concentração determinada por métodos eletroquímicos, que levam vantagens sobre as técnicas cromatográficas nas quais as amostras precisam de pré-tratamentos complexos, envolvendo um grande consumo de reagentes e tempo de análise relativamente longo, além de geração de uma maior quantidade de resíduos [10,12,13]. Na Figura 2 está apresentado o mecanismo de oxidação da HCQ, envolvendo dois prótons e dois elétrons, proposto por Ghoreishi *et al.* [12].

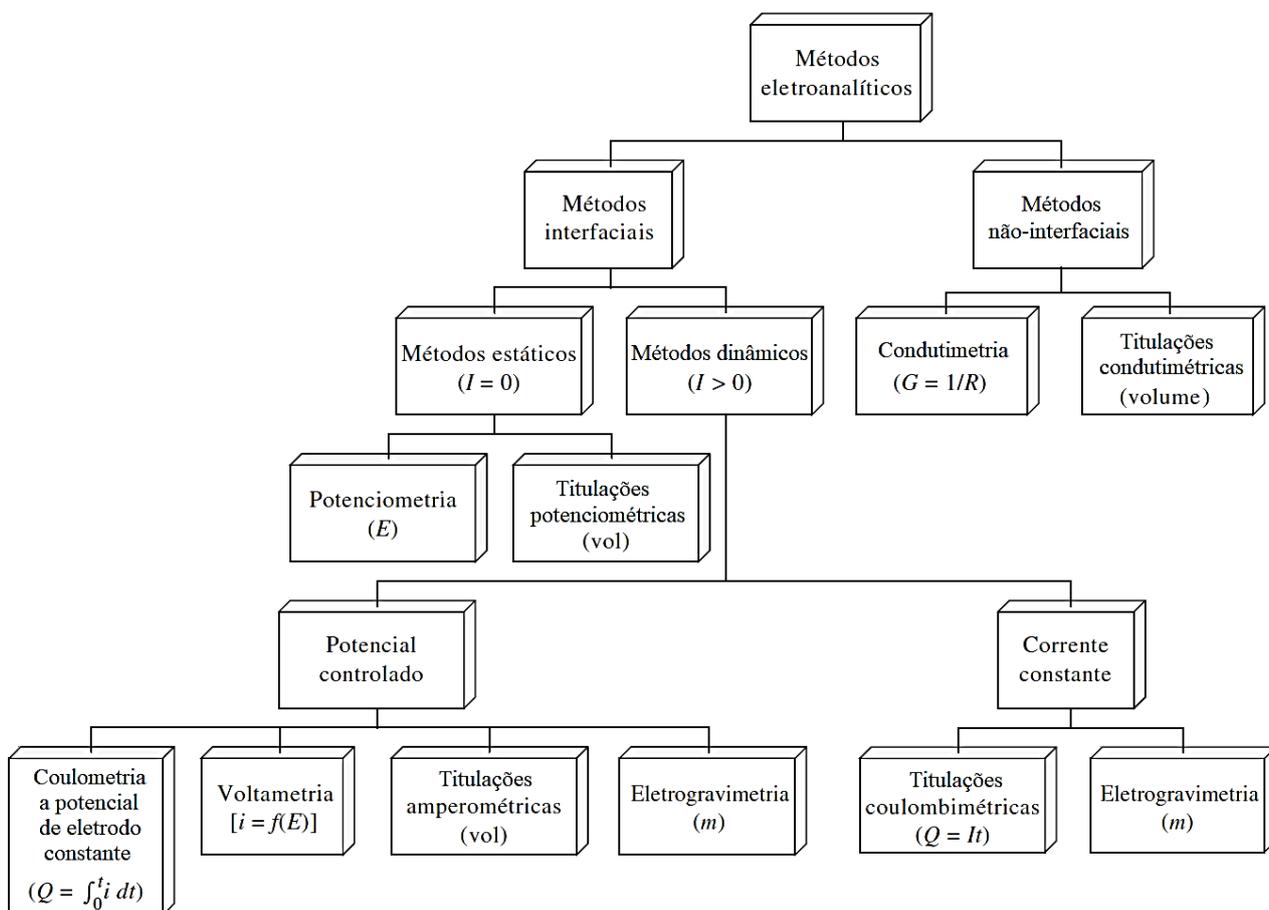
Figura 2: Mecanismo de oxidação da hidroxicloroquina. **Fonte:** Adaptado de [12]



1.2 Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos se baseiam em reações de oxidação e redução, propriedades elétricas como diferença de potencial (DDP) e intensidade de corrente elétrica (I), além de outras propriedades provenientes de interações entre as espécies químicas e os sensores eletroquímicos [14,15]. Pode-se ter informações como concentrações de analitos, velocidade de transferência de carga e/ou massa, quantidade de carga envolvida em determinada reação, entre outras variáveis, como resposta de um sistema que sofre perturbações em uma célula eletroquímica devido à DDP aplicada [16]. A Figura 3 apresenta os métodos eletroanalíticos mais comuns.

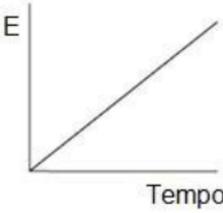
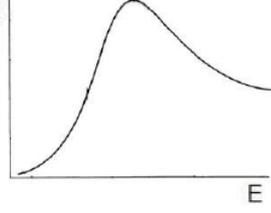
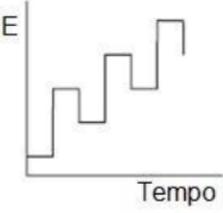
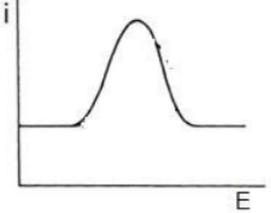
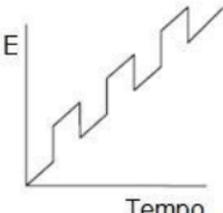
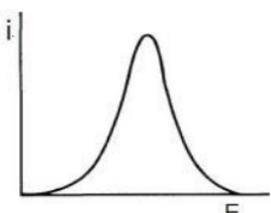
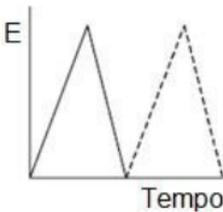
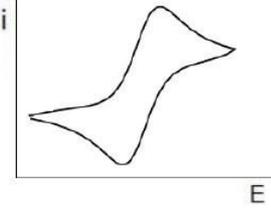
Figura 3: Fluxograma dos métodos eletroanalíticos mais comuns. O parâmetro medido aparece entre parênteses. (I ou i = corrente, E = potencial, R = resistência, G = condutância, Q = quantidade de carga, t = tempo, vol = volume de solução-padrão, m = massa de uma espécie eletrodepositada). **Fonte:** [17]



Devido ao seu amplo espectro de aplicação e por apresentarem alta sensibilidade, baixo custo, além de seletividade, especificidade e baixos limites de detecção, esses métodos podem ser empregados na identificação e quantificação de espécies químicas, seja na área de monitoramento ambiental, saúde, controle de qualidade de produtos e processos industriais, fármacos, pesticidas e outras áreas [15,17,18].

Dentre os métodos eletroanalíticos citados na Figura 3, as técnicas voltamétricas são bastante utilizadas em estudos e investigações de analitos para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. As técnicas voltamétricas mais comuns são as voltametrias de pulso diferencial (VPD), cíclica (VC), de onda quadrada (VOQ) e de varredura linear (VVL), que possuem perfis de acordo com a forma dos sinais de excitação aplicados (Figura 4) [17].

Figura 4: Classificação dos métodos voltamétricos e seus respectivos sinais de excitação e voltamogramas característicos. **Fonte:** Adaptado de [17].

Tipo de voltametria	Tipo de sinal de excitação	Forma de Sinal de excitação	Voltamograma característico
Voltametria hidrodinâmica /Polarografia	Varredura linear		
Voltametria de onda quadrada	Onda quadrada		
Voltametria de pulso diferencial	Pulso Diferencial		
Voltametria cíclica	Triangular		

Nos estudos voltamétricos, um arranjo experimental comumente utilizado pode ser representado pela Figura 5, onde uma célula eletroquímica é composta por três eletrodos: eletrodo de referência (ER), eletrodo de trabalho (ET) e eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (CE) que geralmente é constituído de material inerte, como fio de platina [15,17,19,20].

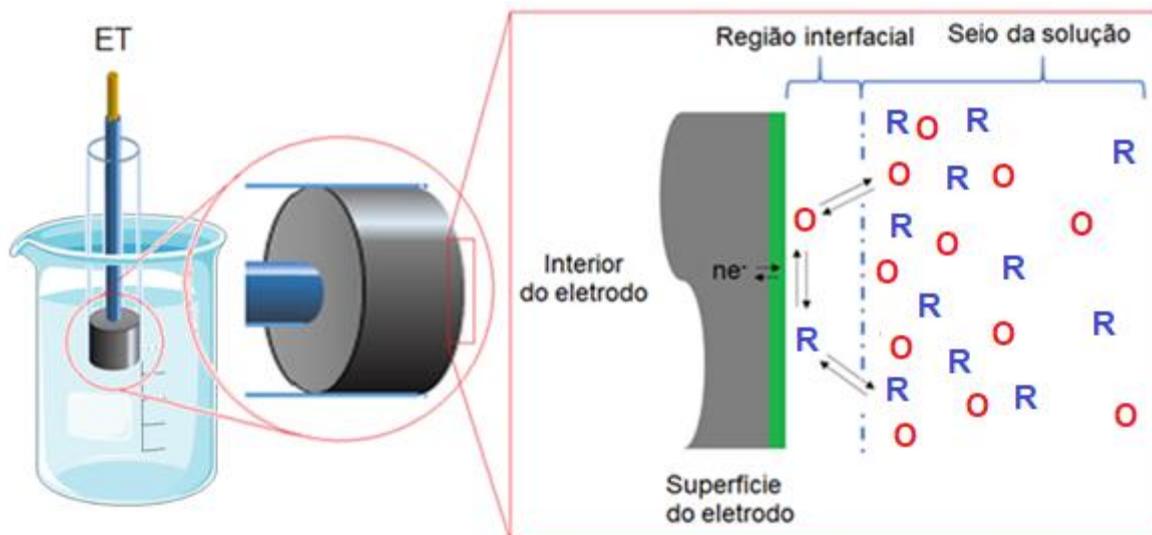
Figura 5: Representação de uma cela eletroquímica contendo três eletrodos.



A função do eletrodo de referência, representado na Figura 5, é fornecer um potencial estável e reprodutível, que se deve à composição de ambas as formas do par redox do ER, independente da composição da amostra, e é comparado com o potencial do ET. Usualmente é utilizado como ER o par redox prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ou mercúrio/cloreto de mercúrio ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) [21]. As reações de interesse ocorrem no eletrodo de trabalho promovidas pela aplicação de um dado potencial para determinar as concentrações dos analitos. Dessa forma é realizada a medida da corrente gerada por essas reações de oxidação e redução na interface do eletrodo de trabalho com a solução em questão [14,16,20,22].

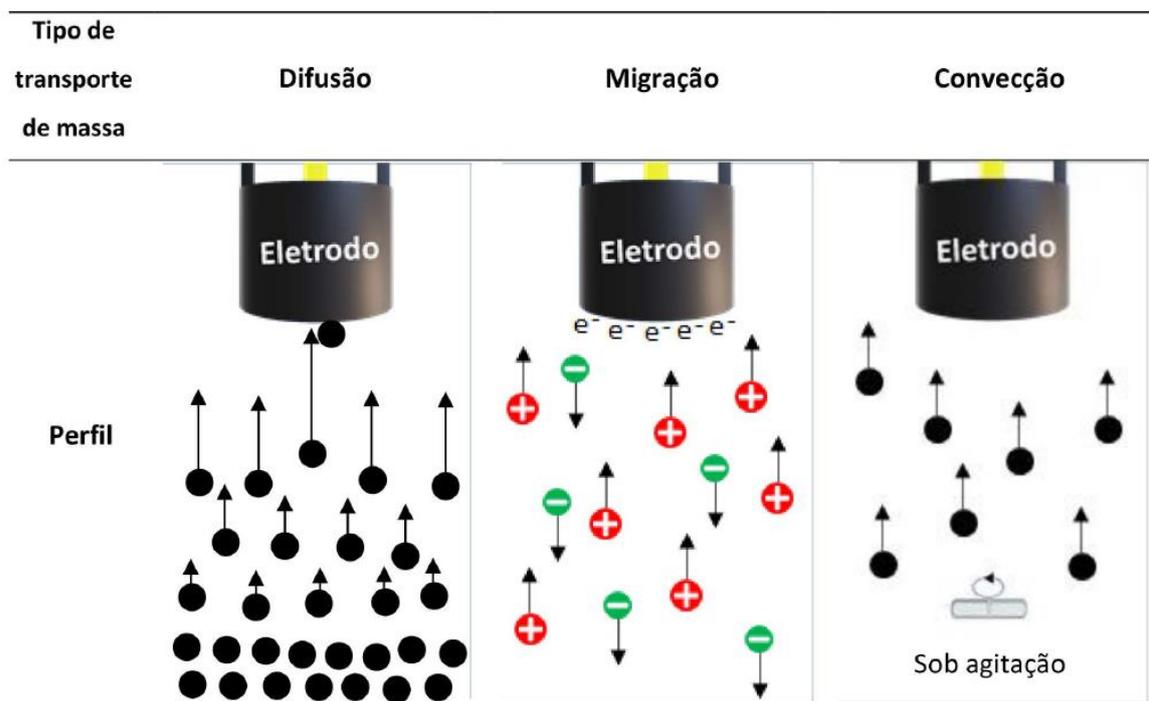
A Figura 6 representa, de maneira geral, as reações que podem ocorrer na superfície do eletrodo, como transferência da espécie investigada para a região de interface eletrodo-solução, transferência de elétrons na superfície do eletrodo e reações, como por exemplo, protonação, dimerização, decomposição, adsorção, dessorção [20,23].

Figura 6: Representação esquemática das etapas de uma medida voltamétrica.
Fonte: Adaptado de [15].



Na Figura 6 a espécie reduzida (R) ou oxidada (O), através de transporte de massa, vai do seio da solução até a superfície do eletrodo de trabalho onde ocorrem as reações de oxidação/redução. Observa-se que, para que ocorra a detecção eletroquímica é necessário que haja transporte de massa de forma contínua até a superfície do eletrodo, para que a concentração do analito não seja diminuída rapidamente na região de interface, prejudicando a relação com a concentração no seio da solução [20,24]. O transporte de massa pode ocorrer na forma de difusão, migração e convecção, sendo que estes dois últimos devem ser minimizados porque não há como separar a corrente de difusão da corrente devida à migração da espécie em análise. Na Figura 7 encontra-se uma ilustração dos tipos de transporte de massa.

Figura 7: Representação dos tipos de transporte de massa de espécies químicas eletroativas em uma análise voltamétrica. **Fonte:** [25]



A representação da Figura 7 ilustra que a *difusão* é a movimentação espontânea do analito devido à formação de gradiente de concentração, e se torna o principal movimento estabelecido. A *migração*, que é movimento de íons causado pela atração ou repulsão entre as espécies iônicas e o ET em solução, e impede a formação de um gradiente de cargas quando a concentração do eletrólito de suporte é de 50 a 100 vezes maior que a concentração do analito [15,20]. A *convecção* que é a movimentação das espécies em decorrência de perturbação mecânica do fluxo da solução, deve ser minimizada desligando a agitação mecânica e/ou borbulhamento de gás na solução [16,20,23].

Em determinações voltamétricas podem ser empregados os mais variados tipos de eletros de trabalho, como por exemplo, eletrodos metálicos, de carbono vítreo, impressos, eletrodos de pasta de carbono e outros. Para melhorar o desempenho analítico dos ET, usualmente são realizadas modificações em sua interface reacional, buscando assegurar a manutenção e a melhoria das propriedades de interesse (transferência de carga facilitada, seletividade, sensibilidade, etc.), minimizando as propriedades não desejadas (alta contribuição

da corrente capacitiva e de fundo, pequena janela de potencial, dentre outras) [25]. Neste trabalho, utilizaremos eletrodos de pasta de carbono modificado com um material híbrido, contendo *carbon dots* e óxido de grafeno reduzido.

1.3 Eletrodos modificados

Os eletrodos de trabalho podem ter sua superfície intencionalmente alterada por processos de adsorção, filmes finos ou por ligações com espécies químicas específicas, e como consequência dessa modificação, ocorrem a inibição de alguns processos e a melhora de outros como por exemplo a seletividade, que é de grande importância na determinação de compostos de interesse utilizando técnicas eletroanalíticas [23,26]. Entre os eletrodos mais utilizados para modificação encontram-se o eletrodo de carbono vítreo (ECV), o eletrodo impresso (EI) e o eletrodo de pasta de carbono (EPC). Os ECV podem ser obtidos através da pirólise de um polímero, comumente aromático. As modificações nesses eletrodos se dão em sua superfície, usualmente fazendo deposição por gotejamento do agente modificante seguida de evaporação, originando um material com excelente condutividade elétrica [27].

Os eletrodos impressos são preparados com tintas à base de carbono, como um filme condutor que é depositado sobre um único suporte inerte geralmente é utilizado cerâmica ou polímeros como PVC, em um arranjo semelhante ao do sistema convencional de três eletrodos (ER, CE e ET) [28].

Os eletrodos de pasta de carbono são obtidos a partir da mistura de grafite em pó com um composto aglutinante e não condutor, a exemplo de parafina ou óleo mineral, usualmente na proporção 7:3 (%m/m) de sólido e líquido, respectivamente. O EPC é um eletrodo atrativo devido às suas características eletroquímicas, como corrente de fundo e resistência ôhmica baixas, custo de preparação reduzido e simplicidade para renovação da superfície [29]. As nanopartículas de carbono (NPC) têm ganhado destaque, sendo utilizadas em eletrodos de pasta de carbono modificados ou eletrodos quimicamente modificados (EQM) para aplicações eletroanalíticas como detecção de metais [30], hormônios [31,32] e fármacos [29,33], dentre outros.

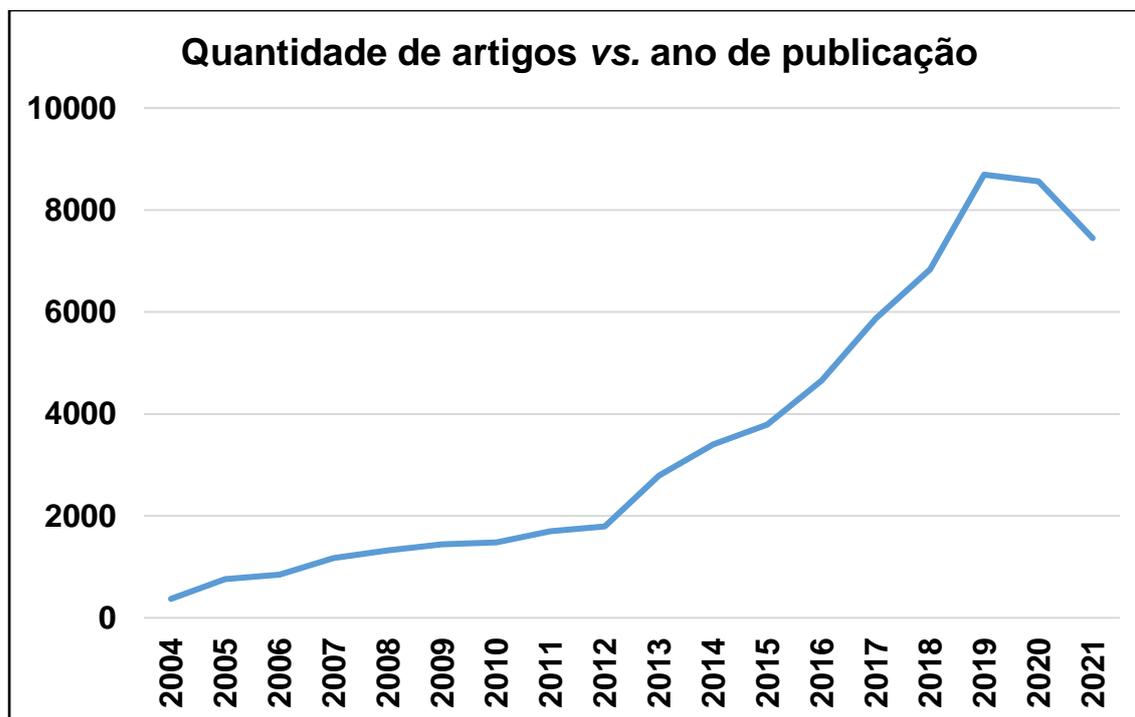
Além disso, os *carbon dots* têm sido aplicados como modificantes de eletrodos em estudos voltamétricos, com o intuito de melhorar o desempenho no processo de transferência de elétrons, na interface de detecção entre a solução contendo o analito e o eletrodo, promovendo reações de oxidação e redução [34].

1.4 Carbon dots

Os *carbon dots* (CD) foram descobertos por Xu *et al.* em 2004 [35], através de experimentos com eletroforese utilizando fragmentos de nanotubos de carbono. Os CD são nanopartículas com tamanho entre 2 - 10 nm [36–39] e podem ser sintetizados por rotas chamadas de *top-down* (quando são obtidos a partir de macro precursores, utilizando como fontes de carbono, por exemplo, bastões de grafite, carvão ativado, borra de café, fibra de carbono, etc.) ou *bottom-up*, onde são utilizadas partículas menores para se obter os núcleos de carbono (utilizando ácido cítrico, melamina, uréia e outros) [39–41].

Diversas áreas da ciência, tiveram sua atenção voltada para aplicações dos CD e é possível observar através do número crescente de publicações relacionadas com o termo “*carbon dots*”, utilizando o site de busca de periódicos da *Web of Science*. Realizou-se uma busca, pesquisando-se nos títulos dos artigos e selecionando “*All databases*” (todas as bases de dados), restringindo o tipo de documento a apenas “*articles*”. Os resultados dessa busca estão exibidos na Figura 8.

Figura 8: Quantidade de artigos encontrados em busca pelo termo “*carbon dots*” na base de dados da *Web of Science*, em 20 de dezembro de 2021.



O aumento no interesse denotado pela Figura 8 pode estar relacionado às propriedades como resistência à fotodegradação, emissão de luminescência ajustável (dependendo dentre outros fatores do solvente e de heteroátomos dopantes), rotas de síntese relativamente simples, baixo custo de preparação, baixa citotoxicidade e excelente biocompatibilidade, que fazem dos CD uma alternativa promissora para substituir os *quantum dots* (QD), que possuem síntese com custo relativamente mais alto e utiliza íons metálicos tóxicos [36,37,42,43]. Dessa forma, os CD têm um largo campo de aplicações, como por exemplo, marcadores em bioimagem celular, modificantes em sensores eletroquímicos, oprônica, catálise, fotocatálise, diodos emissores de luz, células solares e *drug delivery* [36–38,44–51]. A redução na quantidade de artigos para os anos de 2020 e 2021 que provavelmente se deve à pandemia do Covid-19.

