



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



THAYLOR TEIXEIRA CONRADO

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA E ESTUDO DA REDUÇÃO
ELETROQUÍMICA DO RODENTICIDA BROMADIOLONA USANDO ELETRODO
DE GRAFITE DESCARTÁVEL**

Campo Grande – MS

2023

THAYLOR TEIXEIRA CONRADO

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA E ESTUDO DA REDUÇÃO
ELETROQUÍMICA DO RODENTICIDA BROMADIOLONA USANDO ELETRODO
DE GRAFITE DESCARTÁVEL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca

Campo Grande – MS

2023



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO

Aos dezenove dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Bruno Gabriel Lucca (UFMS), Jacqueline Marques Petroni (UFMS) e Rodrigo Amorim Bezerra da Silva (UFU), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: THAYLOR TEIXEIRA CONRADO, CPF 03723008127, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA E ESTUDO DA REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO RODENTICIDA BROMADIOLONA USANDO ELETRODO DE GRAFITE DESCARTÁVEL" e orientação de Bruno Gabriel Lucca. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

| EXAMINADOR | AVALIAÇÃO |
|--|------------------|
| Dr. Bruno Gabriel Lucca (Interno) | Aprovado |
| Dr. Fabio Gozzi (Externo) (Suplente) | - |
| Dra. Jacqueline Marques Petroni (Externo) | Aprovado |
| Dr. Leandro Moreira de Campos Pinto (Interno) (Suplente) | - |
| Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva (Externo) | Aprovado |



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gabriel Lucca, Professor do Magisterio Superior**, em 19/01/2023, às 10:45, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Amorim Bezerra da Silva, Usuário Externo**, em 20/01/2023, às 09:10, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaylor Teixeira Conrado, Usuário Externo**, em 20/01/2023, às 15:33, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Marques Petroni, Usuário Externo**, em 20/01/2023, às 15:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3779202** e o código CRC **9B2AF6E9**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo incentivo ao longo de todo o mestrado. Esta dissertação é a prova de que todo seu investimento e dedicação valeram a pena. Agradeço também aos meus irmãos que sempre se fizeram presentes me ajudando no decorrer desta caminhada.

Agradeço ainda, minha amiga Lethicia Menacho por estar sempre presente nas conquistas de minha vida.

Agradeço aos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelos ensinamentos.

Agradeço aos integrantes do Grupo de Eletroanalítica, Eletroforese e Microsistemas - GEEMS, pela amizade.

Agradeço aos professores Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva e Dra. Jacqueline Marques Petroni pela participação na banca avaliadora, e pelas contribuições para o trabalho.

Por fim, meus agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Bruno Gabriel Lucca, pela dedicação e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado a todos, sem vocês não seria possível a realização deste sonho.

RESUMO

Rodenticidas são agentes químicos destinados ao extermínio de roedores. A bromadiolona é um rodenticida anticoagulante que atua como um antagonista da vitamina K. Intoxicações por bromadiolona são relatadas na literatura e também pelas forças policiais, seja de maneira acidental ou intencional (tentativas de suicídio ou envenenamento intencional). Assim, é necessária a utilização de métodos rápidos e eficientes para o monitoramento da bromadiolona, tanto em amostras comerciais, como em amostras forenses. Uma ampla gama de métodos analíticos tem sido usada para essa finalidade, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a mais comumente utilizada. Porém, apesar de eficientes, estes métodos apresentam algumas desvantagens, como longo tempo de preparo de amostra e alto custo de instrumentação. Como alternativa, os métodos eletroanalíticos vêm ganhando espaço devido à vantagens como operação mais simples, possibilidade de miniaturização, alta sensibilidade, custo relativamente baixo e limites de detecção comparáveis aos encontrados em técnicas cromatográficas. O presente trabalho apresenta uma metodologia analítica de baixo custo para a determinação de bromadiolona em amostras comerciais e forenses, utilizando pela primeira vez sua redução eletroquímica e eletrodos de grafite de lapiseira. Para tal finalidade, a voltametria de onda quadrada (VOQ) foi utilizada. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) alcançados foram de 0,50 e 1,65 nM, respectivamente. Uma curva analítica foi construída na faixa de concentração de 1,65 a 100 nM, obtendo-se um coeficiente de correlação (R) de 0,991. A metodologia proposta foi empregada de forma qualitativa em amostra forense de chocolate em pó e de forma quantitativa em amostras comerciais, onde as recuperações encontradas foram de 73 e 79%. Também foram realizados ensaios de recuperação com padrão de bromadiolona, em duas concentrações diferentes, sendo obtidas recuperações entre 93 e 98%. Desta forma, a metodologia proposta para a determinação de bromadiolona demonstrou eficiência para aplicações em controle de qualidade e para análises forenses.