Muitos dos artigos relacionados aos *carbon dots* foram aplicados em sensores eletroquímicos, para análises voltamétricas como o trabalho publicado por Li *et al.* [52], para detecção de nitrito empregando VPD, exibindo uma faixa linear de detecção de 0,70 a 8.000,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Wei

et al. [53] aplicaram os CD como modificante, em eletrodo de carbono vítreo para detecção de hidrazina, obtendo uma faixa linear de detecção de 0,99 a 5.903,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,024 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.5 Óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGr)

Assim como os *carbon dots*, o grafeno e seus derivados também são nanopartículas e possuem algumas propriedades que atraem a atenção dos pesquisadores, como alta resistência mecânica e condução de eletricidade semelhante aos metais, devido aos seus elétrons que se encontram em um sistema π -conjugado facilitando a mobilidade eletrônica, além de possuir grande área superficial e espessura monoatômica [54,55].

Na literatura podem ser encontrados trabalhos envolvendo os derivados do grafeno, como o realizado por Phukan [56], com óxido de grafeno reduzido no estudo das propriedades de semicondutores e no trabalho de Shao [57] é possível conhecer estudos eletroquímicos de sensores baseados em derivados de grafeno, atuando como biossensores para detecção de hormônios. Dentre outras aplicações do OGr temos também o uso como modificante em sensores para determinações eletroquímicas de hormônios e metais [56,58], podendo também ser aplicados como estabilizador de emulsões devido à sua característica anfifílica, com uma rede hidrofóbica hexagonal de carbonos e grupos oxigenados em partes do plano basal e nas bordas, que podem fazer ligações de hidrogênio com a água (hidrofílicos) [31].

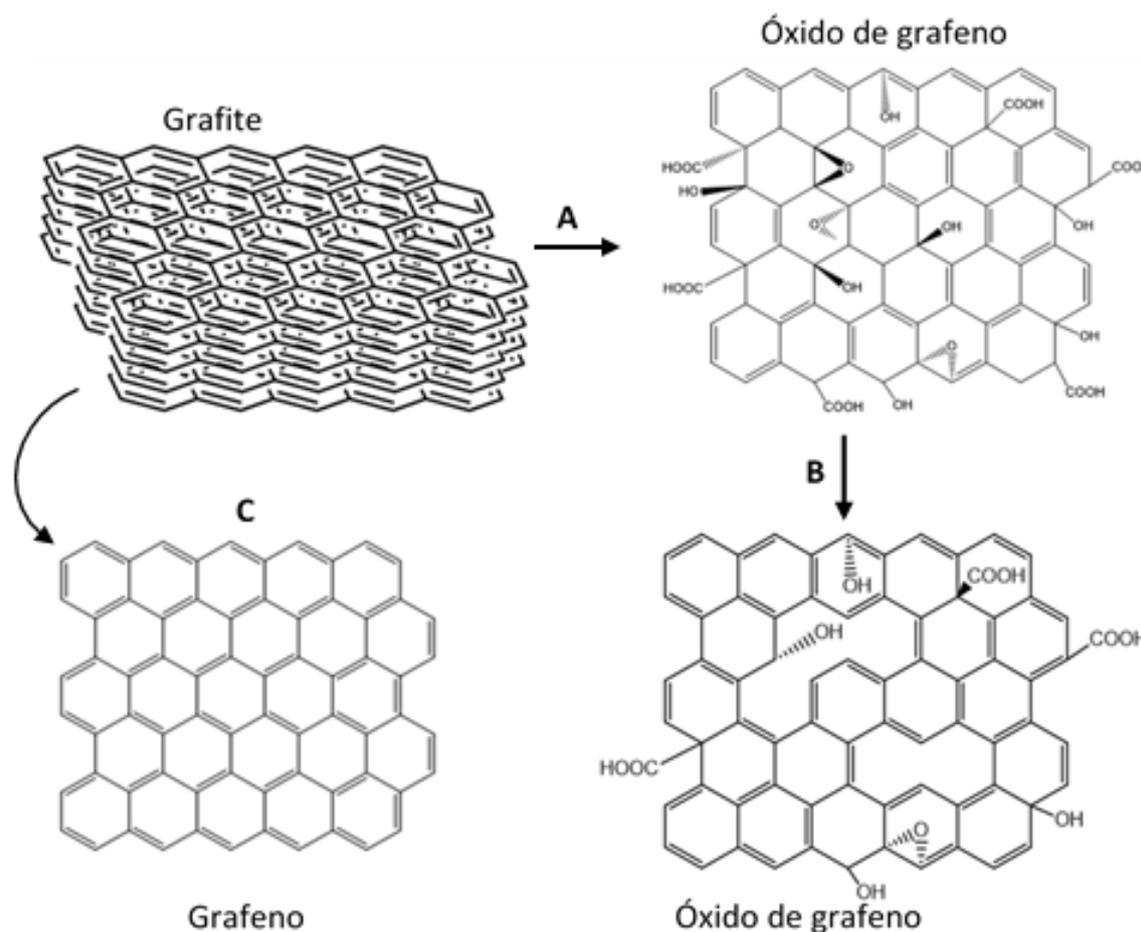
Na obtenção do óxido de grafeno podem ser empregados alguns métodos de síntese, como exfoliação mecânica, deposição química na fase vapor (DQV), DQV por plasma, crescimento epitaxial sobre superfícies eletricamente isolantes, ou sínteses químicas. Utilizando síntese química temos o método de Brodie que utiliza ácido nítrico fumegante (HNO_3) e clorato de potássio (KClO_3), o método de Staudenmaier que faz uso de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido nítrico com o clorato de potássio como oxidante. Além destes, existe o método de Hummers, que consiste na oxidação do grafite utilizando o permanganato de potássio e como agente intercalador o nitrato de sódio (NaNO_3), em ácido sulfúrico concentrado [55].

Hummers [59] desenvolveu um método que utilizava uma grande quantidade de reagentes, havendo como consequência uma geração de resíduos muito grande,

o que mostrou a necessidade de melhoria na rota sintética levando as mudanças nas proporções dos reagentes, chegando até a substituição ou adição de outros reagentes, sendo chamado então de método de Hummers modificado [60–63].

Dessa forma, utilizando-se dos métodos de síntese química, teremos grupos oxigenados no plano basal e nas bordas do óxido de grafeno, que sofrem redução após tratamento com ácido L-ascórbico, apresentando como produto final o óxido de grafeno reduzido que contém defeitos na superfície causados pela diminuição da quantidade de carbonos hibridizados sp^3 , e uma quantidade menor de grupos oxigenados [64]. De modo geral, no OGr, há um aumento de carbonos sp^2 em relação ao OG, devido ao restabelecimento da rede π -conjugada, conforme Figura 9.

Figura 9: Representação das estruturas do grafite, grafeno, óxido de grafeno e óxido grafeno reduzido obtidos por A) Oxidação e intercalação; B) Redução com ácido L-ascórbico; C) Folha de grafeno sem defeitos (*pristine*). **Fonte:** Autoria própria.



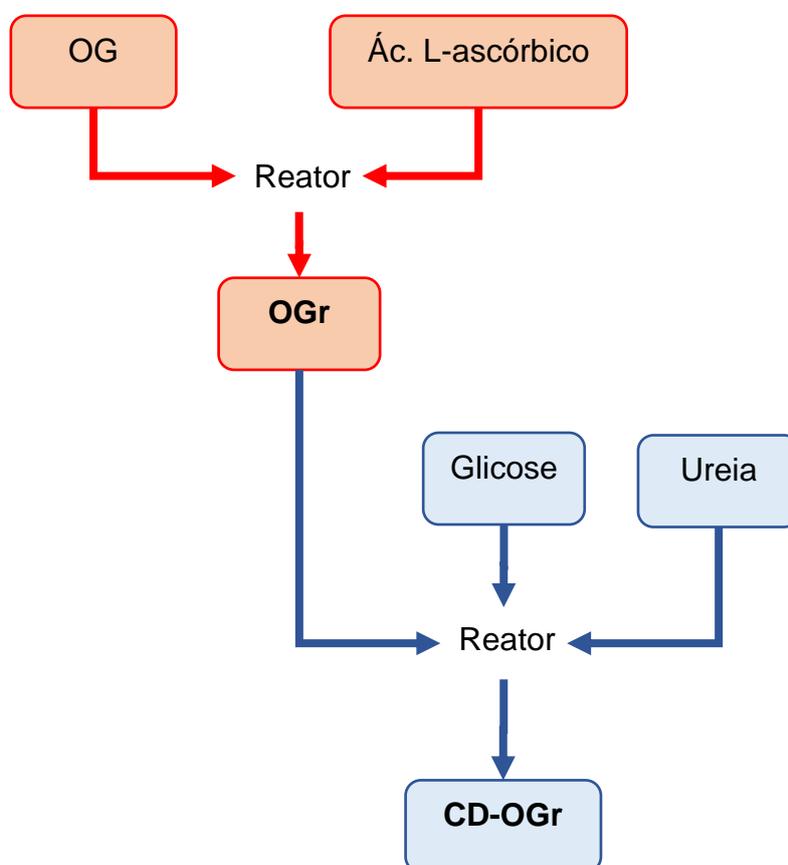
Diante do exposto, percebe-se que diversos autores utilizam em seus trabalhos materiais derivados do óxido de grafeno assim como materiais híbridos, contendo outras espécies químicas como por exemplo os *carbon dots*.

1.6 Material híbrido *carbon dots*/óxido de grafeno reduzido (CD-OGr)

Os *carbon dots* também estão presentes em estudos envolvendo materiais híbridos, que são compostos sintetizados com o intuito de se aproveitar as melhores características de cada um dos constituintes, como por exemplo a grande área superficial dos derivados de grafeno associada aos grupos funcionais presentes na

superfície dos CD, que podem contribuir para uma melhor interação dos analitos, obtendo assim um material com propriedades únicas [31]. Para a síntese destes compostos são utilizadas rotas sintéticas que envolvem etapas *ex situ* e *in situ*. No primeiro caso, os precursores são previamente tratados e depois são colocados juntos, em um reator para se obter o composto desejado. No segundo caso, um dos compostos é sintetizado no mesmo reator onde já se encontra o outro, conforme exemplificado na Figura 10 [39].

Figura 10: Fluxograma representativo de rotas de síntese *ex situ* (em vermelho) e *in situ* (em azul). **Fonte:** Autoria própria.



O método de síntese *in situ* é uma abordagem relativamente simples e eficiente no preparo de nanopartículas que podem crescer na matriz escolhida, com as vantagens de evitar a aglomeração de partículas e de manter uma boa distribuição espacial na matriz. A desvantagem desse método é que os precursores que não reagirem podem influenciar nas propriedades do material final [65]. Em

2016, Niu *et al.* [66] promoveram a formação de *carbon dots* na superfície das folhas de óxido de grafeno, para realizar estudos sobre eletrocatalisador não metálico para reações de redução de oxigênio. Vijeshe *et al.* [58] também realizaram estudos das propriedades ópticas de nanofolhas de carbono, com *carbon dots* ligados à sua superfície e observaram que o material híbrido CD-OG exibiu um bom desempenho óptico não linear, assim como observara que a forte fluorescência da amostra faz com que o CD-OG seja um potencial candidato a aplicações de Bioimagem e diodos emissores de luz.

1.7 Determinação voltamétrica da HCQ

Estudos realizados sobre a HCQ, a exemplo de Arguelho *et al.* [67] que utilizaram eletrodo de carbono vítreo para a determinação de HCQ por VPD, com resposta linear de 20,0 a 500,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e limite de detecção de 11,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. +

Deroco *et al.* [68] realizaram determinação de HCQ em fármacos e urina sintética, usando um eletrodo de diamante dopado com boro. Utilizando a técnica de voltametria cíclica constaram que a oxidação da HCQ é um processo controlado por difusão e envolve apenas um elétron, com resposta linear de 0,1 a 1,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em uma publicação do grupo de sensores eletroquímicos e nanomateriais (GPSEnM), Silva *et al.* [10] utilizaram nanofolhas de nitreto de carbono para modificar eletrodos de pasta de carbono e realizar a determinação de HCQ também em comprimidos comerciais e urina sintética, no intervalo de resposta linear de 10,0 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 6,92 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e obtiveram um LOD de 0,16 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e LOQ de 0,52 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

O monitoramento da HCQ torna-se de fundamental importância visto que seu uso indiscriminado pode causar riscos à saúde humana. Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento e aplicação de eletrodos baseados em *carbon dots* - suportados em óxido de grafeno reduzido para a detecção de HCQ em amostras de urina sintética e formulações farmacêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um eletrodo modificado a partir do material híbrido *carbon dots*/óxido de grafeno reduzido (ECO) para aplicação na determinação de hidroxicloroquina em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o óxido de grafeno reduzido utilizando método de Hummers modificado e o material híbrido *carbon dots*/óxido de grafeno reduzido utilizando metodologia *in situ*;
- Caracterizar as propriedades estruturais, morfológicas, espectroscópicas e eletroquímicas dos materiais sintetizados;
- Aplicar o material híbrido sintetizado, como modificante em eletrodos de pasta de carbono e verificar a resposta analítica do eletrodo modificado frente a detecção de hidroxicloroquina;
- Otimizar os parâmetros do sistema de análise e validar a sensibilidade e seletividade do ECO;
- Aplicar o sensor desenvolvido na determinação de HCQ em amostras biológicas e formulações farmacêuticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para o desenvolvimento da etapa experimental da pesquisa foram utilizados reagentes de grau de pureza analítica listados na Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados na parte experimental deste estudo.

Reagente	Fórmula molecular	Fabricante	Grau de pureza (%)
Ácido Acético	CH ₃ COOH	Vetec	99,70
Ácido L-ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Impex	99,00
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	Reagen	99,90
Ácido clorídrico	HCl	Neon Química	37,00
Ácido orto-fosfórico	H ₃ PO ₄	Synth	85,00
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Neon Química	98,00
Água ultrapura	H ₂ O	-	-
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	Dinâmica	99,50
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	Dinâmica	99,00
Cloreto de potássio	KCl	Dinâmica	99,50
Cloreto de sódio	NaCl	Vetec	99,00
Ferricianeto de potássio	K ₃ Fe(CN) ₆	J. T. Baker	99,50
Ferrocianeto de potássio	K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	Carlos Elba	99,00
Fosfato de potássio monobásico anidro	KH ₂ PO ₄	Synth	P.A.
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na ₂ HPO ₄	Neon Química	P.A.
Fosfato de sódio monobásico anidro	NaH ₂ PO ₄	Synth	P.A.
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Alphatec	99,97
Grafite em pó	C	Sigma-Aldrich	99,90
Hidróxido de sódio	NaOH	Impex	99,00

Permanganato de potássio	KMnO_4	Sigma-Aldrich	97,00
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Neon Química	35,00
Sulfato de Hidroxicloroquina	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	Supelco	$\geq 95,00$
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	Dinâmica	99,00
Ureia	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	Vetec	99,98

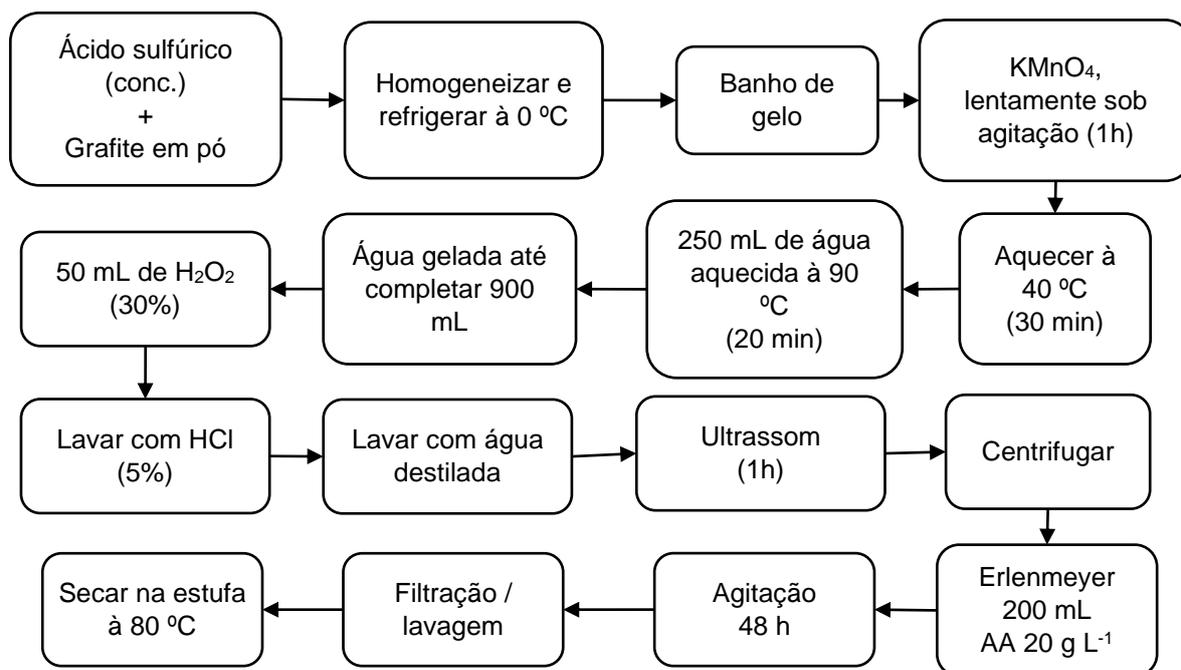
3.2 Síntese do óxido de grafeno reduzido (OGr)

Para obtenção do OGr, foi utilizado o método de Hummers modificado [59]. Foram adicionados em um béquer 6,00 g de grafite em pó em 100,0 mL de ácido sulfúrico (98,0%), sob agitação durante 1 h. Após esta etapa, o béquer foi mantido em refrigerador por 1 h, em seguida o recipiente foi retirado da refrigeração e, sob agitação constante, foram lentamente adicionados 18,00 g de permanganato de potássio, e a temperatura do sistema foi mantida abaixo de 25 °C. Em seguida, o sistema foi aquecido e mantido à 40 °C por 30 minutos. Foram adicionados 250,00 mL de água destilada previamente aquecida à 90 °C e a agitação foi continuada durante 20 minutos. Na sequência, foi adicionada água ultrapura gelada até completar o volume do béquer para 900,0 mL, adicionado em seguida 50,0 mL de peróxido de hidrogênio à 30,00%, deixado o sistema em repouso e, após 12 h, foi utilizado 1,0 L de solução de ácido clorídrico (5,00%), para realizar lavagens do precipitado obtido, seguidas de centrifugação a 4.000 rpm. Logo após, foram realizadas lavagens com água destilada, centrifugando a cada etapa, até o sobrenadante ficar em pH 7,0. O precipitado foi colocado em um banho ultrassônico de 40 kHz durante 1 hora. Após esta etapa, o material foi centrifugado, seco em estufa à 80 °C por 12 h e armazenado para uso posterior.

Para a obtenção do óxido de grafeno reduzido (OGr) o óxido de grafeno obtido foi colocado em um erlenmeyer de 1,0 L contendo 200,0 mL de uma solução 20,00 g L⁻¹ de ácido L-ascórbico (AA) e mantido sob agitação, à temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida o material foi filtrado, lavado com água destilada

e colocado para secar em estufa à 80 °C por 12 horas. A Figura 11 exibe um fluxograma da rota de síntese utilizada na obtenção do OGr.

Figura 11: Rota sintética para obtenção de óxido de grafeno reduzido. **Fonte:** Autoria própria.

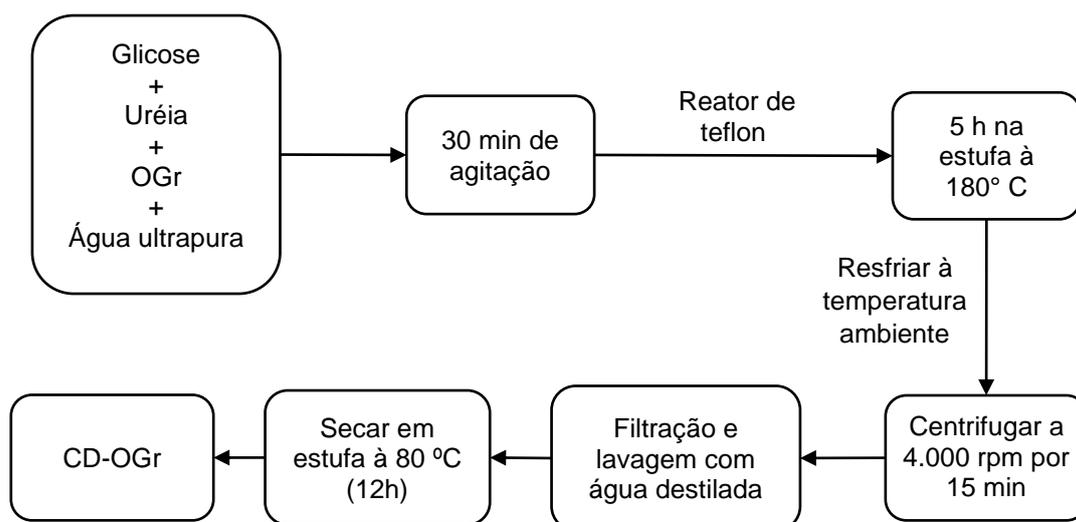


3.3 Síntese *in situ* do material híbrido *carbon dots* suportados em óxido de grafeno reduzido (CD-OGr)

O material híbrido, *carbon dots* em matriz de OGr, foi obtido através da modificação do método reportado por Niu *et al.* [66]. Para isso, foram adicionados em um béquer 2,00 g de ureia, 1,00 g de glicose, 1,00 g de OGr e 10,00 mL de água ultrapura. O sistema foi mantido sob agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi transferido para um reator de teflon com “camisa” de aço inox, o qual foi submetido à estufa por 5 horas à 180 °C. Após esse período, o reator foi retirado da estufa e resfriado à temperatura ambiente. Ao abrir o reator observou-se um líquido de cor marrom e um corpo de fundo de cor preta. O material coletado foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos, filtrado à vácuo sendo coletada a parte líquida e reservada para caracterizações. A parte retida no filtro foi

lavada quatro vezes com água destilada, em seguida, foi colocado em vidro de relógio e levado à estufa para secagem à 80 °C durante 12 h, conforme fluxograma da Figura 12.

Figura 12: Rota de síntese do material híbrido *carbon dots in situ* em matriz de óxido de grafeno reduzido. **Fonte:** Autoria própria.



3.4 Preparo de soluções

3.4.1 Soluções eletrolíticas

Para o desenvolvimento das análises eletroquímicas, soluções eletrolíticas e soluções-estoque do analito foram preparadas, seguindo os procedimentos a seguir.