Palavras-chave: Análise forense; Eletrodos de carbono; Hidroxicumarínico; Rodenticida anticoagulante; Voltametria.

ABSTRACT

Rodenticides are chemical agents intended for the extermination of rodents. Bromadiolone is an anticoagulant rodenticide that acts as a vitamin K antagonist. Bromadiolone poisoning has been reported in the literature and also by police forces, either accidentally or intentionally (suicide attempts or intentional poisoning). Thus, it is necessary to use fast and efficient methods for monitoring bromadiolone, both in commercial and forensic samples. A wide range of analytical methods have been used for this purpose, with high performance liquid chromatography (HPLC) being the most commonly used. However, although efficient, these methods have some disadvantages, such as long sample preparation times and high instrumentation costs. As an alternative, electroanalytical methods have been gaining space due to advantages such as simpler operation, possibility of miniaturization, high sensitivity, relatively low cost and detection limits comparable to those found in chromatographic techniques. The present work presents a low-cost analytical methodology for the determination of bromadiolone, in commercial and forensic samples, using for the first time its electrochemical reduction and mechanical pencil graphite electrodes. For this purpose, square wave voltammetry (SWV) was used. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.5 and 1.65 nM, respectively. An analytical curve was built in the concentration range from 1.65 to 100 nM, obtaining a correlation coefficient (R) of 0.991. The proposed methodology was used qualitatively in forensic sample of powdered chocolate and quantitatively in commercial samples, where the recoveries found were 72 and 78 %. Recovery tests were also performed with bromadiolone standard, in two different concentrations, obtaining recoveries between 93 and 98 %. Thus, the proposed methodology for the determination of bromadiolone demonstrated efficiency for applications in quality control and forensic analysis.

Keywords: Anticoagulant rodenticide; Carbon electrodes; Forensic analysis; Hidroxicumarin; Voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura química da bromadiolona. Fonte: [15] | 18 |
| Figura 2. Classificação dos métodos eletroanalíticos. Figura adaptada da referência [46]..... | 24 |
| Figura 3. Tipos de transporte de massa das espécies eletroativas para o eletrodo de trabalho em solução. Fonte: [46]. | 25 |
| Figura 4. Aplicação de potencial em voltametria cíclica. Figura adaptada da referência [48]. | 27 |
| Figura 5. Voltamograma cíclico hipotético, que é um gráfico que expressa a corrente obtida em função do potencial aplicado. | 27 |
| Figura 6. Etapas envolvidas no processo de oxidação ou redução de uma espécie sobre a superfície de um eletrodo. Figura adaptada da referência [35]. | 28 |
| Figura 7. Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível. Fonte: [48] | 29 |
| Figura 8. Voltamogramas cíclicos para processos reversíveis (A), quase-reversíveis (B) e irreversíveis (C). Figura adaptada da referência [48]..... | 31 |
| Figura 9. resumo dos diagnósticos para verificar se um processo eletroquímico é reversível, quase-irreversível ou irreversível. Fonte: [49]. | 31 |
| Figura 10. (A) Forma de aplicação do potencial e medição da corrente em VPD; (B) voltamograma típico da VPD. Fonte: [35] | 32 |
| Figura 11. Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso. Fonte: [35]..... | 33 |
| Figura 12. (A) Forma de aplicação de potencial e medição da corrente em VOQ; (B) voltamograma esquemático de um processo redox de um sistema reversível; (C) voltamograma esquemático de um processo redox de um sistema irreversível. Fonte [49]. | 34 |
| Figura 13. (A) Célula eletroquímica de vidro utilizada. (B) Tampa impressa em 3D; | 39 |
| Figura 14. Esquema do procedimento de preparo da amostra de chocolate em pó..... | 40 |
| Figura 15. Esquema do preparo das amostras comerciais de bromadiolona..... | 41 |
| Figura 16. Voltamograma cíclico da bromadiolona 10 µM. Curva preta: voltamograma cíclico na ausência de bromadiolona. Curva vermelha: voltamograma cíclico na presença de bromadiolona. Parâmetros: eletrólito: solução tampão BR 0,1 M, pH 4,0. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ | 42 |
| Figura 17. Influência da concentração da solução tampão BR na corrente de pico da redução da bromadiolona (10 µM). Parâmetros: eletrólito: solução tampão BR, pH 4,0. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Avaliação do pH na redução da bromadiolona 10 μM . (A) voltamograma cíclico da redução de bromadiolona em diferentes pH. Parâmetros: eletrólito: solução tampão BR 0,05 M, em diferentes pH; Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . (B) corrente de pico catódico em função do pH (n = 3 medidas); | 44 |
| Figura 19. Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura, variando de 10 mV s^{-1} a 250 mV s^{-1} . Parâmetros: eletrólito: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; Concentração de bromadiolona 250 μM | 45 |
| Figura 20. Gráfico da corrente de pico catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (n = 3 medidas)..... | 46 |
| Figura 21. Gráfico do logaritmo da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (n = 3 medidas)..... | 47 |
| Figura 22. Gráfico do potencial de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (n = 3 medidas). | 48 |
| Figura 23. Voltamograma de pulso diferencial e voltamograma de onda quadrada na presença de bromadiolona 10 μM . Parâmetros VPD: step potential = 0,004 V; amplitude = 0,03 V; modulation time = 0,05 s; intervalo de tempo = 0,080 s; Parâmetros VOQ: step potential = 0,004 V; amplitude = 0,03 V; frequência = 12,50 Hz; | 49 |
| Figura 24. (A) voltamograma de onda quadrada da frequência variando de 10 Hz à 60 Hz. (B) correntes de pico em função da frequência (n = 3 medidas). Parâmetros utilizados: Solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; amplitude = 0,03 V; step Potential: 0,004 V. | 50 |
| Figura 25. (A) voltamograma de onda quadrada do incremento de potencial variando de 1 mV à 9 mV; (B) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do step potential (n = 3 medidas). Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; frequência = 10 Hz; amplitude: 60 mV. | 51 |
| Figura 26. (A) voltamograma de onda quadrada da amplitude variando de 10 mV à 70 mV; (B) corrente de pico da redução da bromadiolona em função da amplitude (n = 3 medidas). Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; frequência = 10 Hz; step potential: 0,004 V..... | 51 |
| Figura 27. (A) voltamograma de onda quadrada do potencial de deposição variando de 0,0 V à -0,35 V; (b) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do potencial de deposição (n = 3 medidas). Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,008 V; tempo de deposição = 30 s..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 28. (A) voltamograma de onda quadrada do tempo de deposição variando de 10 s à 60 s; (B) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do potencial de deposição (n = 3 medidas). Parâmetros utilizados: Solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 µM; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,008 V; Potencial de deposição = -0,35 V..... | 53 |
| Figura 29. Voltamograma de onda quadrada da redução da bromadiolona (10 µM) antes da otimização dos parâmetros instrumentais (curva preta) e após otimização dos parâmetros instrumentais (curva vermelha). Parâmetros antes da otimização: step potential = 0,004 V; amplitude = 0,03 V; frequência = 12,50 Hz; Parâmetros após a otimização: ver Tabela 1. | 54 |
| Figura 30. Voltamograma de onda quadrada do estudo da repetibilidade (n = 10 medidas). Concentração de bromadiolona: 10 µM; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5..... | 55 |
| Figura 31. Voltamograma de onda quadrada do estudo da reprodutibilidade. Concentração de bromadiolona: 10 µM; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5..... | 56 |
| Figura 32. Estudo da estabilidade. Concentração de bromadiolona: 10 µM; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5..... | 57 |
| Figura 33. Estudo do limite de detecção experimental. Eletrólito: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5. | 58 |
| Figura 34. (A) voltamograma de onda quadrada obtido para a curva de calibração. (B) Curva de calibração construída com padrões de bromadiolona nas concentrações variando de 1,65 nM à 100 nM. (R = 0,991); | 59 |
| Figura 35. Determinação qualitativa de bromadiolona em chocolate obtido da polícia civil do Mato Grosso do Sul. Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = -0,35 V; tempo de deposição = 60 s..... | 60 |
| Figura 36. Comparação do sinal eletroquímico obtido para o chocolate contaminado e os padrões de bromadiolona. Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = -0,35 V; tempo de deposição = 60 s..... | 61 |
| Figura 37. Determinação quantitativa de bromadiolona em amostras comerciais. Parâmetros utilizados: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = -0,35 V; tempo de deposição = 60 s. | 62 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| 3D | Tridimensional |
| ABS | Acetonitrila butadieno estireno |
| BR | Britton-Robinson |
| CCF | Cromatografia de camada fina |
| CG-MS | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CLAE-DE | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção eletroquímica |
| DMF | Dimetilformamida |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| FIA | Flow injection analysis (Análise por injeção em fluxo) |
| LD | Limite de detecção |
| LD ₅₀ | Dose letal média |
| LQ | Limite de quantificação |
| PGEs | Pencil graphite electrodes (Eletrodo de grafite de lapiseira) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| Rpm | Rotações por minuto |
| VC | Voltametria cíclica |
| VOQ | Voltametria de onda quadrada |
| VPD | Voltametria de pulso diferencial |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1. | Controle de roedores | 15 |
| 1.1.1. | Métodos mecânicos | 16 |
| 1.1.2. | Métodos biológicos | 17 |
| 1.1.3. | Métodos químicos | 17 |
| 1.2. | Bromadiolona | 18 |
| 2. | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 21 |
| 2.1. | Eletroquímica | 21 |
| 2.1.1. | Voltametria cíclica | 26 |
| 2.1.2. | Voltametria de pulso diferencial | 31 |
| 2.1.3. | Voltametria de onda quadrada..... | 33 |
| 2.2. | Eletrodos de carbono | 34 |
| 3. | OBJETIVOS..... | 37 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.1. | Materiais e reagentes | 38 |
| 4.2. | Experimentos voltamétricos | 38 |
| 4.3. | Preparo e análise das amostras reais..... | 40 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1. | Comportamento eletroquímico da bromadiolona e estudo de pH..... | 42 |
| 5.2. | Estudo da velocidade de varredura..... | 44 |
| 5.3. | Otimização dos parâmetros instrumentais..... | 49 |
| 5.4. | Reprodutibilidade, repetibilidade e estabilidade | 54 |
| 5.5. | Parâmetros analíticos e curva de calibração..... | 57 |
| 5.6. | Avaliação da eficácia do preparo de amostra | 59 |
| 5.7. | Análises em amostras reais..... | 60 |