Solução de Ferrocianeto de potássio/Ferricianeto de potássio:

Foram dissolvidos 0,0329 g de ferricianeto de potássio, 0,0422 g de ferrocianeto de potássio e 7,4552 g de cloreto de potássio em 100,00 mL de água ultrapura, obtida de um sistema Mili-Q.

Solução tampão B-R (Britton-Robinson) (força iônica (μ) = 0,50 mol·L⁻¹)

Foi realizada a adição de 4,35 mL de ácido acético, 5,05 mL de ácido ortofosfórico, 4,6400 g de ácido bórico em um balão com aferição de 500,00 mL. O volume foi completado com água ultrapura até o menisco. O pH foi ajustado à 8,0 utilizando uma solução de NaOH 3,00 mol·L⁻¹.

Solução tampão Fosfato (pH 8,0 e μ = 0,20 mol·L⁻¹)

Para o preparo do tampão fosfato, foram adicionadas 0,0800 g de fosfato de sódio dibásico, 0,0400 g de fosfato de sódio monobásico e 1,0500 g de cloreto de sódio em um balão volumétrico com aferição de 100,00 mL, dissolvidas em água ultrapura e o volume foi completado, até o menisco. O pH foi ajustado à 8,0, utilizando uma solução de hidróxido de sódio 3,00 mol·L⁻¹.

Preparo da urina sintética

Para o preparo da amostra de urina sintética foram dissolvidos 0,1460 g de NaCl, 0,0800 g de KCl, 0,0540 g de CaCl₂·2H₂O, 0,0500 g de NH₄Cl, 0,0700 g de KH₂PO₄, 1,25 g de ureia e 0,1120 g de Na₂SO₄ em água ultrapura em um balão volumétrico com aferição de 50,00 mL.

Preparo da solução contendo formulação farmacêutica

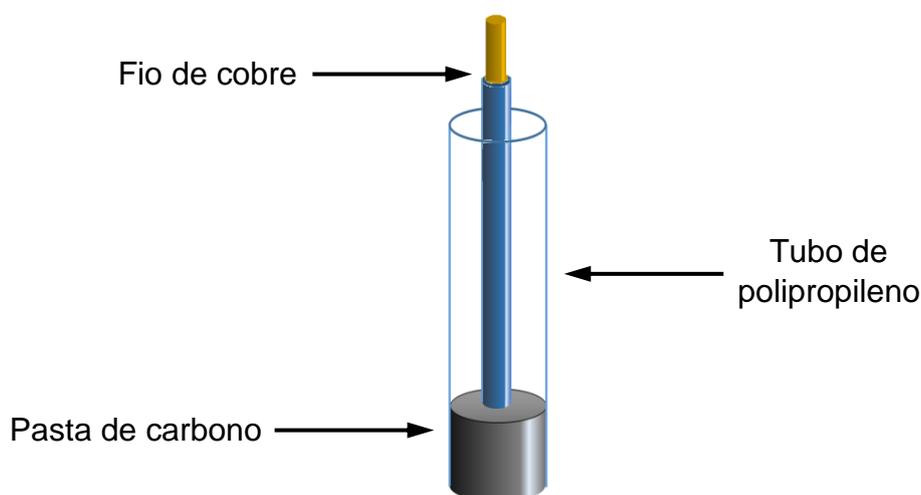
Para a análise da formulação farmacêutica, três comprimidos comerciais contendo 400 mg de HCQ foram pesados e macerados utilizando pistilo e almofariz de ágata. Em seguida, foram transferidos para um balão volumétrico com volume de aferição de 100,00 mL e preenchidos até o menisco com água ultrapura. A solução foi submetida a um banho de ultrassom por 10 min para homogeneização completa.

3.5 Preparação dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de trabalho foram preparados através da homogeneização manual dos seus componentes com auxílio de almofariz e pistilo de ágata, durante 20 minutos. Para o eletrodo de pasta de carbono sem modificação (EPC) foi preparada uma mistura composta por 130,00 mg de grafite em pó e 70,00 mg de óleo mineral, na proporção 65:35 (%m/m). No preparo do eletrodo de pasta de carbono modificado com o material híbrido *carbon dots*/óxido de grafeno reduzido (ECO), foram utilizados inicialmente, 120,00 mg de grafite em pó, 10,00 mg de CD-OG_r e 70,00 mg de óleo mineral na proporção 60:05:35 (%m/m/m), respectivamente. As pastas de carbono preparadas foram empacotadas, separadamente, em tubos de polipropileno, e como contato elétrico foi utilizado um fio de cobre com diâmetro da seção transversal de 3 mm. e área geométrica de $17,65 \pm 0,17 \text{ mm}^2$. A Figura 13 mostra uma representação de um eletrodo de trabalho obtido manualmente.

Figura 13: Representação de um eletrodo de trabalho preparado manualmente.

Fonte: Autoria própria.



3.6 Técnicas de caracterizações dos materiais sintetizados

3.6.1 Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

As medidas de absorção molecular na região do UV-Vis foram realizadas através de um espectrofotômetro Cary 100 Scan de duplo feixe, na região de 200-800 nm, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e água destilada como solução de referência (análise do branco).

3.6.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos entre 4000 e 400 cm^{-1} para os materiais CD, OG, OGr e CD-OGr que foram analisados em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier da Shimadzu, modelo IR Prestige-21, utilizado o brometo de potássio (KBr) como agente dispersante, no Núcleo de Energias Renováveis e Eficiência Energética de Sergipe (NEREES).

3.6.3 Espectroscopia de emissão fluorescente na região do ultravioleta-visível (PL)

Os espectros de emissão foram obtidos no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM), utilizando um equipamento JASCO modelo FP-8600, na região de 360-700 nm com excitação das amostras nos comprimentos de onda 367, 387, 407 e 427 nm. A medida foi realizada em uma alíquota do sobrenadante coletado na filtração após a síntese do CD-OGr. Para evitar que eventuais resíduos, que tivessem passado pela primeira filtração com papel de filtro, interferissem na medida, a amostra foi filtrada utilizando um filtro de seringa de 0,22 μm . Foram coletados 50,0 μL e transferidos para uma cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1,00 cm e em seguida foram adicionados 4,0 mL de água destilada.

3.6.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos através do equipamento Bruker OPTIK GmbH, modelo Senterra, utilizando para o grafite as seguintes condições: laser de comprimento de onda = 785 nm, potência = 50 mW, tempo de integração = 150s e intervalo de medição de 88 a 3540 cm^{-1} . Para o OG, OGr, CD e CD-OGr foram utilizadas as condições: laser de comprimento de onda = 633 nm, potência = 20 mW, tempo de integração = 150s e intervalo de medição de 60 a 3500 cm^{-1} .

3.6.5 Difração de Raios X (DRX)

Para a caracterização do OG, OGr e CD-OGr por DRX, foi utilizado o difratômetro de raios X da marca Rigaku RINT PC DMAX Ultima+, no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe - *Campus* Itabaiana. Este equipamento foi operado com radiação Cu K α (0,15 nm) e 2θ variando de 8 a 70 $^\circ$, com o passo da medida de 0,026 graus e o tempo de aquisição de 70 segundos e velocidade de varredura de 5 graus/min.

3.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através da microscopia eletrônica de varredura, realizada no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM), analisou-se a morfologia do OG, OGr e CD-OGr. As amostras foram metalizadas com prata, para obter uma maior resolução da morfologia da superfície, utilizando uma metalizadora Kurt J. Lesker, modelo 108. As imagens de MEV foram obtidas por um microscópio HITACHI, modelo TM 3000, no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM-UFS). O equipamento foi operado sob vácuo e com aceleração do feixe de elétrons de 15 kV.

3.6.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Realizou-se as análises de microscopia eletrônica de transmissão no Centro Multiusuário de Nanotecnologia da Universidade Federal do Sergipe (CM-NANO-UFS). Foi utilizado um microscópio JEOL, modelo JEM 1400Plus, operado em 120 kV. As amostras foram dispersas em álcool isopropílico e submetidas a um banho

de ultrassom por 10 minutos. Em seguida 5,00 μL das dispersões foram gotejadas sobre telas de cobre recobertas com filme de carbono e disponibilizadas para análise.

3.6.8 Procedimentos eletroquímicos

Para realizar o estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos de trabalho foi utilizado um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab, modelo PGSTAT100N. Foi utilizada uma célula eletroquímica de 15,00 mL composta por três eletrodos: o EPC ou ECO atuando como eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência de Ag/AgCl saturado com 3,00 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl e um fio de platina como contra eletrodo, na qual as análises voltamétricas foram realizadas.

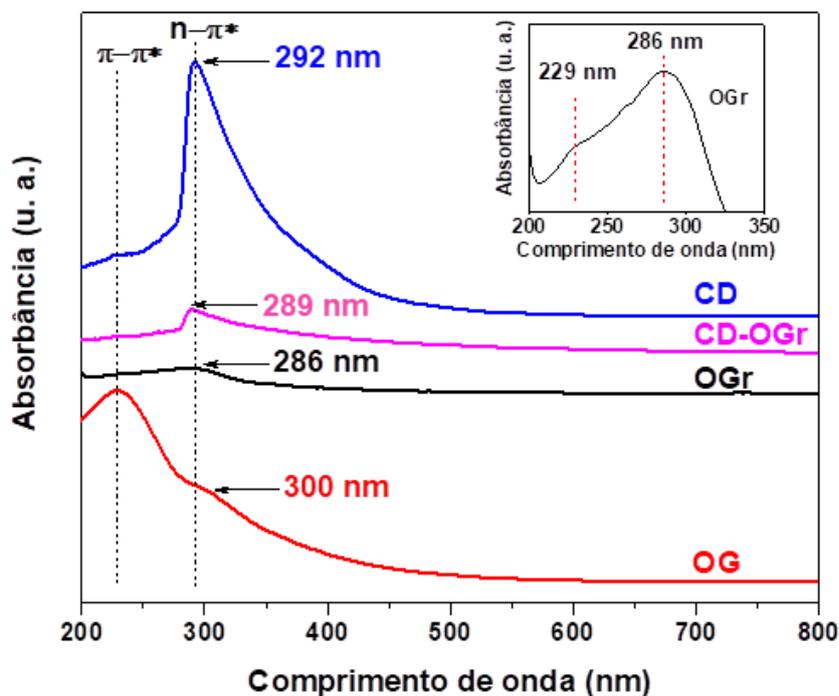
Para a determinação da área efetiva do eletrodo de pasta de carbono e do eletrodo de pasta de carbono modificada com CD-OGr, foi utilizada uma solução de cloreto de potássio ($1,00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), conteúdo $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ferricianeto/ferrocianeto de potássio, e empregada a técnica de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura 10, 20, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1} no sistema previamente reportado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectroscopia de absorção molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis)

A técnica do UV-Vis baseia-se na medida da absorção da radiação eletromagnética, nas regiões visível e ultravioleta do espectro, medindo a quantidade de luz absorvida pela amostra, devido às transições eletrônicas do estado fundamental para o estado excitado [69]. Na Figura 14 encontram-se os espectros dos materiais sintetizados.

Figura 14: Espectros de absorção molecular na região UV-visível obtidos em suspensões aquosas de OG, OGr, CD-OGr (1,0 mg mL⁻¹) e CD. **Gráfico inserido:** Ampliação do espectro de absorção do OGr.



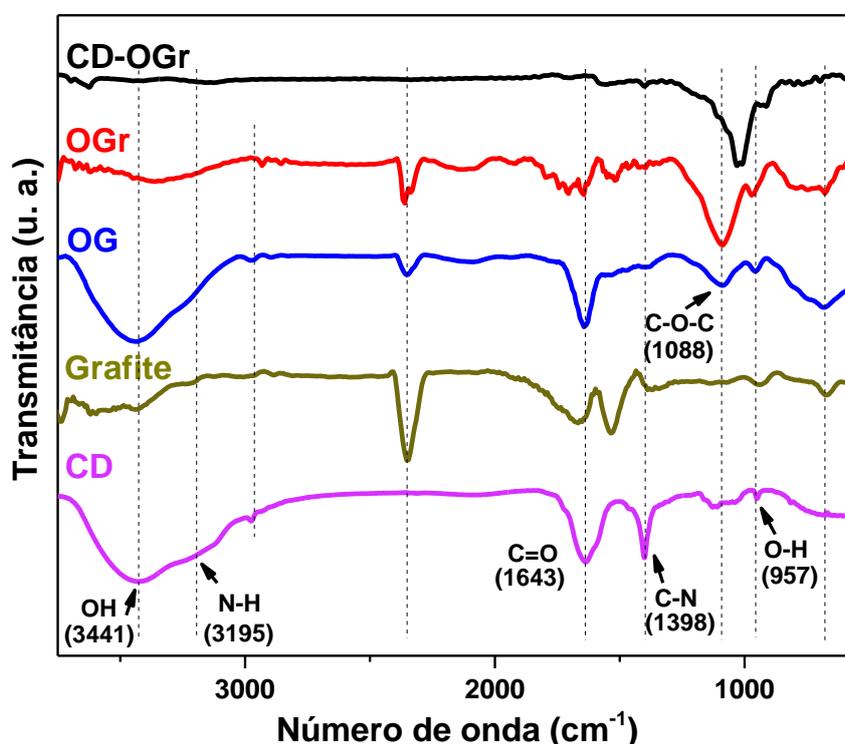
Os espectros de absorção molecular exibidos na Figura 14 mostram dados referentes às transições eletrônicas π - π^* em 229 nm, atribuídas a ligações C-C e C=C, de regiões híbridas sp^2 de caráter aromático para o OG. As bandas observadas em 292 nm para o CD, 300 nm para o OG, 286 nm para o OGr e 289 nm para o CD-OGr, podem ser atribuídas à transição n - π^* , características de ligação C=O de grupos funcionais presentes nesses materiais [58,70]. No gráfico inserido na Figura 14, é possível observar a presença de uma banda referente à transição eletrônica n - π^* para o OGr em 286 nm e um ombro em 229 nm referente à transição π - π^* de carbono sp^2 .

4.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na espectroscopia vibracional na região do infravermelho quando as moléculas absorvem radiação, são excitadas para atingir um estado de maior

energia, que corresponde a alterações energéticas da ordem de 8 a 40 kJ/mol. A radiação nessa faixa de energia engloba frequências vibracionais de estiramento e deformação das ligações na maioria das moléculas mais covalentes, não possuindo energia suficiente para promover transições eletrônicas [71,72]. Na Figura 15 estão apresentados os espectros vibracionais na região do infravermelho.

Figura 15: Espectros vibracionais na região do infravermelho do CD, grafite, OG, OGr e CD-OGr, utilizando KBr como agente dispersante.

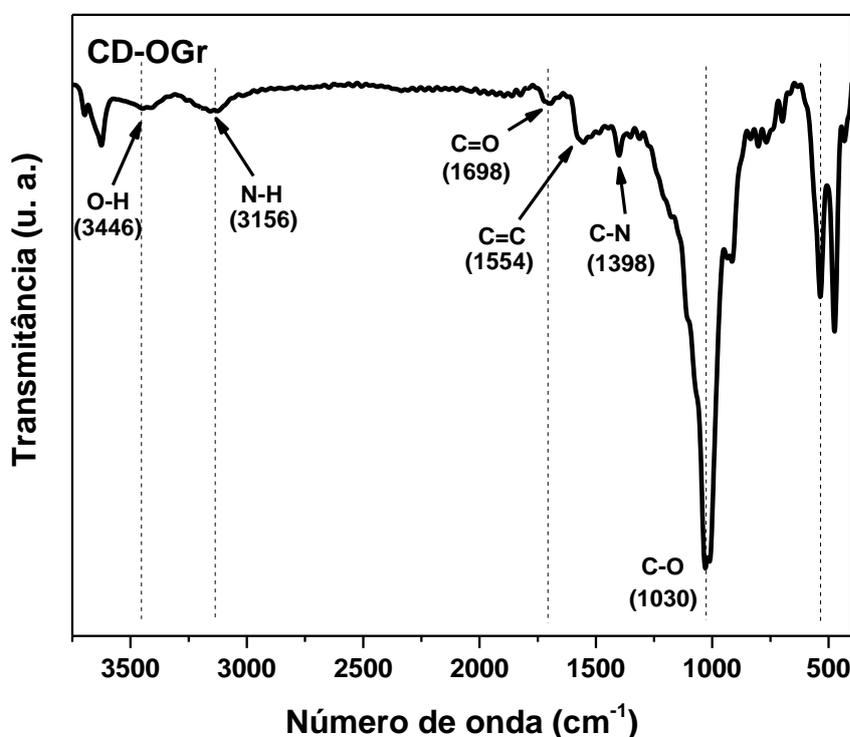


Os espectros exibidos na Figura 15 podem confirmar a obtenção do OG pelo método de Hummers modificado, através da presença de bandas características de grupos oxigenados como -OH em 3441 cm^{-1} , atribuída a estiramentos do grupo hidroxila de fenóis e álcoois, o estiramento simétrico C=O em 1643 cm^{-1} atribuída ao grupamento carboxila, C-O-C em 1088 cm^{-1} atribuídas a grupos epóxi e o estiramento H-O em 957 cm^{-1} . Foi observado no gráfico do OGr a diminuição da intensidade das bandas atribuídas aos grupos OH, diminuição na intensidade da absorção atribuída ao estiramento da ligação C=O e um aumento significativo na intensidade da banda atribuída aos grupos epóxi, que pode ter relação com a etapa

de redução da síntese [73]. No espectro do CD percebe-se bandas em 3441 e 3195 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações O-H e N-H, respectivamente, assim como a banda em 1398 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-N, ratificando a dopagem dos *carbon dots* com nitrogênio proveniente da ureia [74].

Na Figura 16 observa-se o espectro infravermelho do material CD-OGr para uma melhor visualização das bandas.

Figura 16: Espectro vibracional na região do IV para o CD-OGr, utilizando KBr como agente dispersante.



As bandas em 3446 e 3156 cm^{-1} do material híbrido (CD-OGr), na Figura 16, podem ser atribuídas aos estiramentos vibracionais das ligações O-H e N-H, respectivamente. Observa-se também bandas atribuídas às vibrações das ligações C=C em 1554 cm^{-1} , C-N em 1398 cm^{-1} e C-O de álcoois em 1030 cm^{-1} [70,74,75]. A redução dos grupos oxigenados reforça a ausência ou diminuição do caráter hidrofílico do CD-OGr [58]. A Tabela 2 apresenta um resumo das atribuições para as bandas características obtidas dos materiais sintetizados.

Tabela 2: Atribuições das bandas dos grupos funcionais nos espectros de FTIR dos materiais sintetizados CD, OG, OGr, CD-OGr.

Atribuição	Grupos funcionais	Número de onda (cm ⁻¹)				
		[75]	[76]	[66]	[56]	Experimental
ν_{O-H}	Álcool	3400	3417	3300	3400	3441
ν_{N-H}	Amina	3200	3200			3156
$\nu_{C=O}$	Carboxila	1700	1727	1605	1717	1643
ν_{C-O-C}	Éter	-	1040	1000	1190	1088
δ_{O-H}	Álcool	-	958	1212	-	957
δ_{C-N}	Amina	1390	-	1400	-	1398

Deformação angular fora do plano (δ); estiramento (ν).

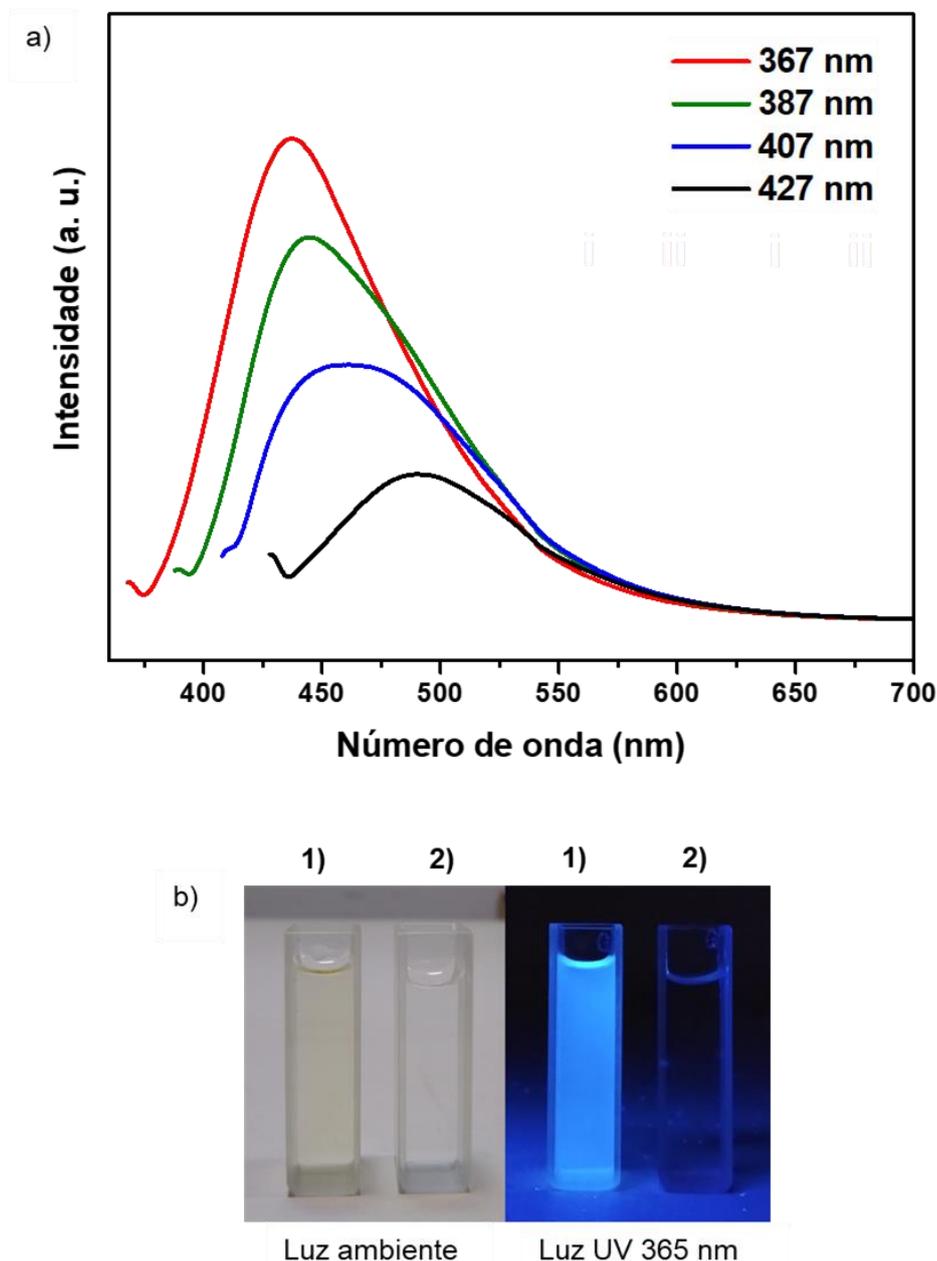
Os dados experimentais apresentados na Tabela 2 corroboram com a literatura confirmando a redução do óxido de grafeno e a obtenção do material híbrido CD-OGr, no qual pode-se evidenciar a formação dos *carbon dots* na superfície do OGr [77].