| | | |
|--------|----------------------------------|----|
| 5.7.1. | Determinação qualitativa..... | 60 |
| 5.7.2. | Determinação quantitativa..... | 61 |
| 6. | CONCLUSÃO..... | 64 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

1. INTRODUÇÃO

Os roedores constituem a mais numerosa ordem dos mamíferos, o que corresponde a mais de 40 % dos mamíferos. A maior parte são de pequenas proporções, como o camundongo-pigmeu-africano [1]. Por outro lado, apresenta animais maiores como as capivaras, que podem pesar até 80 kg [2].

Ecologicamente são muito diversos, e algumas espécies passam a maior parte da vida nas florestas ou embaixo da terra. Muitas são em certa medida onívoras, assim como outras têm uma dieta bem específica, comendo, por exemplo, algumas espécies de fungos ou invertebrados. Como exemplos deste grupo temos os ratos, os camundongos, as capivaras (o maior roedor do mundo), os porquinhos-da-índia, os esquilos, as marmotas e os castores. Estes animais servem de alimento para muitas aves, répteis e mamíferos carnívoros [1–3].

Rato é uma designação comum para diversos pequenos mamíferos pertencentes à ordem dos roedores. Caracterizam-se por possuir focinho pontudo, orelhas pequenas e arredondadas, e uma longa cauda nua ou quase sem pelos. As espécies mais conhecidas de rato são o *Mus musculus*[4], um típico rato doméstico, *Rattus rattus* [5] e *Rattus norvegicus* [6], por vezes chamados de ratazanas e que habitam esgotos e córregos. Os ratos também são animais de estimação. Já em ambiente silvestre, a espécie mais comum é o rato-do-campo ou rato do mato, espécie importante para a cadeia alimentar, pois são alimentos de grandes aves como falcões e águias. [1–6].

Os ratos em alguns contextos são considerados pragas, quando danificam e destroem plantações e silos de armazenamento de grãos, onde também causam danos estruturais danificando fiações, estruturas, além de ser um vetor para diversas doenças, na maioria das vezes transmitidas pelas suas fezes, urina ou pelo, e causam diversas doenças como a peste bubônica, salmonelose, tifo e leptospirose [7–10].

A infestação de ratos num local pode ser verificada através da observação dos seguintes sinais [9,10]:

- Fezes: sua presença é um dos maiores indicadores de infestação. As fezes podem levar à identificação da espécie presente;
- Trilhas: sua aparência é de um caminho bem batido, com 5 a 8 cm de largura, sendo encontradas geralmente nas proximidades de muros, junto às paredes, atrás de materiais empilhados, sob tábuas e em áreas de gramados;

- Roeduras: os ratos roem (mas não ingerem) principalmente materiais como madeira, cabos de fiação elétrica e embalagens de alimentos para gastar sua dentição e como forma de transpor barreiras para alcançar os alimentos;
- Tocas: são encontradas junto ao solo, junto aos muros, entre plantas e normalmente indica infestação por ratazanas;

A prevenção é possível por meio das seguintes ações [9,10]:

- Acondicionamento correto do lixo: dentro de sacos plásticos, em latas com tampas apropriadamente fechadas e limpas periodicamente, de preferência sobre estrado, para que não fiquem diretamente em contato com o solo;
- Dispor o lixo na rua somente na hora que o coletor passa para recolher;
- Nunca jogar lixo a céu aberto ou em terrenos baldios;
- Acondicionamento correto dos alimentos: em recipientes bem fechados;
- Inspeccionar periodicamente e cuidadosamente caixas de papelão, caixotes, atrás de armários, gavetas e todo tipo de material que adentre ao ambiente e possa estar servindo de transporte ou abrigo a camundongos;
- Vedar frestas ou vãos que possam servir de porta de entrada aos ratos para os ambientes internos;
- Colocar telas, ralos do tipo "abre-fecha", sacos de areia ou outros artifícios que impeçam a entrada desses animais através de ralos, encanamentos ou outros orifícios;
- Evitar o acúmulo de entulho ou materiais inservíveis que possam constituir abrigo aos ratos;
- Manter terrenos baldios limpos e murados;
- Manter limpas as instalações de animais domésticos e não deixar a alimentação destes exposta onde os ratos possam ter acesso, principalmente à noite;
- Vistoriar e manter limpos garagens e sótãos.

1.1. Controle de roedores

O combate aos roedores deve ser feito através de um conjunto de métodos que compreende não só a eliminação física dos roedores infestantes, mas também a modificação do meio ambiente, de forma a torná-lo mais impróprio à livre proliferação desses animais. De fato,

quanto mais limpo e organizado for o ambiente, menor será a probabilidade dos roedores ali se instalarem. Porém o combate principal ainda se concentra nos métodos de eliminação dos roedores infestantes e, didaticamente, podemos dividi-los em dois grandes grupos: antirratização e desratização com as formas mecânica ou física, biológica e química (raticidas) [9,10].

➤ **Antirratização**

É o conjunto de medidas que visam modificar as características ambientais que favorecem a penetração, instalação e a livre proliferação de roedores. Basicamente compreende a eliminação dos meios que propiciem aos roedores o acesso ao alimento, abrigo e água. Compreendem também ações de educação em saúde, através de informação, orientação e esclarecimento às pessoas ligadas diretamente ao problema, escolares e população em geral. Para se viabilizarem as medidas de antirratização, é necessário agilizar os serviços de coleta de lixo, aprimorar a utilização de aterros sanitários, aperfeiçoar a legislação sanitária e promover o envolvimento e participação da comunidade [9,10].

➤ **Desratização**

A desratização compreende todas as medidas empregadas para a eliminação dos roedores infestados, através de métodos mecânicos (ratoeiras), biológicos (gatos e outros animais predadores) e químicos (raticida). Essas ações de combate deverão ser acompanhadas de medidas de saneamento e controle ambiental (antirratização). Para maior eficiência, a desratização deve ser realizada paralelamente aos trabalhos de limpeza e saneamento, a fim de se evitar a disseminação da população de roedores [9,10].

1.1.1. Métodos mecânicos

São empregados principalmente para camundongos, pois, devido a sua curiosidade vão investigar todo e qualquer objeto novo colocado em seu território. São utilizados também em situações onde não é recomendado o uso de raticida, quando se deseja capturar roedores vivos, ou quando há poucos roedores a combater [9,10].

1.1.2. Métodos biológicos

Em área rural, os animais predadores tais como algumas aves, carnívoros e ofídios, exercem certa atuação no controle de pequenos roedores. Em áreas urbanas, os animais domésticos como o gato e o cão quase não influem no combate, sendo comum encontrar ratos vivendo de restos de alimentos desses animais, enquanto o cão ou o gato dormem [9,10].

1.1.3. Métodos químicos

Raticidas (rodenticidas) são produtos químicos, desenvolvidos e preparados para causar a morte de roedores. Estes produtos recebem algumas classificações [9,10]:

❖ **Quanto à rapidez do efeito, os raticidas podem ser classificados em:**

1. **Agudos:** causam a morte do roedor desde alguns segundos até horas após sua ingestão;
2. **Crônicos:** provocam a morte do roedor alguns dias após a ingestão. São anticoagulantes, interferindo no processo de coagulação sanguínea, provocando a morte por hemorragia.

❖ **Quanto ao número de doses, os raticidas anticoagulantes se classificam em:**

1. **Dose múltipla ou de 1ª geração:** São aqueles com baixa toxicidade, apresentando efeito cumulativo no organismo, isto é, necessitam ser ingeridos mais de uma vez, para que os sintomas de envenenamento apareçam.
2. **Dose única ou de 2ª geração:** São os que com a ingestão de apenas uma dose, causam a morte do roedor entre 3 a 10 dias de sua ingestão. Surgiram após o aparecimento dos casos de resistência aos raticidas de dose múltipla, sendo eles bromadiolona e brodifacoum.