4.3 Espectroscopia de emissão fluorescente na região do ultravioleta-visível (PL)

Na espectrometria de emissão fluorescente o elétron da camada de valência interage com o fóton e é excitado para um estado de maior energia. Ao retornar para o seu estado fundamental, o elétron emite a energia recebida pelo fóton, na forma de luz a qual é captada pelo detector do espectrofotômetro e convertida em dados que correlacionam a intensidade de emissão com o comprimento de onda [78].

As medidas de espectroscopia de emissão foram realizadas utilizando o material filtrado, coletado na lavagem do material híbrido CD-OGr (ver item 3.6.3), através da excitação em diferentes comprimentos de onda, conforme a Figura 17.

Figura 17: a) Espectros de emissão fluorescente em diferentes comprimentos de onda de excitação, do material filtrado coletado na lavagem da síntese do material híbrido CD-OGr; b) Imagens da dispersão de CD em (1) e água destilada em (2) sob luz ambiente e luz UV 365 nm.



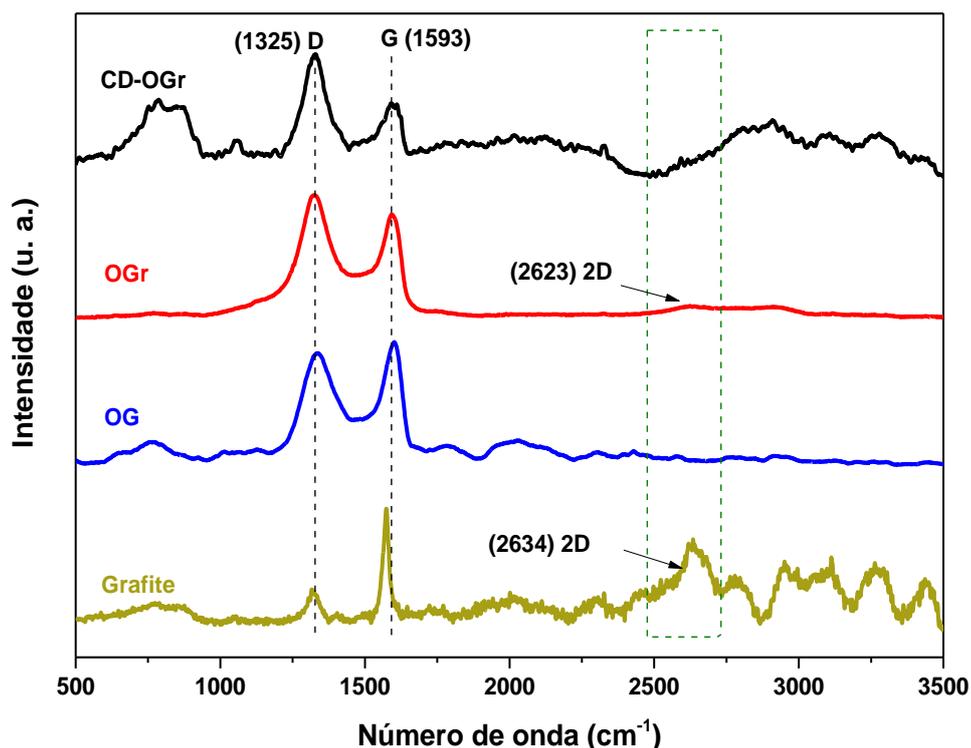
Na Figura 17a observa-se que intensidade da fluorescência atingiu seu máximo para a excitação em 367 nm, reduzindo significativamente com a mudança de excitação para um comprimento de onda de maior energia. Pode-se observar que os bandas de emissão dos CD são dependentes do comprimento de onda da

excitação. Essa propriedade pode ser atribuída aos diferentes tamanhos das partículas e à complexidade dos estados de superfície excitada dos CD [44,78,79]. Com base nestas características, os CD podem ser aplicados em bioimagem ou utilizado com sensor fluorimétrico dentre outras aplicações.

4.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma ferramenta rápida, não destrutiva e de alta resolução, utilizada para a caracterização de estrutura da rede e das propriedades eletrônicas, ópticas e de fônon dos materiais. A banda G, apresentada em espectros Raman, é o modo primário de grafeno e grafite, e representa a configuração planar de carbonos sp^2 que constitui o grafeno. A banda D está relacionada ao grau de desordem ou de defeito na estrutura de carbonos. A banda 2D é resultante do entrelaçamento do processo vibracional de dois fônons e não necessariamente está a defeitos na estrutura gráfica. Esta banda também pode ser utilizada para determinar a quantidade de camadas de grafeno, dependendo não só da posição da banda, mas também do seu formato. Em grafeno monocamada, a banda 2D é constituída apenas por um pico simétrico com largura de aproximadamente 30 cm^{-1} [80,81]. Na Figura 18 observa-se os espectros raman do grafite, OG, OGr e CD-OGr.

Figura 18: Espectros Raman do grafite, OGr, OGr e CD-OGr.



Nos espectros Raman do OGr e do grafite (Figura 18) foram observadas a presença das bandas 2D em 2623 cm^{-1} e 2634 cm^{-1} respectivamente, que podem ser atribuídas a quantidade e forma das camadas. No OG observamos apenas as bandas D (1325 cm^{-1}) e G (1593 cm^{-1}).

A razão I_D/I_G foi estimada como 0,34; 0,98; 1,02 e 1,12 para o grafite, OG, OGr e CD-OGr, respectivamente. Essa razão reflete a presença de defeitos na estrutura do nanomaterial e está relacionada à proporção de carbono sp^3 / sp^2 . Quanto maior essa razão, maior é a presença de defeitos como buracos no plano basal, vacâncias permanentes e extensão da reorganização da estrutura gráfica [56,70,77,80].

Habte e Ayele [82] modificaram rotas de síntese, variando parâmetros como tempo de reação, temperatura e concentração de reagentes para avaliar o grau de oxidação na obtenção do OG, a partir do grafite em pó, seguida de redução química com ácido L-ascórbico. Em seu trabalho observa-se os efeitos das mudanças nas proporções dos reagentes, frente aos níveis de oxidação do grafite e redução do OG, onde foi percebido que para a síntese do OGr o melhor resultado obtido foi

utilizando grafite e permanganato na proporção 1:9 em meio ácido (ácido sulfúrico/ácido fosfórico – 9:1 em volume), porém é necessário um tempo de reação de 12h. Faria *et al.* [83] estudaram o efeito do tempo de oxidação (de 4 h a 10 dias) na síntese de OG e OGr e observaram que aumentando o tempo da etapa de oxidação em até sete dias, é possível obter folhas de OG com poucas camadas ou monocamadas.

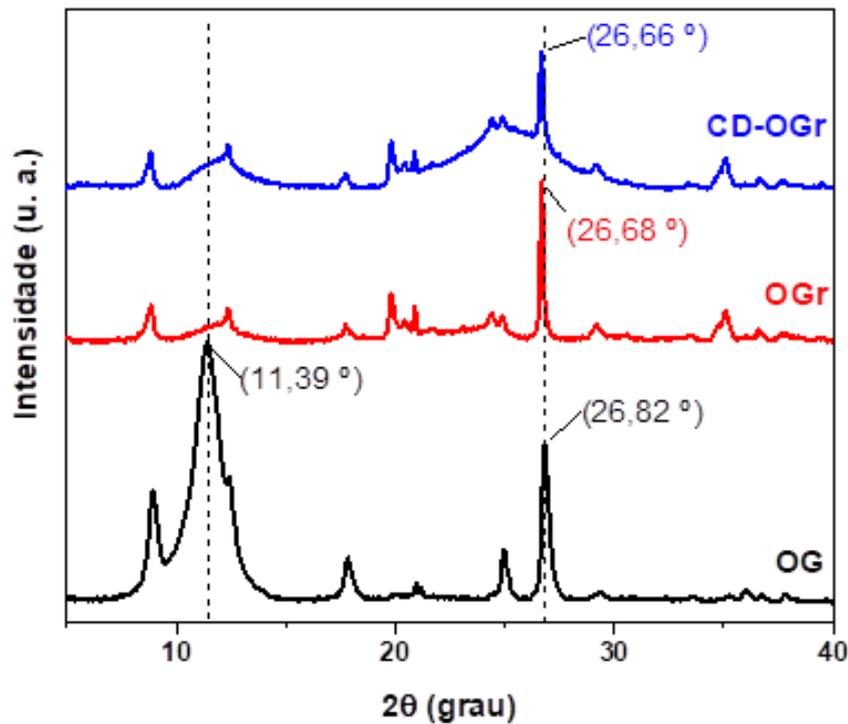
No trabalho de Niu *et al.* [66] foi estudada a síntese de óxido de grafeno decorado com *carbon dots* dopados com nitrogênio, como eletrocatalisador sem metal para a reação de redução de oxigênio. Observou-se que o material híbrido obtido (N-CD/OG) exibiu excelente atividade eletrocatalítica, para as reações de redução de oxigênio estudadas, quando comparado ao desempenho dos materiais separados (N-CD e OG) ou da mistura destes materiais, devido aos defeitos na estrutura grafítica e ao efeito sinérgico dos *N-carbon dots* incorporados nas camadas do OG.

Com base nesses trabalhos e nas caracterizações realizadas neste estudo, temos evidências da obtenção do material híbrido CD-OGr que será utilizado na modificação dos eletrodos de pasta de carbono para determinação de HCQ.

4.5 Difração de Raios X (DRX)

Nesta técnica um feixe de raios X incide sobre o material a ser estudado e interage com a estrutura atômica da amostra. Como resultado, o feixe é difratado pelos seus átomos em várias direções e carregam informações sobre a estrutura atômica, que são de grande importância para sua caracterização. Os raios difratados que chegam ao detetor são convertidos em dados que podem ser interpretados e tratados. Na Figura 19 estão apresentados os difratogramas obtidos para o OG, OGr e CD-OGr.

Figura 19: Difratogramas de raios X do OG, OGr e CD-OGr



Na Figura 18 é possível observar o pico de difração do OG em $2\theta = 11,39^\circ$, correspondente ao plano (001) e está relacionado a uma distância entre camadas de 0,76 nm, semelhante ao encontrado na literatura [70,77] e calculada utilizando a Lei de Bragg, exibida na Equação 1:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

n = ordem de reflexão;

λ = comprimento de onda;

d = distância interplanar;

θ = ângulo de reflexão.

Nos difratogramas do OGr e do CD-OGr os picos em $2\theta = 26,68^\circ$ e $2\theta = 26,66^\circ$, respectivamente, semelhante aos resultados encontrados na literatura

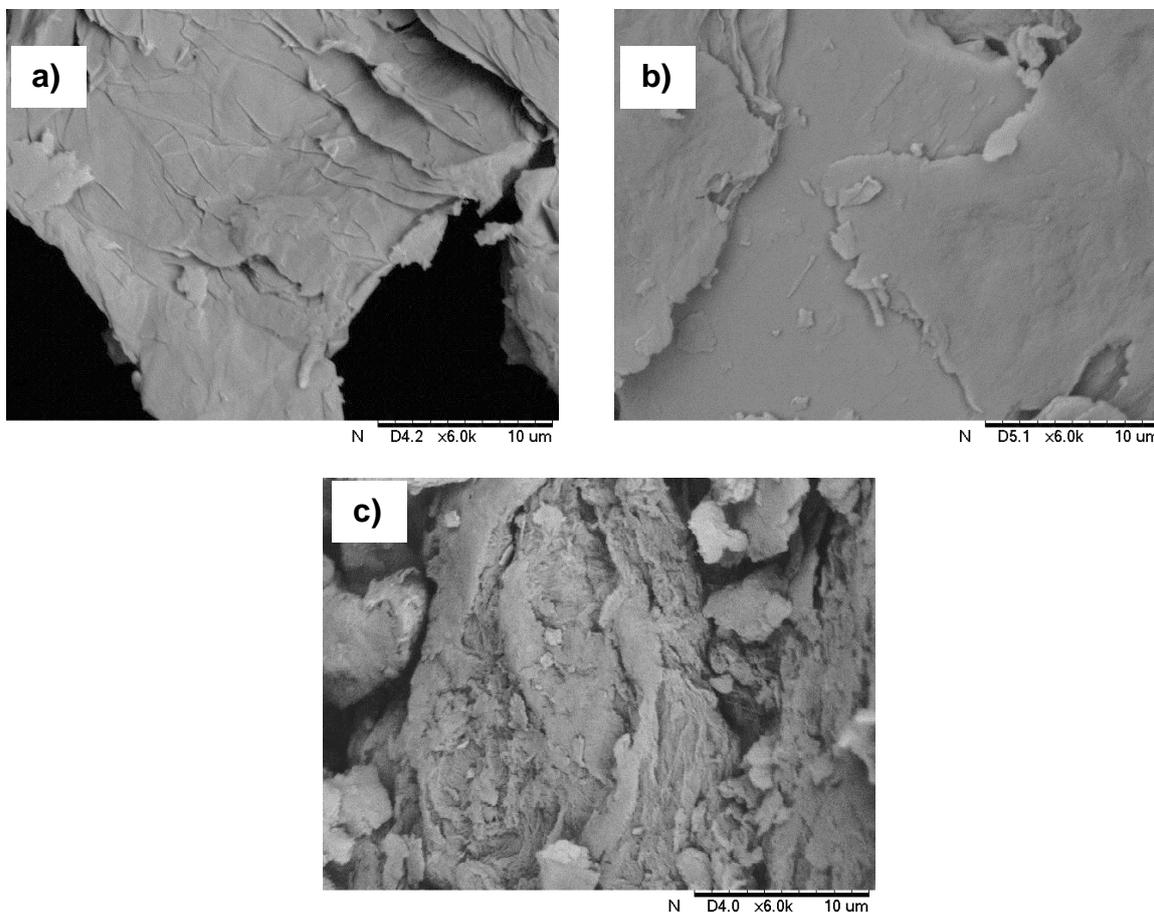
[31,84]. Esses picos são atribuídos ao plano (002) do óxido de grafeno reduzido e ambos possuem uma distância interplanar de cerca de 0,33 nm, que se apresenta menor que a distância calculada para o OG (0,76 nm), devido à diminuição dos grupos oxigenados em decorrência do processo de redução química do método de síntese de Hummers [56]. O alargamento do pico em $2\theta = 26,68^\circ$ indica a incorporação dos carbon dots na estrutura do OGr.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de obtenção de imagens da estrutura e morfologia dos materiais. Um feixe de elétrons de alta energia é incidido sobre a amostra e, ao entrar em contato com a superfície do material, irá interagir com os átomos da camada mais externa, ao passo que as interações geradas são captadas por detectores acoplados ao equipamento e os sinais recebidos serão traduzidos em imagens na tela do computador, possibilitando a visualização e estudo de partículas em escala nanométrica.

Para analisar as características morfológicas das amostras de OG, OGr e CD-OGr foram realizadas análises de MEV e as imagens obtidas com ampliação de 6000 vezes estão exibidas na Figura 20.

Figura 20: Imagens obtida por MEV do grafite, a) OG, b) OGr e c) CD-OGr com ampliação de 6000 vezes, utilizando aceleração do feixe de elétrons de 15 kV, sob vácuo.



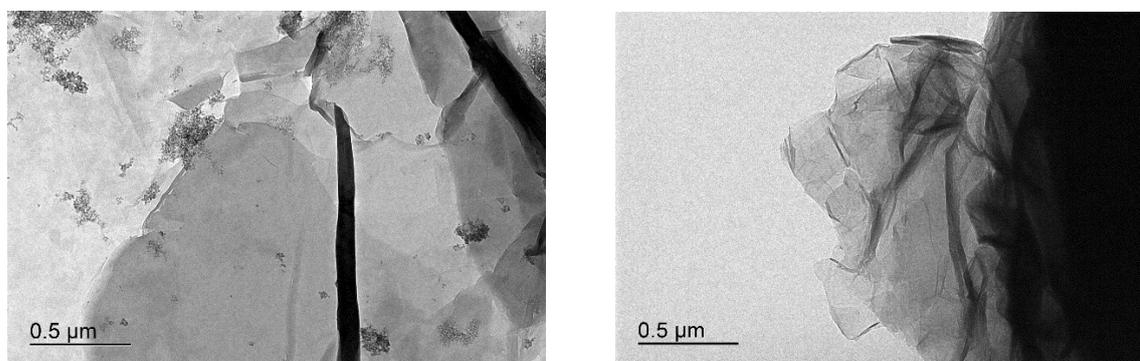
Observa-se na Figura 20a que o OG apresenta uma estrutura semelhante a uma folha de papel amassada, que pode ter sido causada pelo processo de oxidação do grafite. Na Figura 20b, o OGr apresenta uma maior corrugação das folhas, provavelmente causado pela diminuição dos grupos oxigenados, através da redução com o ácido L-ascórbico. A aparência granular e ainda mais enrugada do CD-OGr (Figura 20c) pode ser consequência da inserção dos carbon dots, bem como do processo de síntese hidrotermal in situ.

4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão utiliza um feixe de elétrons incidido nas amostras para obtenção de imagens. Na imagem de campo claro, as regiões claras indicam que todos os elétrons foram transmitidos através da amostra,

enquanto as regiões mais escuras denotam que uma parte dos elétrons não foram capazes de passar pela amostra. Isso normalmente leva a um fundo claro com um objeto escuro. O contraste do objeto em relação ao fundo é influenciado por fatores como a espessura do objeto e o número de massa ou número atômico dos elementos constituintes da amostra. Conforme a espessura ou o número de massa aumenta, a amostra fica mais escura na imagem [85]. Na Figura 21 encontram-se os resultados das análises para o OG e OGr obtidos por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 21: Imagens de MET dos materiais a) OG e b) OGr com ampliação de 10.000 vezes.

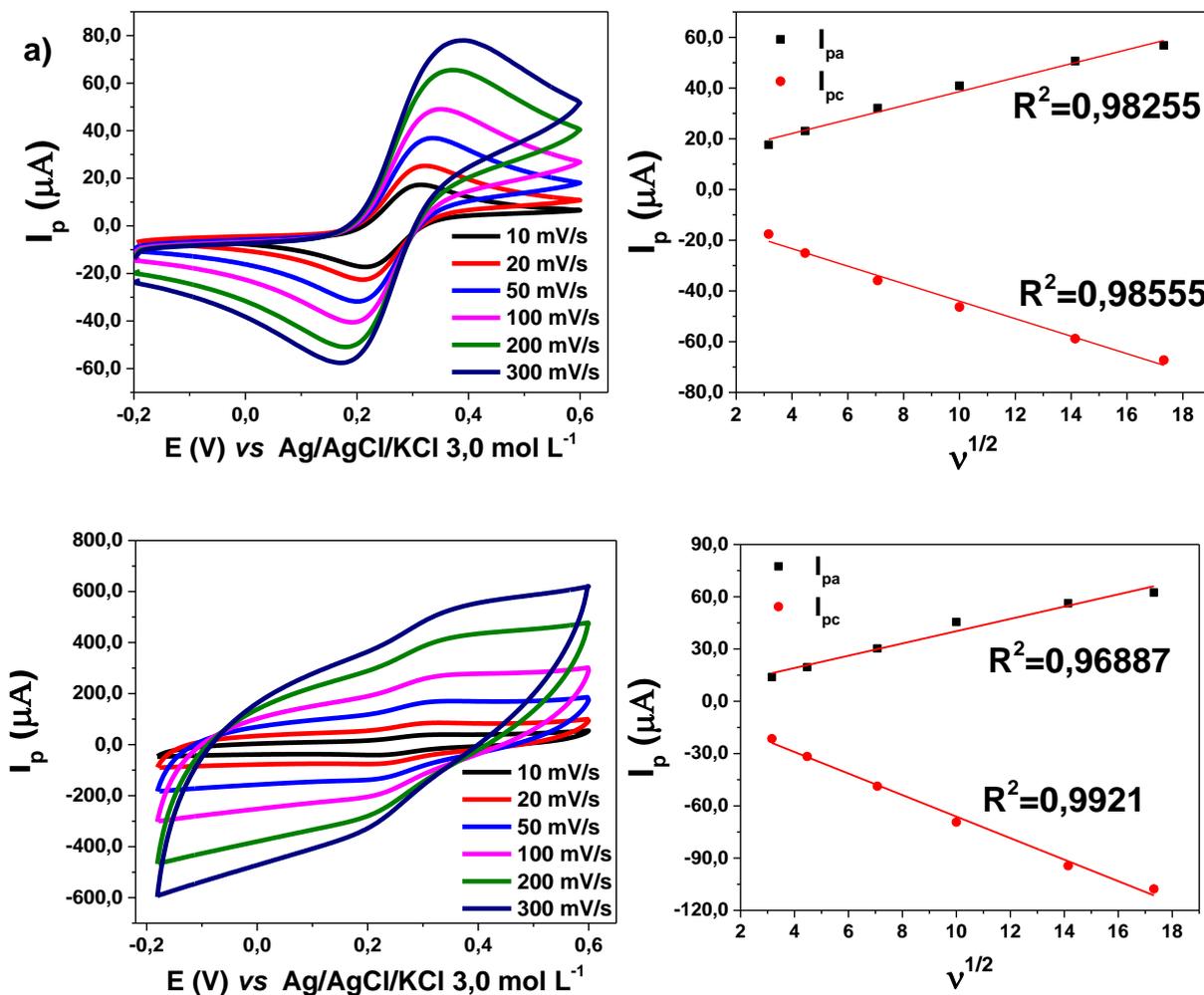


Na Figura 21a e Figura 21b observa-se materiais constituídos de folhas finas, evidenciado por manchas escuras indicando sobreposições destas folhas. Na Figura 21b é possível observar que as folhas de OGr apresentam-se mais rugosas.

5 Caracterização eletroquímica dos eletrodos

A caracterização do comportamento eletroquímico para os eletrodos EPC e ECO foram realizadas por voltametria cíclica em solução $1,00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl contendo $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, que apresenta picos de oxidação e redução bem definidos. As análises foram realizadas nas velocidades de varredura de 10, 20, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1} . Na Figura 22 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos em solução $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl contendo $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, empregando os eletrodos a) EPC e b) ECO em diferentes velocidades de varredura.

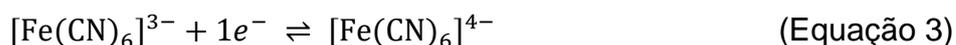


Na Figura 22 observa-se os picos de oxidação referentes a $\text{Fe}(\text{II})/\text{Fe}(\text{III})$ e os potenciais de pico anódico aparecem em torno de $+0,3$ a $+0,4 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). Os picos de redução são de $\text{Fe}(\text{II})/\text{Fe}(\text{III})$, com potencial de pico catódico presentes em aproximadamente $+0,2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). Observa-se um alargamento dos picos de oxidação e redução, para o ECO maior que para o EPC, que pode estar associado ao efeito da corrente capacitiva, estando mais intensa que a corrente faradáica. A relação linear apresentada para o EPC e o ECO, entre a variação da raiz quadrada da velocidade de varredura e a intensidade de corrente dos picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}), é comportamento típico de processos eletroquímicos controlados por

difusão [86]. O ECO frente ao EPC apresentou valores superiores de I_{pa} e I_{pc} , que sugere uma interação mais efetiva entre eletrodo-analito, influenciada pela presença do híbrido de *carbon dots*/óxido de grafeno reduzido na pasta de carbono.

A área superficial é um parâmetro de suma importância para análises eletroquímicas, pois uma área superficial maior pode aumentar a sensibilidade do eletrodo. A equação de Randles-Sevèik (Equação 2), permite calcular a área efetiva dos eletrodos EPC e ECO. Na reação do par redox de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, apenas um elétron participa do processo e o coeficiente difusional (D) é bem estabelecido e igual a $7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [15]. Na Equação 3 está representada a reação do par oxidação-redução para o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

$$I_{pa} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot AD^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad (\text{Equação 2})$$



I_{pa} = corrente de pico anódica (A)

n = número de elétrons envolvidos na reação

A = área efetiva do eletrodo (cm^2)

D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

C = concentração da espécie eletroativa ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)

v = velocidade varredura ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)

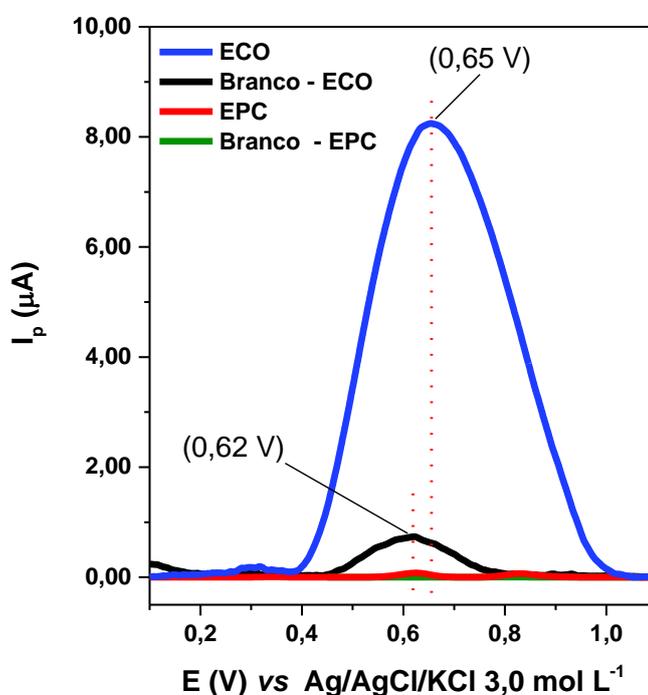
As áreas efetivas calculadas para o EPC e o ECO foram de $0,21 \text{ cm}^2$ e $0,29 \text{ cm}^2$, respectivamente. Observa-se um aumento na área efetiva do ECO em relação ao EPC, que indica que o material híbrido influencia positivamente na interação do eletrodo com o analito, de modo a promover o aumento da área superficial do eletrodo, o que traz uma melhora no desempenho de detecção do analito.

5.1 Detecção voltamétrica de HCQ

As análises realizadas tiveram o objetivo de avaliar o comportamento do EPC e do ECO contendo 5% do material híbrido CD-OGr na presença da hidroxicloroquina (HCQ). Para a obtenção dos voltamogramas de pulso diferencial

anódico, foram realizadas pré-concentrações e varreduras em uma mesma cela eletroquímica, contendo apenas 10 mL do eletrólito suporte (branco), seguida da adição de uma alíquota da solução estoque de HCQ $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, com posterior leitura voltamétrica após a etapa de pré-concentração. As varreduras foram realizadas em triplicata ($n = 3$). Os dados obtidos estão exibidos na Figura 23.

Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ utilizando o ECO. Parâmetros experimentais: Tampão B-R (pH 8,0); tempo de pré-concentração = 180,0 s; velocidade de varredura $10,0 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.



Na Figura 23 observou-se a presença de um pico anódico nos voltamogramas antes da adição do analito, ou seja, na análise voltamétrica realizada com a solução do branco, quando utilizado o ECO, na região de potencial em torno de $+0,62 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). A presença de tal sinal sugere uma possível oxidação da espécie presente como modificante do eletrodo (CD-OG_r). O voltamograma em azul (ECO) mostrou-se bem superior em relação ao EPC, com uma intensidade de sinal de aproximadamente cem vezes maior e pico de corrente anódica em $+0,65 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl).

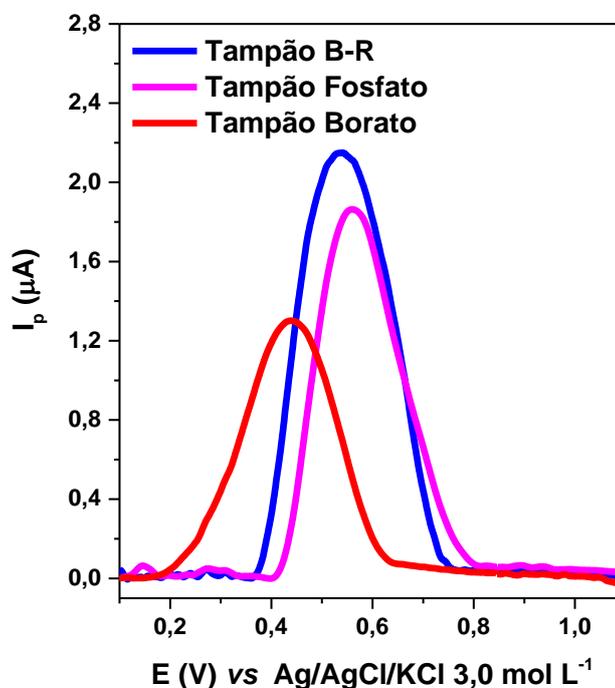
Na etapa seguinte do estudo voltamétrico do ECO serão realizadas otimizações de eletrólito, pH, composição do eletrodo e parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial, com o objetivo de se obter um aumento de sensibilidade na detecção do HCQ utilizando o eletrodo modificado.

5.2 Influência do meio

5.2.1 Eletrólito suporte

O meio eletrolítico tem influência direta em parâmetros como condutividade elétrica, região de pH e força iônica da solução. Dessa forma, foram avaliadas a influência das variáveis como eletrólito de suporte e pH, com o objetivo de se obter parâmetros otimizados, melhorando dessa forma a resposta eletroquímica do eletrodo modificado em relação ao analito. Khoobi *et al.* [87] e Goreishi *et al.* [12] reportaram em seus trabalhos o uso de soluções tampão B-R e tampão fosfato, respectivamente, em pH 8,0 no estudo voltamétrico da HCQ. Neste trabalho foram utilizadas soluções tampão B-R, fosfato e o tampão borato, ambos em pH 8,0 para o estudo da influência do eletrólito suporte, na determinação de HCQ (Figura 24).

Figura 24: Voltamogramas de pulso diferencial anódico do ECO na presença de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em tampão BR, fosfato e borato. Parâmetros experimentais: teor de modificante = 5,0%; pH 8,0; tempo de pré-concentração = 180,0 s; $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.



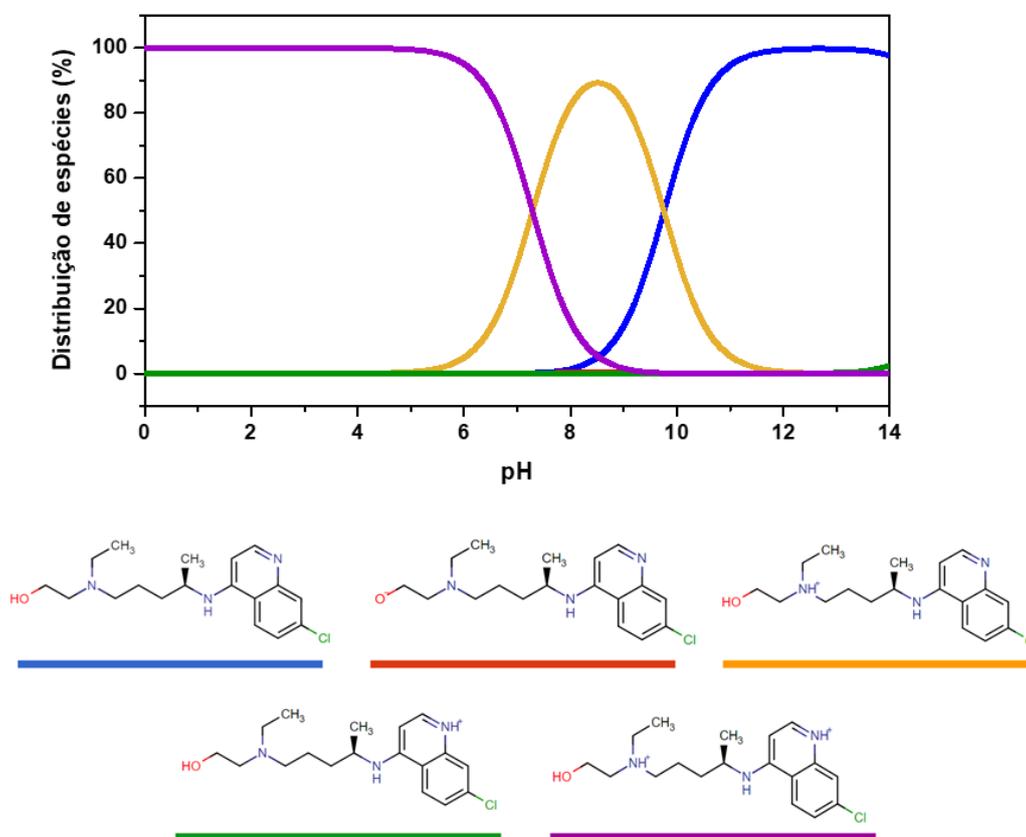
Na Figura 24, observa-se o deslocamento do sinal analítico para o tampão borato e uma intensidade de corrente de pico anódico menor que os outros dois tampões. A diferença de intensidade de corrente entre os tampões B-R e fosfato não foram significativas, mesmo levando-se em consideração suas forças iônicas ($0,50$ e $0,20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). O tampão B-R foi escolhido por permitir uma faixa maior de análise ($2,0 - 12,0$) para a realização do estudo de pH.

A avaliação dos parâmetros otimizados considera a magnitude do sinal de corrente obtida (I_{pa}) e o alargamento e/ou deformação dos picos, caracterizados pela largura de pico à meia altura ($W_{1/2}$). Este último parâmetro foi levado em consideração uma vez que o alargamento dos sinais de corrente pode interferir na seletividade do método e inviabilizar uma eventual análise simultânea.

5.2.2 Influência do pH

O pH da solução tem influência nas características dos materiais utilizados para a modificação de eletrodos e afeta diretamente os processos envolvidos nas reações eletroquímicas, que podem ocorrer por diversos mecanismos de acordo com a espécie presente majoritariamente em cada valor de pH [88]. Na Figura 25 está apresentada a distribuição de espécies da HCQ com a variação do pH.

Figura 25: Gráfico de distribuição das espécies da hidroxicloroquina com a variação de pH. Fonte: Disponível em: <<https://chemicalize.com>>. Acessado em 07/01/2021.

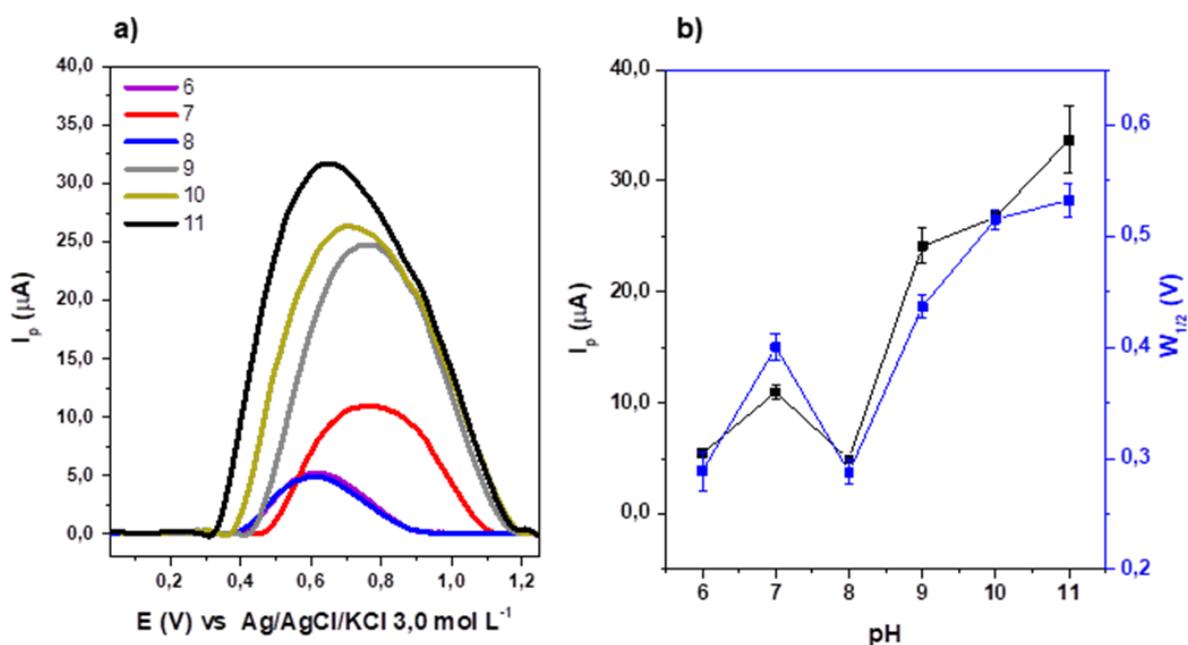


Pode -se observar na Figura 25, que a HCQ apresenta em maior porcentagem de uma espécie com dois nitrogênios protonados, na região de pH ácido, sendo um do anel aminoquinolínico e outro do grupo amino terciário. Observa-se também, que a partir do pH 6,0 há o surgimento de duas espécies, sendo uma monoprotônada,

no nitrogênio do grupo amino terciário, predominante em pH 8,0 e a segunda em pH alcalino acima de 10,0, na forma neutra.

Após a análise das espécies de HCQ foi utilizado tampão B-R no intervalo de pH 6,0 a 11,0, como exibido na Figura 26a.

Figura 26: (a) Voltamogramas de pulso diferencial anódico na presença de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em tampão B-R para diferentes valores de pH, utilizando o ECO; (b) variação da I_p e de $W_{1/2}$, em função do pH; condições do experimento: 5,0% do teor de modificante, pré-concentração 180,0 s, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.



Na Figura 26a foi observado uma tendência de aumento no sinal analítico conforme se aumenta o pH, com um desvio dessa tendência no pH 8,0, indicando uma possível influência do pKa (7,28) do nitrogênio do anel aminoquinolínico, como mostrado na Figura 26b, onde se encontram dados dos picos de intensidade e largura à meia-altura dos respectivos picos.

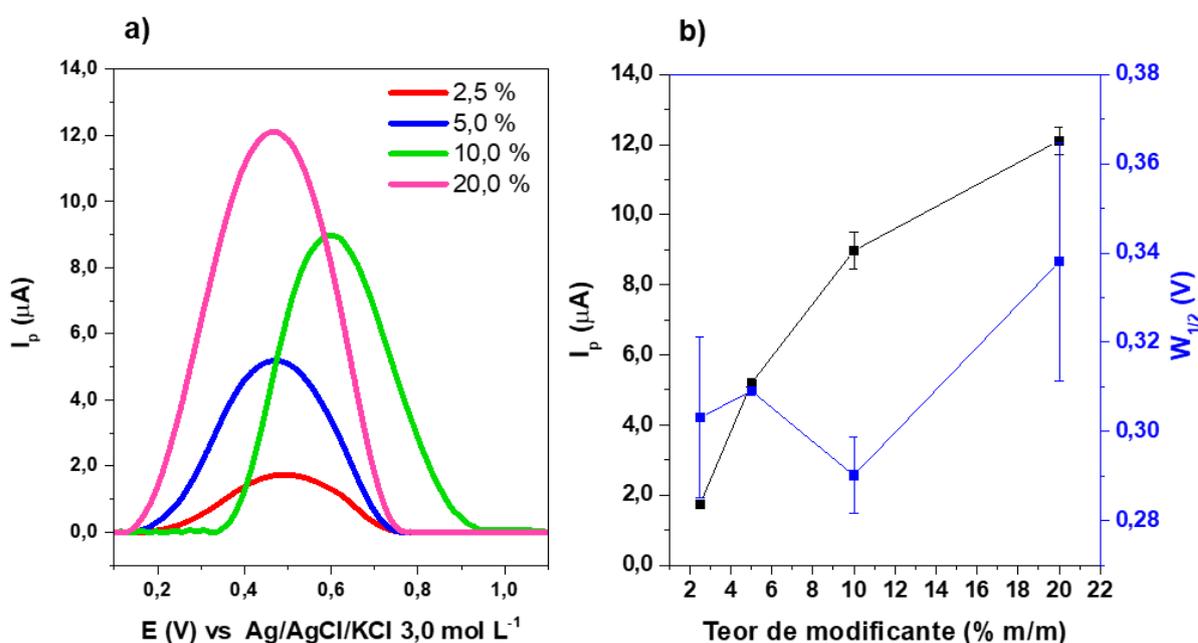
Referente aos resultados obtidos no estudo da influência do pH, a relação entre o sinal analítico do branco, o sinal da HCQ obtido e levando-se em

consideração a largura à meia-altura dos voltamogramas, o pH 8,00 mostrou-se melhor para dar continuidade aos estudos das otimizações para determinação da HCQ, tendo em vista que as varreduras realizadas em pH acima de 8,00 apresentaram um maior alargamento dos voltamogramas.

5.3 Influência do teor do modificante

Um ganho significativo em seletividade e sensibilidade pode ser conseguido mediante a utilização de um agente modificante. Neste sentido realizou-se o estudo do teor de CD-OG_r no ECO, mantendo fixa a proporção em massa 6,5:3,5 (m/m). Para respeitar a proporção de composição do eletrodo, as variações no teor do modificante foram realizadas na porção referente ao sólido (grafite em pó), mantendo a quantidade do líquido (óleo mineral) constante. Os voltamogramas apresentados na Figura 27a, foram obtidos empregando modificações nos eletrodos nas proporções de 2,5%, 5,0%, 10,0% e 20,0% do material híbrido (CD-OG_r).

Figura 27: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do teor de modificante no ECO. Condições experimentais: pH 8,0; tempo de pré-concentração = 180,0 s, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.

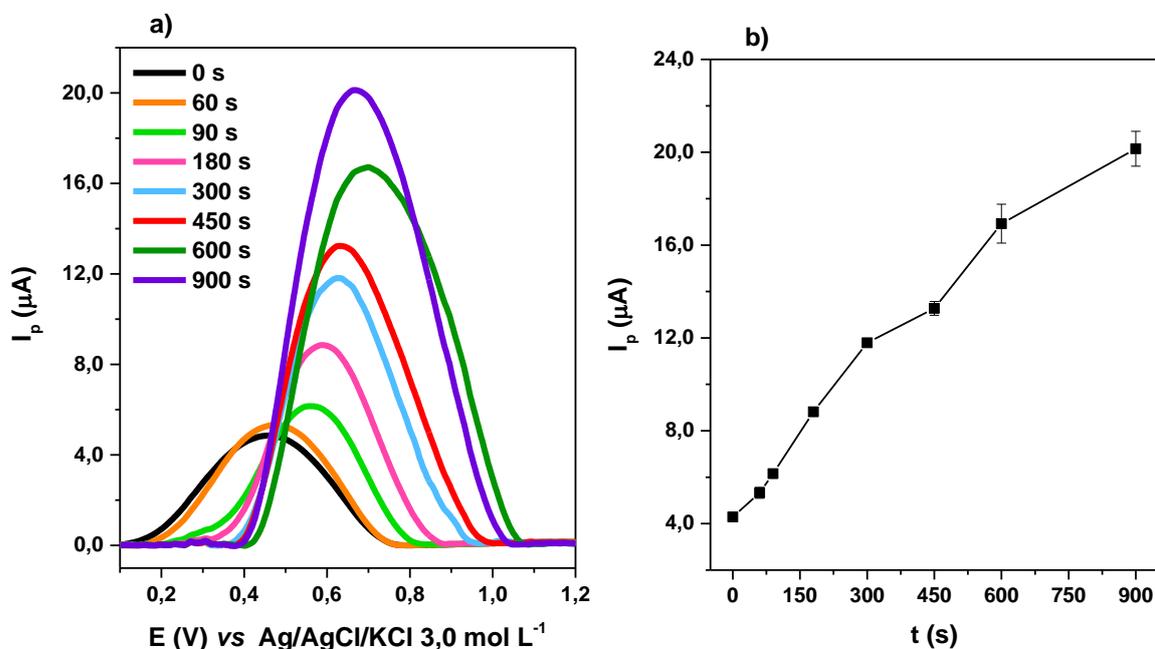


Foi observado um aumento significativo na intensidade do sinal analítico com o incremento da proporção do modificante, conforme apresentado na Figura 27a, indicando que a presença do híbrido aumenta a sensibilidade na detecção da HCQ. Apesar do deslocamento do pico anódico para potenciais mais positivos, a modificação com 10,0% de CD-OGr foi escolhida para dar prosseguimento ao estudo por apresentar uma melhor relação sinal- $W_{1/2}$ (Figura 27b).

5.4 Influência do tempo de pré-concentração

O estudo da influência do tempo de pré-concentração se torna imprescindível para determinar o tempo necessário para que a HCQ seja adsorvida (química e/ou fisicamente) e acumulada na superfície do eletrodo de trabalho. A pré-concentração envolve uma etapa de acumulação seguida de uma etapa de detecção, na qual o material acumulado é faradaicamente oxidado ou reduzido, antes de iniciar a análise voltamétrica, e assim obter uma boa resposta analítica [89]. Para esta etapa foi estudado o comportamento do ECO na detecção da HCQ, em função do tempo (0 a 900 s), como apresentado na Figura 28a.

Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pré-concentração, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificador = 10,0 %, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50,0 mV; tempo de pulso 50,0 ms.