❖ **Quanto às formas de apresentação podem ser classificados em:**

1. **Iscas peletizadas ou granuladas:** preparadas com alimentos ou cereais atrativos e palatáveis aos roedores;

2. **Pó:** raticida formulado com pó finíssimo, para ser empregado nas trilhas e ninhos. O pó adere aos pelos do roedor que lambe o corpo ao realizar sua higiene, ingerindo, assim, o raticida.

1.2. Bromadiolona

Os rodenticidas são pesticidas utilizados para exterminar roedores, e podem ser classificados como anticoagulantes e não anticoagulantes [11,12]. A segunda geração de rodenticidas chamados de supervarfarinas tem o mais amplo espectro de uso. De acordo com sua estrutura química, eles pertencem às hidroxycumarinas e seus derivados. Eles podem ser absorvidos por um organismo através do sistema digestivo e respiratório, eventualmente através da pele. Após a ingestão dessas substâncias, o fígado é o principal órgão envolvido em seu metabolismo [13].

A bromadiolona (**Figura 1**) (3-(3-(4'-bromo-1-1'-bifenil-4-il)-3-idroxi-1-fenilpropil)-4-hidroxycumarina) pertence ao grupo das supervarfarinas e é um rodenticida anticoagulante [14].

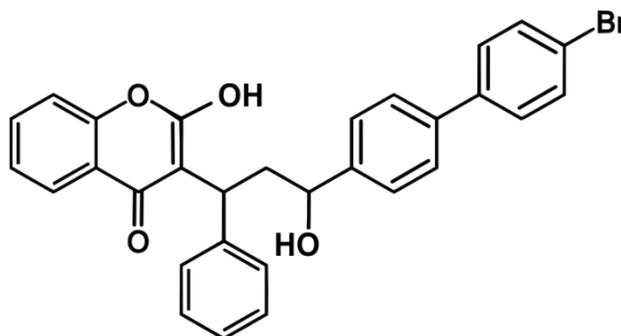


Figura 1. Estrutura química da bromadiolona. Fonte: [15]

A bromadiolona atua como um antagonista da vitamina K1 (fitomenadion). Este rodenticida inibe a produção dos fatores II, VII, IX e X no fígado. Isso resulta no prolongamento das vias de coagulação extrínsecas, intrínsecas e comuns, levando à coagulopatia [16].

Como consequência da ingestão de bromadiolona, foi observada a morte de animais domésticos e/ou de animais não-alvo. Concentrações subletais de bromadiolona foram

encontradas em fígados de animais que consomem roedores como raposas, urubus e doninhas, refletindo assim seu transporte através da cadeia alimentar [17–19].

A bromadiolona apresenta uma alta estabilidade, portanto pode persistir no meio ambiente (em particular no solo); se bioacumula em organismos e pode ser encontrada em grânulos para aplicação, e se desintegram rapidamente nos campos de aplicação. Portanto, há o risco de intoxicações primárias e secundárias de organismos não-alvo, porque as substâncias transportadoras de grânulos podem atrair minhocas [20].

Na literatura são encontrados diversos efeitos adversos do uso inadequado de bromadiolona sendo os principais assuntos: intoxicações, sejam de forma acidental [21,22] ou de forma intencional [23,24]; Intoxicações de animais domésticos [25]; e o uso ilegal [26] os mais comentados.

As preparações comerciais de bromadiolona, geralmente utilizam a concentração de 0,005% p/p. É importante se ter metodologias para determinação e quantificação de bromadiolona, para diagnósticos rápidos em caso de intoxicações, e também porque existem muitos outros raticidas que são proibidos no Brasil e no mundo, mas que são confundidos com bromadiolona, como é o caso do raticida Mão Branca ® [27].

Grande atenção tem sido dada à vigilância de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente. O monitoramento da ação da bromadiolona e sua distribuição no meio ambiente requerem métodos analíticos rápidos, de baixo custo e fáceis de usar para a detecção deste composto. Uma ampla gama de métodos analíticos tem sido usada para esses fins, por exemplo, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), cromatografia de camada fina (CCF) ou métodos imunológicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método mais comumente usados para a determinação de bromadiolona [15–20].

O uso da CLAE juntamente com detectores de fluorescência, massa e UV-Vis foi relatado [15–20]. Cada método tem suas vantagens e limitações e pode atender a uma necessidade específica de análise. As técnicas cromatográficas apresentam as vantagens como versatilidade, alta resolução, automação, e algumas desvantagens como instrumentação de alto custo e alto custo de operação [15–20].

Alternativamente, a detecção eletroquímica oferece um método atraente para a detecção de espécies eletroativas por causa de suas vantagens inerentes de simplicidade, alta sensibilidade, custo relativamente baixo e potencial para miniaturização com limites de detecção comparáveis a outras técnicas analíticas modernas [15–20].