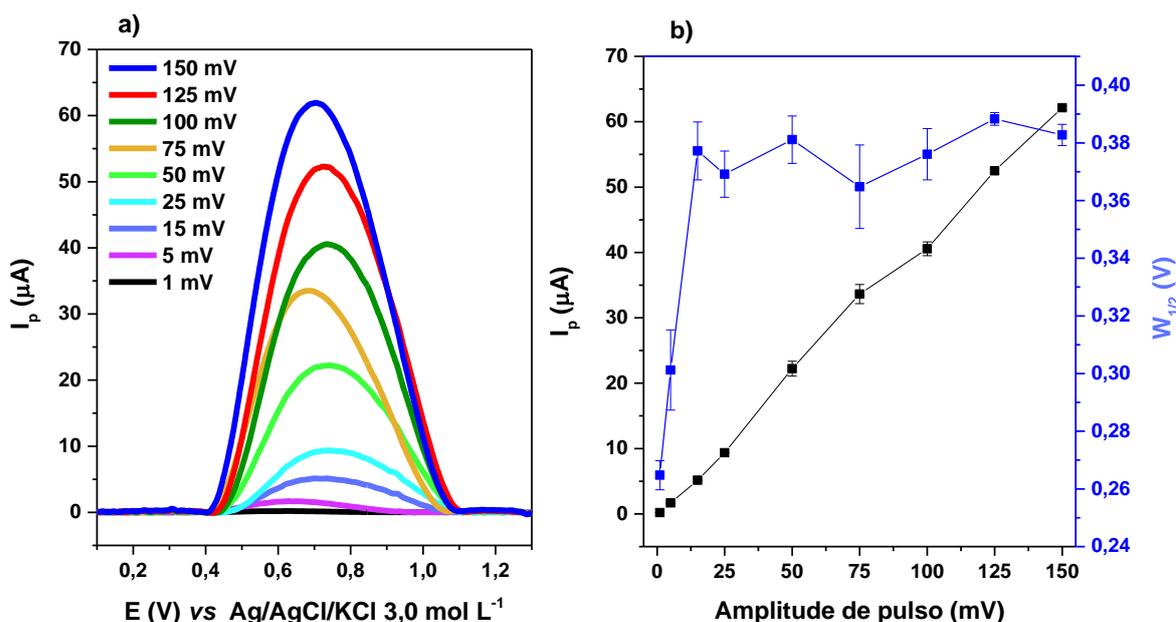
Na Figura 28a foi possível observar o deslocamento do sinal analítico para potenciais mais positivos, com o aumento do tempo de pré-concentração. Não foi possível observar a saturação da superfície do eletrodo, no intervalo de tempo estudado, uma vez que não houve redução na corrente de pico anódico (Figura 28b). Esse comportamento pode estar diretamente relacionado à grande área superficial do CD-OG. O tempo de 300,0 s foi escolhido para dar continuidade ao trabalho, porque tempos de pré-concentração mais altos não apresentaram vantagens em relação à resolução dos picos de corrente obtidos, além do desenvolvimento do método se tornar dispendioso com o uso de maiores tempos de pré-concentração.

5.5 Influência da amplitude de pulso

A amplitude de pulso é caracterizada pela intensidade de potencial elétrico aplicada a cada pulso. O aumento dessa intensidade de potencial pode promover

uma maior energia na superfície do eletrodo, gerando uma maior intensidade do processo faradaico, provocando também um alargamento dos picos, que é associado à baixas resoluções, devido à contribuição da corrente capacitiva, que pode afetar a sensibilidade das medidas. A avaliação da intensidade de corrente e da largura de potencial de pico devem ser consideradas na escolha da amplitude de pulso. A Figura 29a apresenta as respostas eletroquímicas obtidas de acordo com a variação da amplitude do pulso aplicada através da técnica de VPD, com intervalo de 1,0 a 150,0 mV.

Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função da amplitude de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %, $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$, tempo de pré-concentração = 300,0 s; tempo de pulso 50,0 ms.

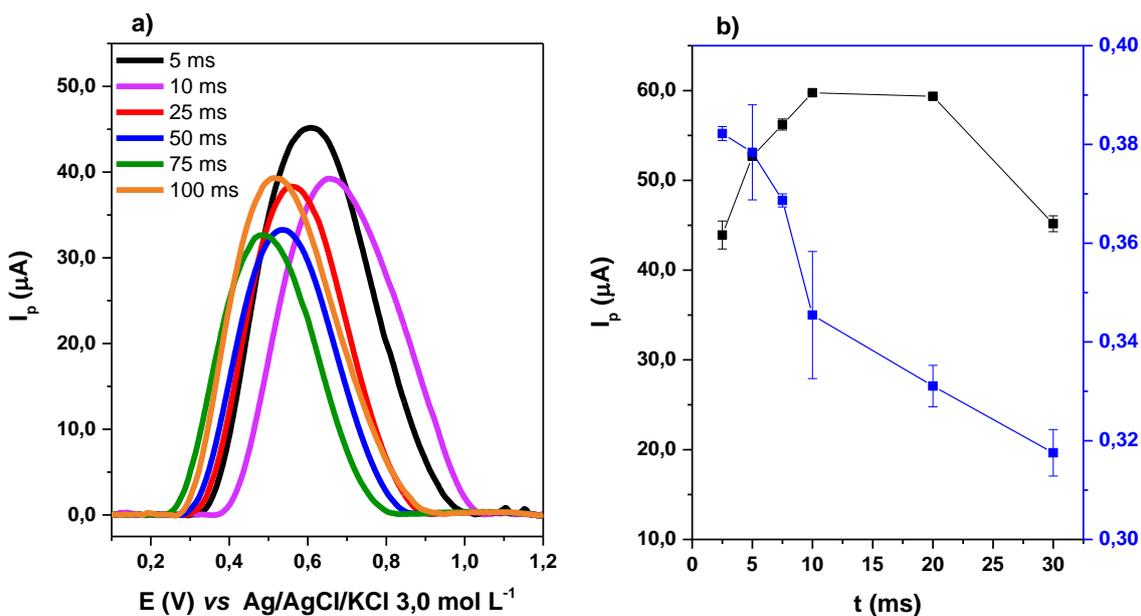


Os resultados na Figura 29 mostraram que 75,0 mV foi o valor de amplitude de pulso que mais contribuiu para um melhor perfil do sinal eletroquímico da HCQ, com intensidade significativa de corrente de pico, levando-se em consideração a largura à meia-altura, não afetando significativamente a resolução da medida.

5.6 Influência do tempo de pulso

O tempo de pulso também é um parâmetro diretamente relacionado com a contribuição da corrente faradaica, que é a corrente de interesse, sendo medido uma vez antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. O tempo de cada medida é dependente deste parâmetro, influenciando diretamente na frequência analítica. Os voltamogramas obtidos no estudo da influência do tempo de pulso estão apresentados na Figura 30.

Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; $\nu = 10,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV.



Na Figura 30a é possível observar um aumento do I_p para um aumento do tempo de pulso, seguido de uma estabilização e redução significativa da corrente de pico anódico para 20,0 e 30,0 ms, respectivamente. Os dados apresentados na Figura 30b, mostram que para tempos de pulsos abaixo de 10,00 ms ocorre o alargamento significativo do sinal eletroquímico, que se torna mais evidente quando utilizado 2,5 ms, assim como também ocorre uma diminuição no sinal analítico. Para os tempos de 10,0 e 20,0 ms não há uma variação significativa na intensidade da

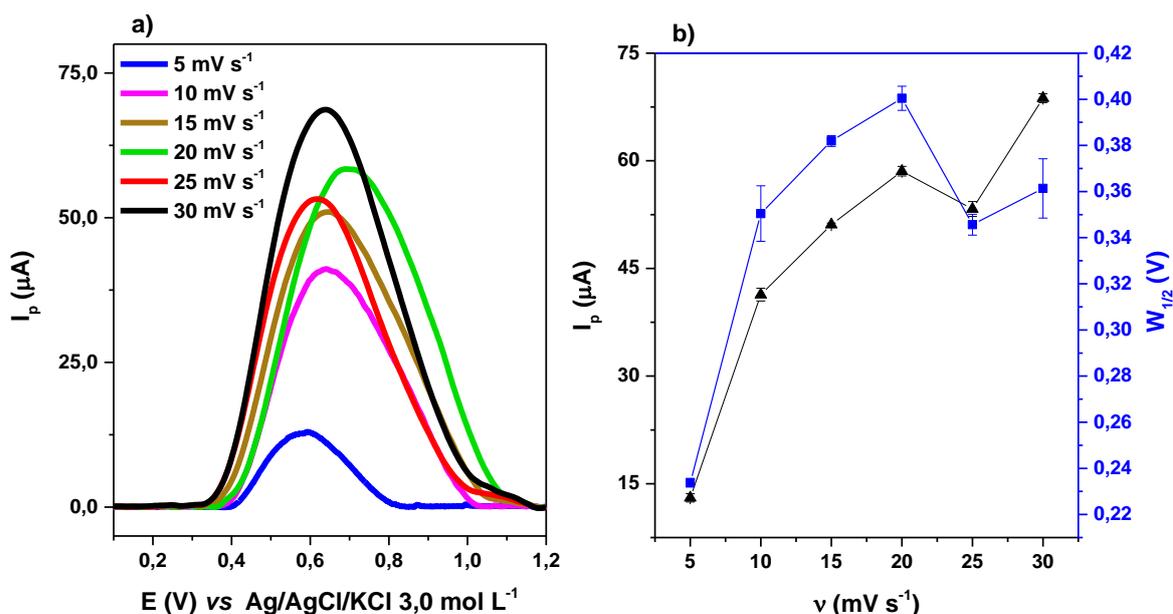
corrente de pico anódico, mas temos a diminuição da largura à meia altura à medida em que se aumenta o tempo de pulso.

O tempo de pulso de 20,0 ms foi escolhido para continuidade dos estudos por apresentar boa relação entre a resposta analítica e a largura à meia-altura ($W_{1/2}$).

5.7 Influência da velocidade de varredura

A velocidade de varredura está associada ao tempo de pulso em segundos. Velocidades de varreduras mais altas podem aumentar o sinal obtido e, dessa forma, melhorar a sensibilidade do método. Em contrapartida, incrementos maiores de potencial podem levar a um alargamento dos picos, podendo diminuir a definição dos picos obtidos. Nessa etapa do estudo foi observada a influência da variação da velocidade de varredura de 5,0 a 30,0 mV s^{-1} , conforme apresentado na Figura 31.

Figura 31: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função do tempo de pulso, utilizando o ECO. Condições experimentais: pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $v = (5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0$ e $30,0 \text{ mV s}^{-1})$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV.



Pode-se observar na Figura 31a o aumento da intensidade de corrente de pico anódico com o aumento da velocidade de varredura. Percebe-se também um deslocamento de + 0,05 V Para a velocidade de 25,0 mV s⁻¹. Na Figura 31b nota-se um desvio do comportamento do sinal analítico, quando utilizado 25 mV s⁻¹, com um deslocamento de 0,073 V para potenciais mais positivos, porém foi observado um menor alargamento do pico anódico em relação ao sinal analítico, sendo esta velocidade a escolhida para continuação do estudo.

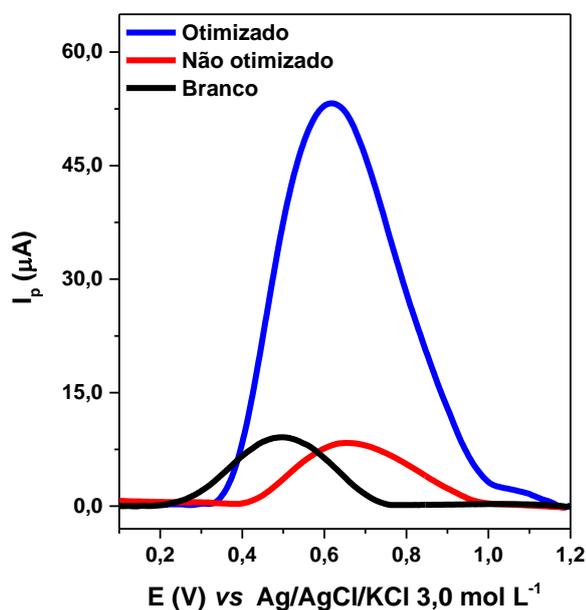
Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros otimizados durante avaliação voltamétrica do ECO frente à detecção da HCQ.

Tabela 3: Parâmetros operacionais otimizados para determinação voltamétrica de HCQ em tampão B-R.

Parâmetros estudados	Intervalo	Parâmetros otimizados
pH	2,0 – 11,0	8,0
Tempo de pré-concentração (s)	0 – 900,0	300,0
Tempo de pulso (ms)	2,5 – 30,0	20,0
Amplitude de pulso (mV)	1,0 – 150,0	75,0
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	5,0 – 30,0	25,0

Os parâmetros otimizados serão utilizados nas próximas etapas do desenvolvimento do método analítico para a aplicação do sensor eletroquímico na determinação de HCQ. Na Figura 32 estão apresentados os voltamogramas para o ECO antes e após a realização das otimizações.

Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para detecção de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em tampão B-R pH 8,0 para o ECO.



Na Figura 32 tem-se um comparativo onde foi possível perceber um aumento da corrente de pico anódico, de cerca de 36 vezes, em decorrência das otimizações realizadas, que podem ser traduzidas em aumento de sensibilidade. Na Tabela 4 temos um resumo comparativo dos parâmetros utilizados no desenvolvimento do ECO para a determinação de $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ.

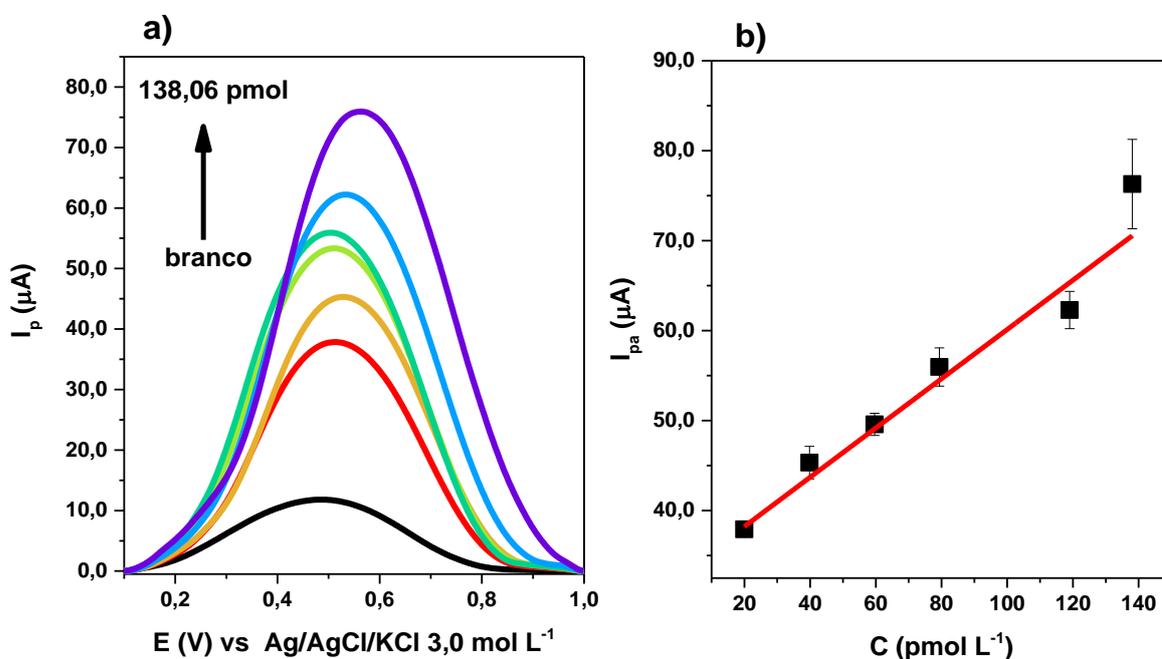
Tabela 4: Comparativo entre os parâmetros utilizados antes e após as otimizações para determinação voltamétrica de HCQ em tampão B-R.

Parâmetros estudados	Parâmetros utilizados	
	Iniciais	Finais
pH	8,0	8,0
Tempo de pré-concentração (s)	180	300
Tempo de pulso (ms)	50,0	20,0
Amplitude de pulso (mV)	50,0	75,0
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	10,0	25,0

6 Validação do método

O desenvolvimento do método iniciou-se após a otimização das condições de medida e parâmetros referentes as melhores condições para determinação de HCQ utilizando o ECO. Para verificar a região de resposta linear para o sensor proposto, o eletrodo modificado foi submetido à detecção de HCQ em diferentes concentrações, resultando na construção da curva analítica. Foram realizadas medidas voltamétricas em triplicata ($n=3$) na faixa de concentração de $19,96 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $282,00 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ, onde foi possível determinar a região linear de $19,96$ a $138,06 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de acordo com a curva analítica apresentada na Figura 33.

Figura 33: Curva de calibração para diferentes concentrações de HCQ ($19,96$; $39,84$; $59,64$; $79,36$; $119,00$ e $138,06 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH $8,0$; teor de modificante = $10,0\%$; tempo de pulso = 20 ms ; $v = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = $300,0 \text{ s}$; amplitude de pulso = $75,0 \text{ mV}$.



Na Figura 33a observa-se o aumento da intensidade de corrente de pico anódico, demonstrando uma dependência dos sinais de corrente pico obtidos em função da adição de HCQ. A Figura 33b foi construída a partir das intensidades de corrente de pico anódico em um potencial fixo de 0,53 V (vs. Ag/AgCl), em seguida um recurso matemático de ajuste linear foi aplicado e obteve-se uma reta que apresenta coeficiente de linearidade (R^2) de 0,980 e equação da regressão linear $I_{pa} (\mu A) = 32,7 + 2,73 \times 10^5 C_{HCQ} (\mu mol \cdot L^{-1})$, na forma da Equação 4:

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

y é a resposta medida;

x: concentração do analito;

a: coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando $x = 0$);

b: coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade).

Com o objetivo de se determinar o desvio-padrão da média aritmética (S_b) e estimar os valores do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram realizadas dez varreduras em tampão B-R sem a presença do analito. O LD é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. O LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis [90,91].

O LD e o LQ podem ser obtidos através das Equações 5 e 6, respectivamente, levando-se em consideração a razão entre S_b e o coeficiente angular da curva analítica (b):

$$LD = 3,3 \frac{S_b}{b} \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ = 10 \frac{S_b}{b} \quad (\text{Equação 6})$$

A Tabela 5 apresenta uma comparação do desempenho analítico do sensor desenvolvido frente a diversos sensores utilizados para determinação de HCQ e reportados pela literatura.

Tabela 5: Comparativo entre diferentes eletrodos modificados para determinação de HCQ.

Eletrodo	Método	LD (mol·L ⁻¹)	LQ (mol·L ⁻¹)	IRL (mol·L ⁻¹)	Ref.
MWCNT/ECV	VPD	$6,00 \cdot 10^{-9}$	*	$5,70 \cdot 10^{-8} - 1,00 \cdot 10^{-4}$	[12]
ECV	VPD	$1,12 \cdot 10^{-5}$	*	$2,00 \cdot 10^{-5} - 5,00 \cdot 10^{-4}$	[67]
ZnS @OGr /ECV	VPD	$0,39 \cdot 10^{-9}$	$1,18 \cdot 10^{-9}$	$5,00 \cdot 10^{-9} - 6,50 \cdot 10^{-8}$	[92]
DDB	VOQ	$0,06 \cdot 10^{-6}$	*	$1,00 \cdot 10^{-7} - 1,90 \cdot 10^{-6}$	[93]
β -CD/EPC	VPD	$4,60 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-2}$	[94]
VS ₂ (QD)/N,S@AGG	VPD	$0,28 \cdot 10^{-8}$	*	$0,84 \cdot 10^{-8} - 22,5 \cdot 10^{-8}$	[95]
CNNS/EPC	VPD	$0,16 \cdot 10^{-9}$	*	$0,01 \cdot 10^{-6} - 6,92 \cdot 10^{-6}$	*
ECO	VPD	$2,40 \cdot 10^{-12}$	$7,99 \cdot 10^{-12}$	$1,99 \cdot 10^{-11} - 1,38 \cdot 10^{-10}$	**

IRL- Intervalo de resposta linear. MWCNT/ECV- Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono. ZnS @OGr /ECV- Nanopartículas de sulfeto de zinco suportadas em óxido de grafeno reduzido. DDB- Eletrodo de diamante dopado com boro. β -CD/EPC- Eletrodo de pasta de carbono modificado com ionóforo de β -ciclodextrina. VS₂ (QD)/N, S@AGG- *Quantum dots* de dissulfeto de vanádio suportados em aerogel de grafeno, co-dopado com nitrogênio e enxofre. CNNS/E- Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanofolhas de nitreto de carbono. *Não informado pelos autores. **Eletrodo estudado neste trabalho.

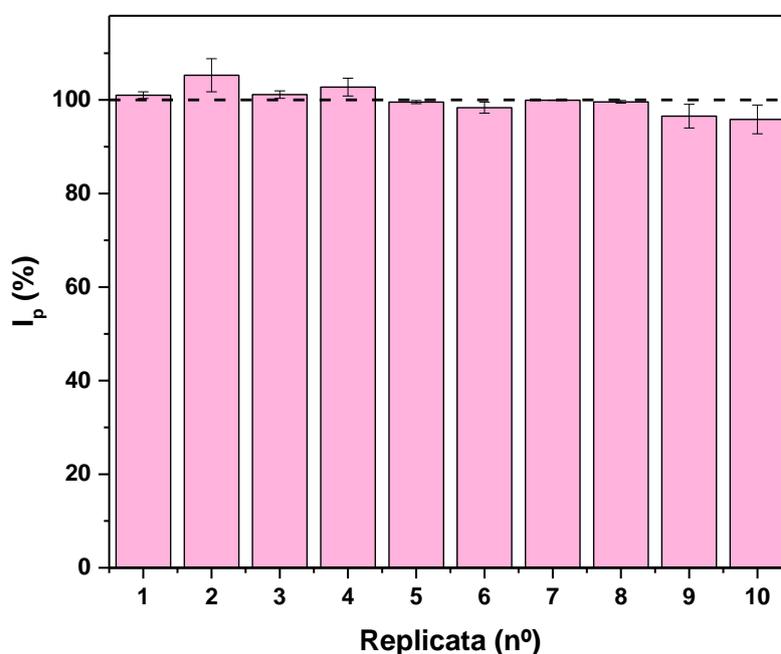
Na Tabela 5 observa-se que o ECO apresentou baixos valores de LD e de LQ, assim como um significativo intervalo de resposta linear, além de um método de preparo de eletrodos mais simples aliado a forma como a superfície eletródica é renovada, o que se faz necessário entre cada varredura. Os dados da Tabela 5 comprovam que o eletrodo desenvolvido pode detectar de forma satisfatória a HCQ, em relação a outros eletrodos modificados. Além disso, os baixos limites de LD e LQ obtidos com o sensor permitem a sua aplicação em matrizes como resíduos de origem biológica e produtos de origem farmacêutica.

7 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

A precisão do método foi avaliada, através dos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade, com o intuito de garantir um bom desempenho analítico para o

ECO, durante as determinações de HCQ. Desta forma, no estudo da repetibilidade foram realizadas dez medições sucessivas ($n = 10$), com renovação da superfície do eletrodo, após cada varredura. Na Figura 34 estão apresentadas as intensidades relativas de cada varredura, em relação ao valor médio das medidas.

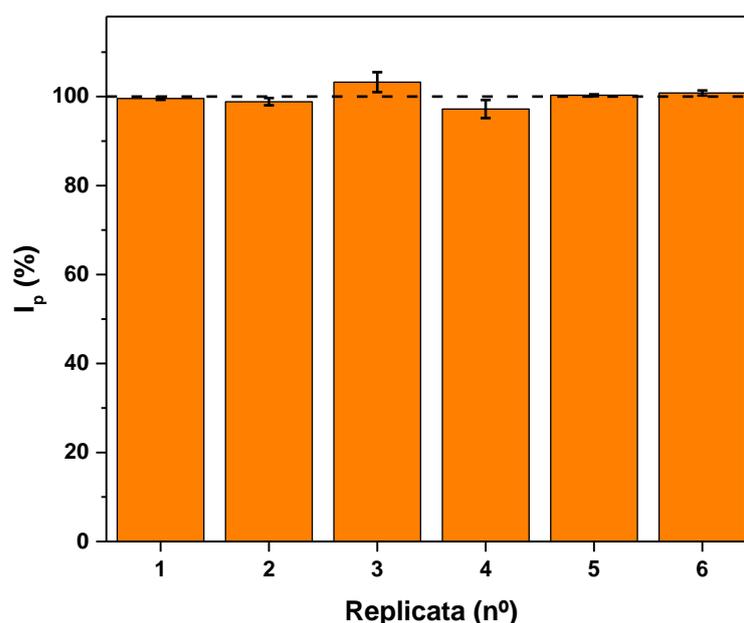
Figura 34: Variação relativa das correntes de pico anódicos para $59,6 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV; $n=10$.



Na Figura 34 os valores de corrente de pico relativos obtidos para cada medida foram comparados à média de todas as intensidades de correntes ($I_{pa} = 41,00 \pm 1,15 \mu\text{A}$), e observou-se que tais medidas não apresentaram diferenças significativas entre si, não havendo uma variação maior do que $\pm 2,79\%$ entre as intensidades de correntes de pico relativas. Indicando que o método apresenta uma boa repetibilidade analítica, estando de acordo com os critérios de aceitação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO, que permite um desvio-padrão relativo de até 30 % para concentrações de analitos da ordem de 1 parte por bilhão (ppb) ou $\mu\text{g}/\text{kg}$ [90].

Para o estudo da reprodutibilidade foi avaliada a variação nas medidas de VPD para um mesmo eletrodo modificado, realizando seis varreduras consecutivas, com a renovação da superfície após cada varredura. As intensidades relativas estão apresentadas na Figura 35.

Figura 35: Variação relativa das correntes de pico anódicos para $59,6 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV; $n = 6$.



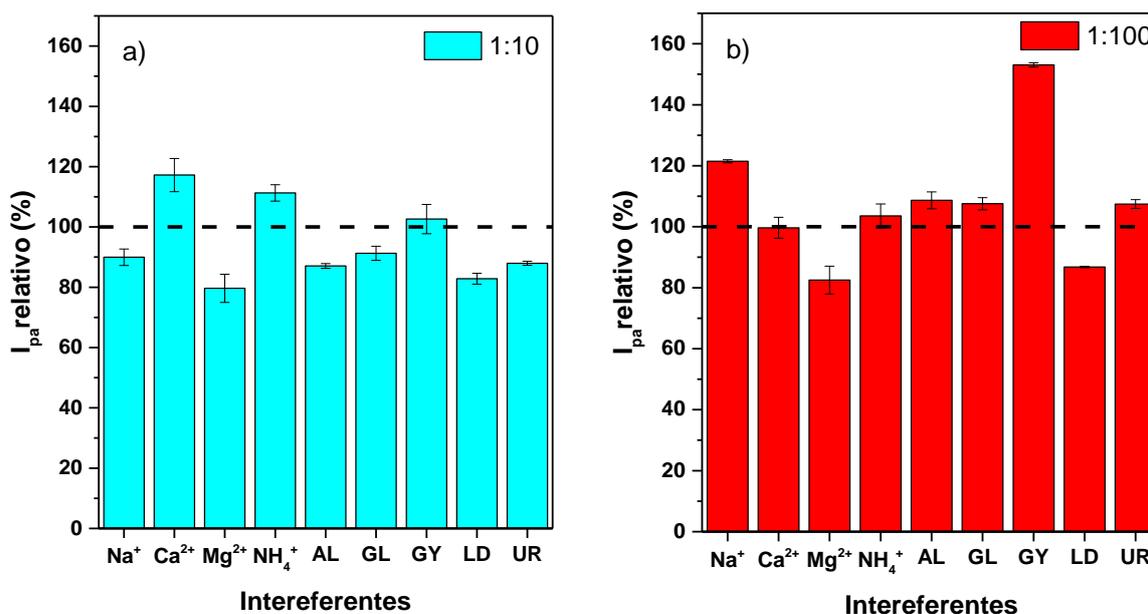
Na Figura 35, foi observa-se pequenas variações de $\pm 2,03 \%$ em relação à média das medidas. Este percentual não apresenta diferença significativa e se encontra dentro dos critérios de aceitação para reprodutibilidade, aceitando desvios-padrão relativos de até 45%, para concentrações da ordem de 1 ppb ou $\mu\text{g}/\text{kg}$, de acordo com o Inmetro [90].

7.1 Estudo de Substâncias Interferentes

A seletividade do método foi avaliada no estudo de interferentes frente ao sinal analítico da HCQ. Foram utilizadas substâncias como íons metálicos, sais minerais, ácidos orgânicos e açúcares, que podem causar alguma variação na intensidade da

corrente de pico e/ou no perfil voltamétrico da HCQ, atuando como possíveis interferentes no sinal analítico. Para realizar este estudo utilizou-se substâncias empregadas como interferentes em estudos prévios, encontrados na literatura, a exemplo do trabalho de Alkahtani *et al.* [92]. O estudo foi realizado em dois níveis de concentração das possíveis espécies interferentes, onde a concentração da HCQ foi $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e dos interferentes de 10 e 100 vezes maior que a concentração do HCQ. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 36, onde: AL = Alanina; GL = Glicina; GY = Glicose; LD = Lidocaína e UR = Uréia.

Figura 36: Variação das correntes de pico anódicas obtidas para $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCQ em função de substâncias interferentes inorgânicas e orgânicas, em concentrações de a) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e b) $5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.



Na Figura 36a observa-se dentre as substâncias estudadas, as que mais acarretaram em variação de corrente de pico de HCQ com relação ao valor de referência (linha tracejada), foram NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} tendo as duas últimas uma interferência de aproximadamente 20%. Para as substâncias orgânicas e o cátion Na^+ a interferências variou de 2,62 à 17,15 %, sendo a lidocaína a substância que mais interferiu no sinal analítico da HCQ. Na Figura 36b foram registradas interferências para a concentração 100 vezes superior à da HCQ e, observou-se

que o Na^{2+} , Mg^{2+} e LD promoveram variações no sinal analítico entre 17,50 e 21,47%. O NH_4^+ e Ca^{2+} apresentaram interferência dentro do desvio-padrão do sinal de HCQ. Dentre as substâncias orgânicas a glicina alterou para valores maiores a resposta analítica em 53,04%.

O ECO apresentou desempenho satisfatório na avaliação de substâncias concomitantes, porém outros parâmetros de análise deverão ser observados diante de amostras que contenham as espécies estudadas nesta etapa do desenvolvimento do método analítico.

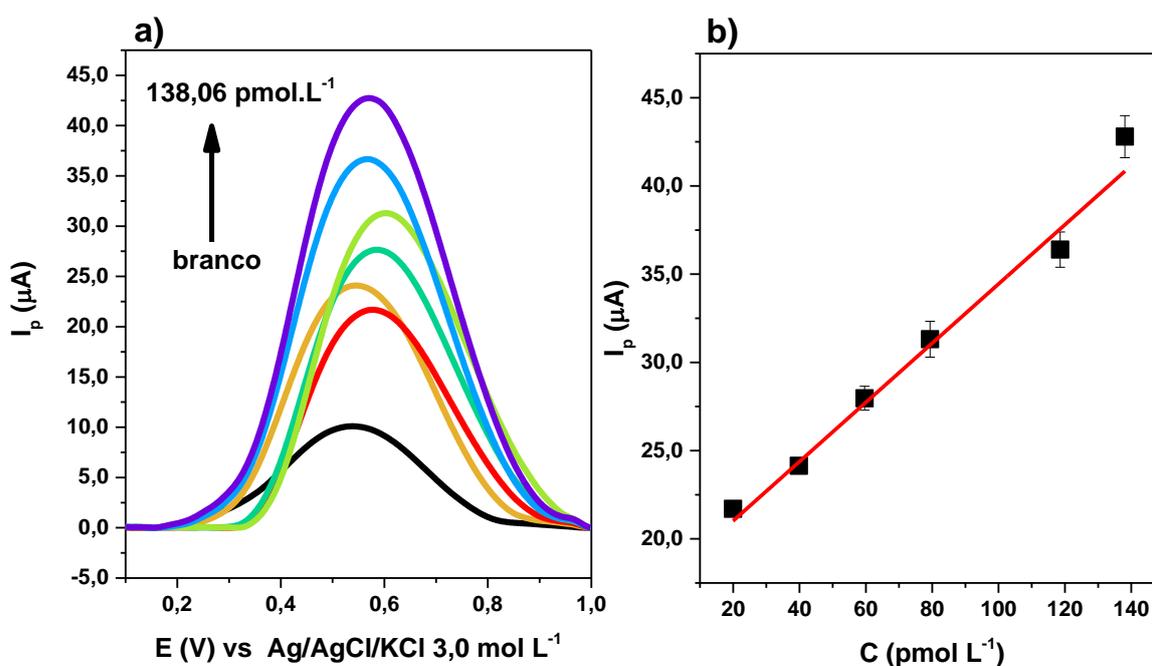
8 Determinação de HCQ em amostras fortificadas

Para avaliar o método proposto neste trabalho, o ECO foi empregado na determinação de HCQ em amostras de urina sintética e formulação farmacêutica (comprimidos). As soluções das amostras foram preparadas de acordo com o item 3.4 da metodologia. A metodologia adotada para recuperação do HCQ nas matrizes avaliadas, foi a curva de adição de padrão com as amostras de urina sintética fortificadas com $2,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de HCQ. Para a solução do comprimido utilizou-se uma solução preparada a partir de comprimidos macerados, na mesma concentração utilizada para a urina sintética ($2,00 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto obtido das curvas analíticas.

8.1 Urina sintética

A avaliação do efeito matriz é um estudo onde se objetiva verificar possíveis interferências, causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, podendo gerar fenômenos de diminuição ou aumento da resposta analítica [96]. Para contornar o efeito de matriz, realizou-se uma curva de calibração em matriz de urina sintética, utilizando a solução fortificada em todos os pontos da curva de calibração, conforme apresentado na Figura 37.

Figura 37: Curva de calibração para diferentes concentrações de HCQ (19,96; 39,84; 59,64; 79,36; 119,00 e 138,06 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em urina sintética, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV.



Observou-se na Figura 37a uma diminuição das intensidades das correntes de pico, em relação à curva de calibração da Figura 33, para todas as concentrações avaliadas no intervalo de resposta, em cerca de 55%. Isto pode ser consequência da competição entre a HCQ e componentes presentes na matriz, gerando uma redução de sinal analítico. Assim como na curva analítica apresentada no item 6 (validação do método), observou-se a dependência da intensidade do pico de corrente com o aumento na concentração do analito. A curva obtida na Figura 37b possui coeficiente de linearidade de $R^2 = 0,984$ e equação de regressão linear $I_{pa} (\mu\text{A}) = 17,71 + 1,68 \cdot 10^5 C_{\text{HCQ}} (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$.

Na Tabela 6 estão exibidos os valores obtidos para recuperação do analito a partir da equação de ajuste linear, para as concentrações de 59,64 e 79,36 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 6: Resultados das recuperações referentes às concentrações de HCQ em urina sintética e seus respectivos desvios padrão relativos.

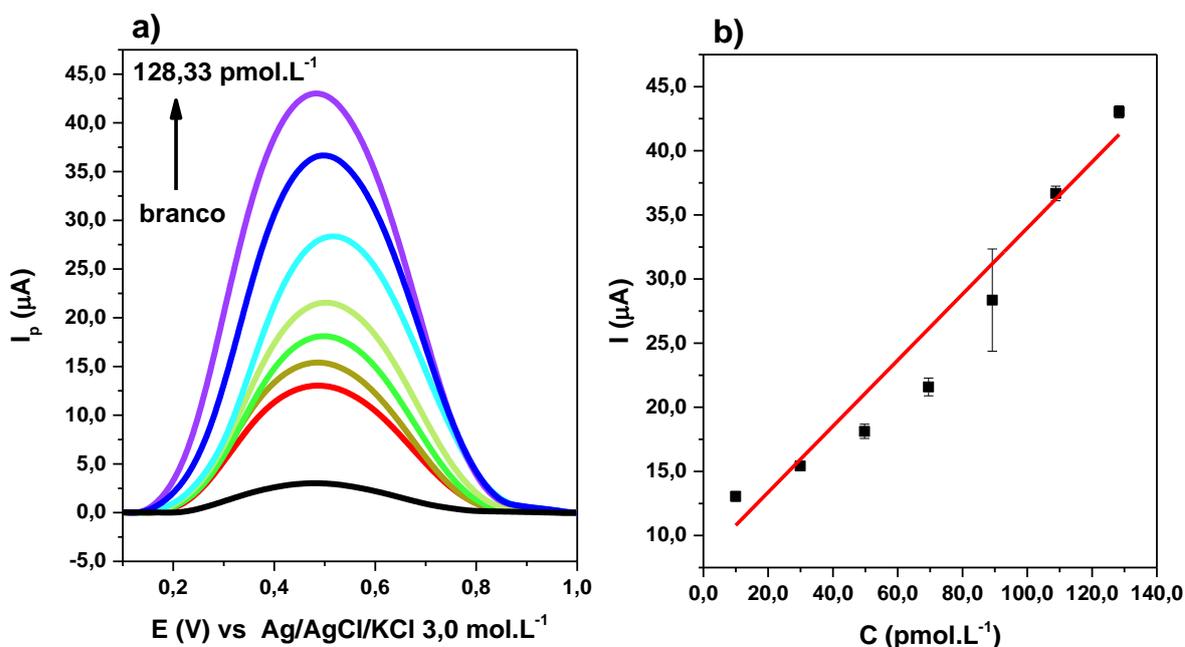
Concentração de HCQ ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração recuperada	DPR (%)
59,64	103,07	61,47	2,43
79,36	106,83	84,79	2,75

Os resultados expressos na Tabela 6 demonstram que o sensor desenvolvido é eficiente para determinação de HCQ em amostras de urina.

8.2 Formulação farmacêutica (comprimidos)

O ECO foi empregado na determinação de HCQ em comprimidos antimaláricos comerciais, contendo 400 mg de sulfato de hidroxicloroquina. Desta forma, realizou-se a análise do branco (tampão B-R, pH 8,00) e em seguida adicionou-se na cela eletroquímica uma alíquota da solução preparada a partir dos comprimidos, conforme item 3.4.1, para obter uma concentração de $10,0 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Na Figura 38 está apresentada a curva analítica.

Figura 38: Curva de calibração obtida para diferentes concentrações de HCQ (10,00; 29,91; 49,75; 69,51; 89,19; 108,80 e 128,33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), para comprimidos comerciais, utilizando o ECO. Condições experimentais: tampão B-R pH 8,0; teor de modificante = 10,0 %; tempo de pulso = 20 ms; $\nu = 25,0 \text{ mV s}^{-1}$; tempo de pré-concentração = 300,0 s; amplitude de pulso = 75,0 mV.



Os voltamogramas mostrados na Figura 38a evidenciam o incremento da corrente de pico anódica, proporcional a adição de 10,00 a 128,33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ da hidroxicloroquina. A curva analítica resultante apresentou um comportamento linear, conforme Figura 38b, com $R^2 = 0,983$ e equação linear $I_{pa}(\mu\text{A}) = 8,22 + 2,57 \cdot 10^5 C_{\text{HCQ}} (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$. Os valores obtidos das recuperações estão apresentados na Tabela 7, para dois níveis de concentrações.

Tabela 7: Resultados das recuperações referentes às concentrações de HCQ em comprimidos comerciais e seus respectivos desvios padrão relativos.

Concentração de HCQ no comprimido	Recuperação (%)	Concentração recuperada	DPR (%)
400,00 mg	101,55	406,20	1,55
	105,34	421,36	1,09

As recuperações encontradas nas Tabelas 6 e 7 corroboram com a potencialidade do material híbrido sintetizado para atuar como modificante de eletrodos de pasta de carbono, na detecção do analito selecionado para o desenvolvimento deste trabalho. Levando-se em consideração a dimensão das concentrações utilizadas para se obter a curva de calibração e a faixa de recuperação aceitável (40 a 120%) pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pelo Inmetro, conforme Tabela 8 [90,97].

Tabela 8: Critério de aceitação para recuperação

Analito (%)	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média (%)
100	1	100%	98 – 102
10	10-1	10%	98 – 102
1	10-2	1%	97 – 103
0,1	10-3	0,1%	95 – 105
0,01	10-4	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10-5	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10-6	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10-7	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: *Association of Official Analytical Chemists, 2016.*

Neste sentido, a recuperação é definida como a razão entre o resultado médio do teste observado e o valor real. A faixa da recuperação média aceitável se expande conforme a concentração do analito diminui.

De maneira geral, pode-se dizer que a determinação de HCQ, tanto em comprimidos comerciais quanto em urina sintética, apresentou resultados satisfatórios e a aplicação do teste estatístico *t-Student* demonstrou que os valores recuperados são concordantes com os valores adicionados de HCQ, em um nível de confiança de 95%.

9 Conclusão

A caracterização física mostrou que foi possível obter um material híbrido baseado em *carbon dots* suportados em matriz de óxido de grafeno reduzido.

A área superficial efetiva do eletrodo ECO apresentou-se maior em relação à área do EPC. Esse aumento possibilita uma maior interação entre o eletrodo e o analito em questão. A caracterização eletroquímica mostrou que o eletrodo ECO apresenta maior eletroatividade que o EPC. As otimizações dos parâmetros do meio eletrolítico e da técnica de VPD resultaram em um ganho de corrente expressivo para o sinal analítico da HCQ, possibilitando uma maior sensibilidade do método a ser construído posteriormente. O eletrodo de pasta de carbono modificado com o material híbrido CD-OGr mostrou capacidade para detectar a presença de hidroxicloroquina em soluções aquosas.

O estudo voltamétrico do ECO frente à HCQ, em condições experimentais otimizadas, possibilitou a criação de um método analítico para determinação de hidroxicloroquina em urina sintética e formulações farmacêuticas.

10 Perspectivas do trabalho

- Obter micrografias de MET dos materiais CD e CD-OGr;
- Publicar artigos científicos em revistas indexadas.

11 Produção científica

- Um material híbrido baseado em CD/OGr aplicado para determinação voltamétrica de hidroxicloroquina. Trabalho apresentado na modalidade oral, no XXIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, online, novembro, 2021.
- Líquido iônico prótico para a construção de sensor eletroquímico aplicado na detecção de pesticida. Trabalho publicado no livro eletrônico “Trabalhos nas áreas de fronteira da Química”, divulgado em fevereiro de 2021 pela Editora Atena;
- Detecção de ciprofloxacina aplicando um sensor eletroquímico à base de derivado do grafeno e líquido iônico. Aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico “Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química” divulgado em fevereiro de 2021 pela Editora Atena;
- Eletroquímica: eletrodos modificados e suas potencialidades, 2020. Trabalho publicado na Revista Virtual de Química. Volume 12. Número 5. DOI: 10.21577/1984-6835.20200092;
- Synthesis and characterization of carbon dots supported in reduced graphene oxide, 2020. Trabalho publicado na 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ;
- OBJETOS DE APRENDIZAGEM DIGITAIS: O OLHAR DOCENTE, 2019. Trabalho publicado na XIII Escola de Verão em Educação Química (EVEQUIM) e XI Encontro Estadual de Química (ENESQUIM). “O Desafio para implementação de novas propostas curriculares no Ensino de Química no Brasil”, 2019. p. 349-359;
- Characterization of pigments used on a reference canvas by multiple techniques, 2018. Trabalho publicado na revista X-RAY SPECTROMETRY. Volume 48, p 46-60. DOI: 10.1002/xrs.2986

12 Referências

- [1] World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed Jan 10, 2021).
- [2] Pan, H.; Peto, R.; Karim, Q. A.; Alejandria, M.; Henao-Restrepo, A. M.; García, C. H.; Kieny, M.-P.; Malekzadeh, R.; Murthy, S.; Preziosi, M.-P.; et al. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *MedRxiv* **2020**, 1–15.
- [3] Corrêa, M. C. D. V.; Barroso, L. V.; Gouvea, W. B. Controvérsias Em Torno Do Uso Experimental Da Cloroquina / Hidroxicloroquina Contra a Covid-19: “No Magic Bullet.” *Physis Rev. Saúde Coletiva* **2020**, 30 (2), 1–21.
- [4] S.A, G. C. e P. Brasil ultrapassa 520 mil mortos por Covid; média móvel de casos é a menor desde fevereiro <https://g1.globo.com/bemestar/coronavirus/noticia/2021/07/01/brasil-ultrapassa-520-mil-mortos-por-covid-media-movel-de-casos-e-a-menor-desde-fevereiro.ghtml> (accessed Jul 1, 2021).
- [5] Ministério da Saúde do Brasil. Painel Coronavirus <https://covid.saude.gov.br/> (accessed Nov 22, 2021).
- [6] Kumar, J.; Jain, S.; Meena, J.; Yadav, A. Efficacy and Safety of Hydroxychloroquine/Chloroquine against SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Infect. Chemother.* **2021**, 27 (6), 882–889.
- [7] Infante, M.; Ricordi, C.; Alejandro, R.; Caprio, M.; Fabbri, A. Hydroxychloroquine in the COVID-19 Pandemic Era: In Pursuit of a Rational Use for Prophylaxis of SARS-CoV-2 Infection. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2020**, 19 (1), 5–16.
- [8] Binson, G.; Venisse, N.; Sauvaget, A.; Bacle, A.; Lazaro, P.; Dupuis, A. Preparation and Physicochemical Stability of 50 Mg/ML Hydroxychloroquine Oral Suspension in SyrSpend® SF PH4 (Dry). *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**,

56 (6), 106201.