Em 2007, Beklova e colaboradores [15] publicaram um trabalho onde determinaram bromadiolona em tecidos de faisões e raposas, com a finalidade de verificar a presença de bromadiolona ao longo da cadeia alimentar. Para isso, desenvolveram uma metodologia eletroanalítica utilizando uma célula convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de pasta de carbono, eletrodo de referência um eletrodo de prata/cloreto de prata e eletrodo auxiliar sendo um eletrodo de grafite. O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão acetato 0,2 M (pH 4,2) e para solubilizar as amostras utilizou-se metanol. Os autores utilizaram a voltametria cíclica para verificar a eletroatividade da bromadiolona, e constataram que esta apresentou um pico de oxidação a 840 mV. Para realizar a determinação da bromadiolona foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial, onde nesta técnica a bromadiolona apresentou um sinal em 730 mV. O método proposto neste trabalho obteve um limite de detecção de 0,5 ng/mL (0,948 nM). Estes autores concluíram que a bromadiolona é encontrada ao longo da cadeia alimentar, indicando que a biotransformação em animais ocorre lentamente.

Ainda em 2007, Krizkova e colaboradores [20] publicaram um trabalho onde mostraram a possibilidade de intoxicação de animais silvestres não-alvo da bromadiolona, neste caso foram utilizadas minhocas. Para isso, desenvolveram uma metodologia analítica onde utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção eletroquímica (CLAE-DE). Para as medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de pasta de carbono, eletrodo de referência um eletrodo de prata/cloreto de prata e eletrodo auxiliar sendo um eletrodo de carbono vítreo. O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão acetato 0,2 M (pH 4,0). Para solubilizar as amostras utilizou-se metanol. Os autores utilizaram a voltametria cíclica para verificar a eletroatividade da bromadiolona e constataram que esta apresentou um pico de oxidação a 836 mV. Neste trabalho, os autores determinaram o limite de detecção utilizando a voltametria cíclica, e o valor encontrado foi de 5 ng/mL (9,48 nM). Os autores propuseram uma metodologia de determinação de fluxo (FIA) para tornar a análise mais rápida e adequada para a rotina. Sob condições experimentais otimizadas usando FIA (potencial de trabalho 840 mV, eletrólito solução tampão acetato 0,2 M (pH 4,0), taxa de fluxo 0,8 mL/min), os autores concluíram que a bromadiolona foi encontrada nos organismos das minhocas, indicando que há riscos de intoxicações secundárias.

Apesar de existir estes trabalhos na literatura, nenhum trabalho se propôs a desenvolver uma metodologia que possa ser focada em amostras diversas, como por exemplo amostras

forenses ou amostras comerciais. Ambos os trabalhos utilizaram tecidos animais para determinação de bromadiolona.

Além disso, apesar das vantagens das técnicas eletroquímicas, na literatura ainda são encontrados poucos trabalhos que utilizaram estas técnicas como método de análise de bromadiolona [15,20]. Tal fato demonstra que esta é uma área muito pouco explorada e que ainda demanda estudos, visto que detecções de bromadiolona precisam ser rápidas e de preferência que possam ser realizadas em campo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Eletroquímica

A eletroquímica é uma área da Química que tem como objetivo estudar os fenômenos físico-químicos que ocorrem em razão do ganho e da perda de elétrons [28].

A oxidação representa a perda de elétrons em uma reação química, e a redução é o ganho de elétrons. Assim, as reações de oxirredução (redox) ocorrem quando elétrons são transferidos de uma espécie que é oxidada a uma espécie que é reduzida. [29]. As reações redox podem ocorrer em substâncias orgânicas e inorgânicas e nos estados físicos sólido, líquido e gasoso [30].

Várias são as aplicações das reações de oxirredução, dentre elas funcionamento de baterias e também em uma ampla variedade de processos naturais importantes, como a oxidação do ferro, o escurecimento de alimentos e a respiração dos animais [29].

A história da eletroquímica nos remete a meados de 1780, onde Luigi Galvani ganhava destaque. Galvani, um médico cuja área de pesquisa estava na chamada eletricidade animal, acreditava na existência de uma eletricidade própria dos corpos animais. Enquanto trabalhava com uma rã dessecada, verificou que ao tocar a perna de uma rã com um bisturi, houve a contração dos músculos do animal morto. Mais tarde, em 1800, Alessandro Volta, intrigado com os resultados obtidos por Galvani, conseguiu explicar melhor o fenômeno observado por Galvani. Volta afirmou que o tecido da perna da rã permitia a passagem de eletricidade (condutor elétrico), e concluiu que a eletricidade se originava do contato entre metais diferentes, e a rã apenas reagia a essa eletricidade externa [31,32].