- [9] Cortegiani, A.; Ingoglia, G.; Ippolito, M.; Giarratano, A.; Einav, S. A Systematic Review on the Efficacy and Safety of Chloroquine for the Treatment of COVID-19. **2020**, *57*, 279–283.
- [10] Silva, J. D. O. S.; Sant’Anna, M. V. S.; Gevaerd, A.; Lima, J. B. S.; Monteiro, M. D. S.; Carvalho, S. W. M. M.; Sussuchi, E. M. A Novel Carbon Nitride Nanosheets-Based Electrochemical Sensor for Determination of Hydroxychloroquine in Pharmaceutical Formulation and Synthetic Urine Samples. *Electroanalysis* **2021**.
- [11] ANVISA, A. N. de V. S. Sulfato de Hidroxicloroquina EMS S/A Comprimido Revestido 400 Mg. Brasília 2021, pp 1–15.
- [12] Ghoreishi, S. M.; Attaran, M.; Amin, M. RSC Advances Nanosensor for Electrochemical Studies and Stripping Voltammetric Determination of an Antimalarial Drug. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 14407–14415.
- [13] Khalil, M. M.; Mostafa, S. M.; Masoud, A. A. A Novel Coated Graphite Sensor for Potentiometric Determination of Hydroxychloroquine Sulfate. *Sch. Rep.* **2016**, *1* (2), 1–10.
- [14] Compton, R. G. . G. E. B. Understand Voltammetry. 2014, p 429.
- [15] Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; Almeida, V. G. K. De; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, Q. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos Voltammetry: A Brief Review About Concepts Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos. **2013**, *5* (4), 516–537.
- [16] Skoog, D. A.; West, D.; Holler, F. J. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Thomson: São Paulo, 2006.
- [17] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Princípios de Análisis Instrumental*. **2008**.
- [18] Zima, J.; Svancara, I.; Barek, J.; Vytras, K. Recent Advances in Electroanalysis of Organic Compounds at Carbon Paste Electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *39* (3), 204–227.

- [19] Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95* (2), 197–206.
- [20] Allen, J. B.; Larry, R. F. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, 2001.
- [21] Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; 2000; Vol. 3.
- [22] Scholz, F. Voltammetric Techniques of Analysis: The Essentials. *ChemTexts* **2015**, *1* (4), 1–24.
- [23] Brett, A. M. C. F. O.; Brett, C. M. A. *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*; Almedina Coimbra: Coimbra, 1996; Vol. 1.
- [24] Compton, R. G.; Banks, C. E. *Understanding Voltammetry*; World Scientific, 2018.
- [25] Monteiro, M. D. S.; Dos Santos Júnior, J. C.; Sussuchi, E. M. Electrochemistry: Modified Electrodes and Their Potentialities. *Rev. Virtual Quim.* **2020**, *12* (5), 1145–1160.
- [26] Pereira, A. C.; Santos, A. de S.; Kubota, L. T. Tendências Em Modificação de Eletrodos Amperométricos Para Aplicações Eletroanalíticas. *Quim. Nova* **2002**, *25* (6), 1012–1021.
- [27] Zhou, S.; Han, X.; Fan, H.; Liu, Y. Electrochemical Sensing toward Trace as(III) Based on Mesoporous MnFe₂O₄/Au Hybrid Nanospheres Modified Glass Carbon Electrode. *Sensors (Switzerland)* **2016**, *16* (6).
- [28] Nascimento, V. B.; Angnes, L. ELETRODOS FABRICADOS POR "SILK-SCREEN." *Quim. Nova* **1998**, *21* (5), 614–629.
- [29] Ashrafi, A. M.; Richtera, L. Preparation and Characterization of Carbon Paste Electrode Bulk-Modified with Multiwalled Carbon Nanotubes and Its Application in a Sensitive Assay of Antihyperlipidemic Simvastatin in Biological Samples. *Molecules* **2019**, *24* (Cvd), 2215.
- [30] Wen, G. L.; Zhao, W.; Chen, X.; Liu, J. Q.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Huang, Z. J.; Wu, Y. C. N-Doped Reduced Graphene Oxide /MnO₂ Nanocomposite for

- Electrochemical Detection of Hg²⁺ by Square Wave Stripping Voltammetry. *Electrochim. Acta* **2018**, *291*, 95–102.
- [31] Li, J.; Jiang, J.; Zhao, D.; Xu, Z.; Liu, M.; Deng, P.; Liu, X.; Yang, C.; Qian, D.; Xie, H. Facile Synthesis of Pd/N-Doped Reduced Graphene Oxide via a Moderate Wet-Chemical Route for Non-Enzymatic Electrochemical Detection of Estradiol. *J. Alloys Compd.* **2018**, *769*, 566–575.
- [32] Shankar, S. S.; Shereema, R. M.; Ramachandran, V.; Sruthi, T. V.; Kumar, V. B. S.; Rakhi, R. B. Carbon Quantum Dot-Modified Carbon Paste Electrode-Based Sensor for Selective and Sensitive Determination of Adrenaline. *ACS Omega* **2019**, *4* (4), 7903–7910.
- [33] Ghapanvari, M.; Madrakian, T.; Afkhami, A.; Ghoorchian, A. A Modified Carbon Paste Electrode Based on - Fe₃O₄@multi - Walled Carbon Nanotubes@polyacrylonitrile Nanofibers for Determination of Imatinib Anticancer Drugfile. *J. Appl. Electrochem.* **2020**, *50* (0123456789), 281–294.
- [34] Amini, N.; Shamsipur, M.; Gholivand, M. B.; Barati, A. A Glassy Carbon Electrode Modified with Carbon Quantum Dots and Polyalizarin Yellow R Dyes for Enhanced Electrocatalytic Oxidation and Nanomolar Detection of L-Cysteine. *Microchem. J.* **2017**, *131*, 9–14.
- [35] Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Kyle Raker, A.; Walter A. Scrivens. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736–12737.
- [36] Molaei, M. J. A Review on Nanostructured Carbon Quantum Dots and Their Applications in Biotechnology, Sensors, and Chemiluminescence. *Talanta* **2019**, *196*, 456–478.
- [37] Lin, L.; Luo, Y.; Tsai, P.; Wang, J.; Chen, X. Trends in Analytical Chemistry Metal Ions Doped Carbon Quantum Dots: Synthesis , Physicochemical Properties , and Their Applications. **2018**, *103*, 87–101.
- [38] Sun, Z.; Li, X.; Wu, Y.; Wei, C.; Zeng, H. Origin of Green Luminescence in Carbon Quantum Dots: Specific Emission Bands Originate from Oxidized Carbon Groups. *New J. Chem.* **2018**, *42* (6), 4603–4611.

- [39] Asadian, E.; Ghalkhani, M.; Shahrokhian, S. Electrochemical Sensing Based on Carbon Nanoparticles: A Review. *Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, 293 (January), 183–209.
- [40] Lin, J.; Chen, Y.; Chen, G.; Chi, Y.; Dong, Y.; Fu, F. Graphene Quantum Dots, Graphene Oxide, Carbon Quantum Dots and Graphite Nanocrystals in Coals. *Nanoscale* **2014**.
- [41] Chen, Y.; Lian, H.; Wei, Y.; He, X.; Chen, Y.; Wang, B.; Zeng, Q.; Lin, J. Concentration-Induced Multi-Colored Emissions in Carbon Dots: Origination from Triple Fluorescent Centers. *Nanoscale* **2018**, 10 (14), 6734–6743.
- [42] Zhu, J.; Bai, X.; Bai, J.; Pan, G.; Zhu, Y. Emitting Color Tunable Carbon Dots by Adjusting Solvent towards Light-Emitting Devices. *Nanotechnology* **2018**, 29 (8), 085705.
- [43] Chae, A.; Choi, B. R.; Choi, Y.; Jo, S.; Kang, E. B.; Lee, H.; Park, S. Y.; In, I. Mechanochemical Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Cellulose Powders. *Nanotechnology* **2018**, 29 (16).
- [44] Song, J.; Liang, X.; Ma, Q.; An, J.; Feng, F. Fluorescent Boron and Nitrogen Co-Doped Carbon Dots with High Quantum Yield for the Detection of Nimesulide and Fluorescence Staining. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, 216, 296–302.
- [45] D'Angelis Do E. S. Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; De Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. Carbon Dots (C-Dots) from Cow Manure with Impressive Subcellular Selectivity Tuned by Simple Chemical Modification. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21 (13), 5055–5060.
- [46] Tan, C.; Su, X.; Zhou, C.; Wang, B.; Zhan, Q.; He, S. Acid-Assisted Hydrothermal Synthesis of Red Fluorescent Carbon Dots for Sensitive Detection of Fe(III). *RSC Adv.* **2017**, 7 (65), 40952–40956.
- [47] Yang, H.; Liu, Y.; Guo, Z.; Lei, B.; Zhuang, J.; Zhang, X.; Liu, Z.; Hu, C. Hydrophobic Carbon Dots with Blue Dispersed Emission and Red Aggregation-Induced Emission. *Nat. Commun.* **2019**, 10 (1), 1–11.

- [48] Kainth, S.; Maity, B.; Basu, S. Deciphering the Interaction of Solvents with Dual Emissive Carbon Dots: A Photoluminescence Study and Its Response for Different Metal Ions. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *108*, 110443.
- [49] Wang, Y.; Hu, A. Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications. **2014**, 6921–6939.
- [50] Campuzano, S.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Carbon Dots and Graphene Quantum Dots in Electrochemical Biosensing. *Nanomaterials* **2019**, *9* (4), 1–18.
- [51] Kalijadis, A.; DorCevič, J.; Trtić-Petrović, T.; Vukčević, M.; Popović, M.; Maksimović, V.; Rakočević, Z.; Laušević, Z. Preparation of Boron-Doped Hydrothermal Carbon from Glucose for Carbon Paste Electrode. *Carbon N. Y.* **2015**, *95*, 42–50.
- [52] Li, K.; Xu, J.; Arsalan, M.; Cheng, N.; Sheng, Q.; Zheng, J.; Cao, W.; Yue, T. Nitrogen Doped Carbon Dots Derived from Natural Seeds and Their Application for Electrochemical Sensing. *J. Electrochem. Soc.* **2019**, *166* (2), B56–B62.
- [53] Wei, G.; Wang, L.; Huo, L.; Zhang, Y. Economical, Green and Rapid Synthesis of CDs-Cu₂O/CuO Nanotube from the Biomass Waste Reed as Sensitive Sensing Platform for the Electrochemical Detection of Hydrazine. *Talanta* **2020**, *209* (September 2019), 120431.
- [54] Lawal, A. T. Graphene-Based Nano Composites and Their Applications. A Review. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *141* (March), 111384.
- [55] Smith, A. T.; LaChance, A. M.; Zeng, S.; Liu, B.; Sun, L. Synthesis, Properties, and Applications of Graphene Oxide/Reduced Graphene Oxide and Their Nanocomposites. *Nano Mater. Sci.* **2019**, *1* (1), 31–47.
- [56] Phukan, P.; Narzary, R.; Sahu, P. P. A Green Approach to Fast Synthesis of Reduced Graphene Oxide Using Alcohol for Tuning Semiconductor Property. *Mater. Sci. Semicond. Process.* **2019**, *104* (June), 104670.
- [57] Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2010**, *22*

- (10), 1027–1036.
- [58] Vijesh, K. R.; Sebastian, M.; Nampoore, V. P. N.; Thomas, S. Carbon Dots Decorated Graphene Oxide Nanosheets Prepared by a Novel Technique with Enhanced Nonlinear Optical Properties. *AIP Adv.* **2019**, *9* (1).
- [59] Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339.
- [60] Sant'Anna, M. V. S.; Carvalho, S. W. M. M.; Gevaerd, A.; Silva, J. O. S.; Santos, E.; Carregosa, I. S. C.; Wisniewski, A.; Marcolino-Junior, L. H.; Bergamini, M. F.; Sussuchi, E. M. Electrochemical Sensor Based on Biochar and Reduced Graphene Oxide Nanocomposite for Carbendazim Determination. *Talanta* **2020**, *220* (July), 1–8.
- [61] Yu, Q.; Zhao, Y.; Huang, L.; Sun, J.; Jin, D.; Shu, Y.; Xu, Q.; Hu, X. Y. A Flexible RGO Electrode: A New Platform for the Direct Voltammetric Detection of Salicylic Acid. *Anal. Methods* **2020**, *12* (31), 3892–3900.
- [62] Matos, C. R. S.; Souza, H. O.; Santana, T. B. S.; Candido, L. P. M.; Cunha, F. G. C.; Sussuchi, E. M.; Gimenez, I. F. Cd₁-XMg_xTe Semiconductor Nanocrystal Alloys: Synthesis, Preparation of Nanocomposites with Graphene-Based Materials, and Electrochemical Detection of Lidocaine and Epinephrine. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (6), 1755–1764.
- [63] Santana, P. C. A.; Lima, J. B. S.; Santana, T. B. S.; Santos, L. F. S.; Matos, C. R. S.; da Costa, L. P.; Gimenez, I. F.; Sussuchi, E. M. Semiconductor Nanocrystals-Reduced Graphene Composites for the Electrochemical Detection of Carbendazim. *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30* (6), 1302–1308.
- [64] Sahoo, S.; Sahoo, P. K.; Satpati, A. K. Gold Nano Particle and Reduced Graphene Oxide Composite Modified Carbon Paste Electrode for the Ultra Trace Detection of Arsenic (III). *Electroanalysis* **2017**, *29* (5), 1400–1409.
- [65] Guo, Q.; Ghadiri, R.; Weigel, T.; Aumann, A.; Gurevich, E. L.; Esen, C.; Medenbach, O.; Cheng, W.; Chichkov, B.; Ostendorf, A. Comparison of in Situ and Ex Situ Methods for Synthesis of Two-Photon Polymerization Polymer Nanocomposites. *Polymers (Basel)*. **2014**, *6* (7), 2037–2050.

- [66] Niu, W. J.; Zhu, R. H.; Yan-Hua; Zeng, H. B.; Cosnier, S.; Zhang, X. J.; Shan, D. One-Pot Synthesis of Nitrogen-Rich Carbon Dots Decorated Graphene Oxide as Metal-Free Electrocatalyst for Oxygen Reduction Reaction. *Carbon N. Y.* **2016**, *109*, 402–410.
- [67] Lara, M.; Arguelho, P. M.; Andrade, F.; Stradiotto, N. R. Electrochemical Study of Hydroxychloroquine and Its Determination in Plaquenil by Differential Pulse v Oltammetry. **2003**, *32*, 269–275.
- [68] Batista, P.; Campanhã, F.; Gabriel, G.; Rocha-filho, R. C.; Fatibello-filho, O. Square-Wave Voltammetric Determination of Hydroxychloroquine in Pharmaceutical and Synthetic Urine Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **2014**, *719*, 19–23.
- [69] Omid, M.; Fatehinya, A.; Farahani, M.; Akbari, Z.; Shahmoradi, S.; Yazdian, F.; Tahiri, M.; Moharamzadeh, K.; Tayebi, L.; Vashae, D. Characterization of Biomaterials. *Biomater. Oral Dent. Tissue Eng.* **2017**, 97–115.
- [70] Yadav, N.; Lochab, B. A Comparative Study of Graphene Oxide: Hummers, Intermediate and Improved Method. *FlatChem* **2019**, *13* (February), 40–49.
- [71] Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introdução à Espectroscopia*, 4th ed.; Bellingham, Ed.; Learning, Cengage: Washington, 2010.
- [72] Barbosa, L. C. de A. *Espectroscopia No Infravermelho Na Caracterização de Compostos Orgânicos*, 1st ed.; Viçosa, 2007.
- [73] Ikram, R.; Mohamed, B.; Ahmad, W. An Overview of Industrial Scalable Production of Graphene Oxide and Analytical Approaches for Synthesis and Characterization. *Integr. Med. Res.* **2020**, *9* (5), 11587–11610.
- [74] Macairan, J.; Medeiros, T. V. De; Gazzetto, M. Journal of Colloid and Interface Science Elucidating the Mechanism of Dual-Fluorescence in Carbon Dots. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *606*, 67–76.
- [75] Monte-Filho, S. S.; Andrade, S. I. E.; Lima, M. B.; Araujo, M. C. U. Synthesis of Highly Fluorescent Carbon Dots from Lemon and Onion Juices for Determination of Riboflavin in Multivitamin/Mineral Supplements. *J. Pharm.*

Anal. **2019**, 9 (3), 209–216.

- [76] Viana, M. M.; Lima, M. C. F. S.; Forsythe, J. C.; Gangoli, V. S.; Cho, M.; Cheng, Y.; Silva, G. G.; Wong, M. S.; Caliman, V. Facile Graphene Oxide Preparation by Microwave-Assisted Acid Method. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 26 (5), 978–984.
- [77] Mahmudzadeh, M.; Yari, H.; Ramezanzadeh, B.; Mahdavian, M. Highly Potent Radical Scavenging-Anti-Oxidant Activity of Biologically Reduced Graphene Oxide Using Nettle Extract as a Green Bio-Genic Amines-Based Reductants Source Instead of Hazardous Hydrazine Hydrate. *J. Hazard. Mater.* **2019**, 371 (December 2018), 609–624.
- [78] Vaz, R.; Vieira, K. O.; Machado, C. E.; Ferrari, J. L.; Schiavon, M. A. Preparação de Pontos de Carbono e Sua Caracterização Óptica: Um Experimento Para Introduzir Nanociência Na Graduação. *Quim. Nova* **2015**, 38 (10), 1366–1373.
- [79] Mutuyimana, F. P.; Liu, J.; Nsanzamahoro, S.; Na, M.; Chen, H.; Chen, X. Yellow-Emissive Carbon Dots as a Fluorescent Probe for Chromium (VI). **2019**, 2 (Vi).
- [80] Wu, J.; Lin, M.; Cong, X.; Liu, H.; Tan, P.; Lin, M. Raman Spectroscopy of Graphene-Based Materials and Its Applications in Related Devices. **2018**, 1822–1873.
- [81] Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J. W.; Potts, J. R.; Ruoff, R. S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **2010**, 22 (35), 3906–3924.
- [82] Habte, A. T.; Ayele, D. W. Synthesis and Characterization of Reduced Graphene Oxide (RGO) Started from Graphene Oxide (GO) Using the Tour Method with Different Parameters. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2019**, 2019 (Vc).
- [83] Faria, G. S.; Lima, A. M.; Brandão, L. P.; da Costa, A. P.; Nardecchia, S.; Ribeiro, A. A.; Pinheiro, W. A.; Karimi, L.; Yazdanshenas, M. E.; Khajavi, R.; et al. Production and Characterization of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide with Different Oxidation Times. *J. Text. Inst.* **2017**, 22 (9), 1122–1134.

- [84] Bui, T. A. N.; Nguyen, T. G.; Darmanto, W.; Doong, R. A. 3-Dimensional Ordered Reduced Graphene Oxide Embedded with N-Doped Graphene Quantum Dots for High Performance Supercapacitors. *Electrochim. Acta* **2020**, *361*, 1–10.
- [85] Ott, E. J. E.; Kucinski, T. M.; Dawson, J. N.; Freedman, M. A. Use of Transmission Electron Microscopy for Analysis of Aerosol Particles and Strategies for Imaging Fragile Particles. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (33), 11347–11356.
- [86] Silva, J. D. O. S.; Lima, J. B. S.; De Carvalho, S. W. M. M.; Sant'Anna, M. V. S.; Júnior, J. C. S.; Farias, R. R.; Victor, M. M.; Sussuchi, E. M. Electrode Modified with 1,3-Bis(4-Butyl-1H-1,2,3-Triazol-1-Yl)Propan-2-Ol for Electrochemical Determination of Cu(II) Ions in Cabbage Cultivated with Bordeaux Syrup. *Brazilian J. Anal. Chem.* **2019**, *6* (22), 67–79.
- [87] Khoobi, A.; Mehdi, S.; Behpour, M.; Shaterian, M. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Design and Evaluation of a Highly Sensitive Nanostructure-Based Surface Modification of Glassy Carbon Electrode for Electrochemical Studies of Hydroxychloroquine in the Presence of Acetaminophen. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 648–656.
- [88] Barton, S. S.; Evans, M. J. B.; Halliop, E.; MacDonald, J. A. F. Acidic and Basic Sites on the Surface of Porous Carbon. *Carbon N. Y.* **1997**, *35* (9), 1361–1366.
- [89] Santos, W. T. P.; Amin, H. M. A.; Compton, R. G. A Nano-Carbon Electrode Optimized for Adsorptive Stripping Voltammetry: Application to Detection of the Stimulant Selegiline in Authentic Saliva. *Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, *279* (September 2018), 433–439.
- [90] Analíticos, M. *Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos.*; INMETRO, 2020; p 30.
- [91] Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed.; Pearson: Harlow, 2005.
- [92] Alkahtani, S. A.; Mahmoud, A. M.; Mahnashi, M. H.; AlQarni, A. O.; Alqahtani, Y. S. A.; El-Wakil, M. M. Facile One Pot Sonochemical Synthesis of Layered Nanostructure of ZnS NPs/RGO Nanosheets for Simultaneous Analysis of

- Daclatasvir and Hydroxychloroquine. *Microchem. J.* **2021**, *164* (January).
- [93] Deroco, P. B.; Vicentini, F. C.; Oliveira, G. G.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. Square-Wave Voltammetric Determination of Hydroxychloroquine in Pharmaceutical and Synthetic Urine Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *719*, 19–23.
- [94] Khalil, M. M.; El-aziz, G. M. A.; Ashry, A. Potentiometric Sensors Based on Hydroxychloroquine-Phosphotungstate Ion-Pair and β -Cyclodextrin Ionophore for Improved Determination of Hydroxychloroquine Sulfate. *J. Iran. Chem. Soc.* **2018**, *15* (10), 2411–2421.
- [95] Mater Mahnashi, H.; Mahmoud, A. M.; Saad Alkahtani, A.; El-Wakil, M. M. Simultaneous Electrochemical Detection of Azithromycin and Hydroxychloroquine Based on VS₂ QDs Embedded N, S @graphene Aerogel/CCNTs 3D Nanostructure. *Microchem. J.* **2021**, *163* (January), 105925.
- [96] Rath, S.; Martínez-Mejía, M. J.; Schröder, C. H. K. *Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos Em Produtos Para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários*, 1^a.; Maurício, A. de Q., Ed.; Brasília, 2011.
- [97] AOAC. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *J. AOAC Int. Off. Method Anal.* **2016**, *9*.