A partir das descobertas de Galvani e Volta, diversos outros pesquisadores fizeram contribuições para a área da eletroquímica, como é o caso de Michael Faraday, que definiu os

conceitos de ânodo, cátodo, eletrodo, eletrólito, íon e toda a relação entre a corrente elétrica gerada durante uma eletrólise [31].

A eletrólise é um processo de oxirredução, não espontâneo, que forma compostos químicos a partir de uma substância, utilizando, para isso, a eletricidade. A sua ocorrência depende de uma fonte externa, como uma bateria ou a rede elétrica para fornecer corrente elétrica contínua [28].

Em outras palavras, os processos redox (eletrólise) que ocorrem na interface eletrodo-solução são resultantes do processo de redução e/ou oxidação, onde a corrente medida do processo de transferência de carga, a um potencial controlado, é proporcional à concentração da espécie eletroativa. Os processos eletroquímicos requerem pelo menos dois eletrodos condutores e um eletrólito para constituir a chamada célula eletroquímica. As transferências eletrônicas que ocorrem na interface eletrodo-solução movem-se entre o eletrodo e um eletrólito [33,34].

O eletrodo onde ocorrem as reações de oxirredução é chamado de eletrodo de trabalho. Podem ser utilizados na fabricação de um eletrodo de trabalho materiais como ouro, platina, carbono, dentre outros. O contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar atua em fechar o circuito elétrico e diminuir a queda ôhmica causada pela resistência da célula eletroquímica no controle do potencial do eletrodo de trabalho. Uma célula eletroquímica eletrolítica consome eletricidade de uma fonte externa [35].

O eletrodo de referência possui potencial constante (isto é, independe das propriedades da solução), tendo a função de controlar o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Podem ser utilizados, como eletrodos de referência, eletrodo-padrão de hidrogênio, eletrodo de calomelano saturado e eletrodo de prata/cloreto de prata[35,36].

Há também os eletrodos de pseudo-referência, que possuem a mesma função dos eletrodos de referência convencionais, porém não atingem o mesmo objetivo de controlar o potencial e deixá-lo constante, pois dependem da solução que está contida na célula eletroquímica [37,38].

Um fluxo de corrente elétrica flui na célula eletroquímica entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo quando uma medida é realizada com auxílio de um eletrólito suporte. Este eletrólito precisa obedecer a alguns critérios para assegurar a condutividade elétrica, tais como, boa tensão superficial e viscosidade, ser composto de sais inertes (podendo ser constituídos de sais orgânicos, ácidos minerais ou misturas de compostos com propriedades tamponantes) e ter uma concentração de pelo menos 50 vezes maior que a concentração de espécie de interesse.

Tal fato é importante para que os efeitos da migração sejam minimizados, e que o transporte de massa seja majoritariamente controlado por difusão. A migração tem a contribuição da corrente capacitiva proveniente da dupla camada elétrica, o que não reflete a concentração do analito. Já a difusão reflete a concentração real do analito no seio da solução, sendo assim, este transporte de massa o desejado[35].

Os métodos eletroanalíticos são usados para análises quantitativas utilizando propriedades elétricas, que por sua vez são responsáveis pela detecção da molécula alvo. Dentre os métodos analíticos modernos, as técnicas eletroquímicas têm sua importância baseada principalmente em vantagens como a sensibilidade satisfatória, etapas de execução menos complexas do que as técnicas cromatográficas, instrumentação de baixo custo e uma variedade de aplicações nas análises do dia a dia como medidas de condutividade, análises clínicas, determinação de pH, coulometria e etc [39–41].

Estes métodos são caracterizados por terem medidas rápidas, alta sensibilidade, boa seletividade e baixo custo, o que reflete na vasta aplicação, sendo empregada para sistemas de biossensores [42], investigações criminais (química forense) [43], avaliação de parâmetros no meio ambiente [44], entre outras [45].

Os métodos eletroanalíticos podem ser classificados em [46]:

- Interfaciais – Métodos que envolvem processos que ocorrem na superfície do eletrodo;
- Não-interfaciais – Métodos que envolvem processos que ocorrem no seio da solução. Exemplo: condutometria.

Os métodos interfaciais podem ser divididos em [46]:

- Estáticos – Ausência de corrente elétrica no sistema eletroquímico. (Potenciometria e titulações potenciométricas);
- Dinâmicos – Presença de corrente elétrica no sistema eletroquímico.

Os métodos dinâmicos podem ser divididos em [46]:

- Técnicas de corrente constante (Titulações coulométricas e eletrogravimetria)
- Técnicas de potenciais controlados (voltametria e amperometria).

A **Figura 2** apresenta um resumo esquemático das classificações dos métodos eletroquímicos, e alguns exemplos de cada uma dessas classificações.

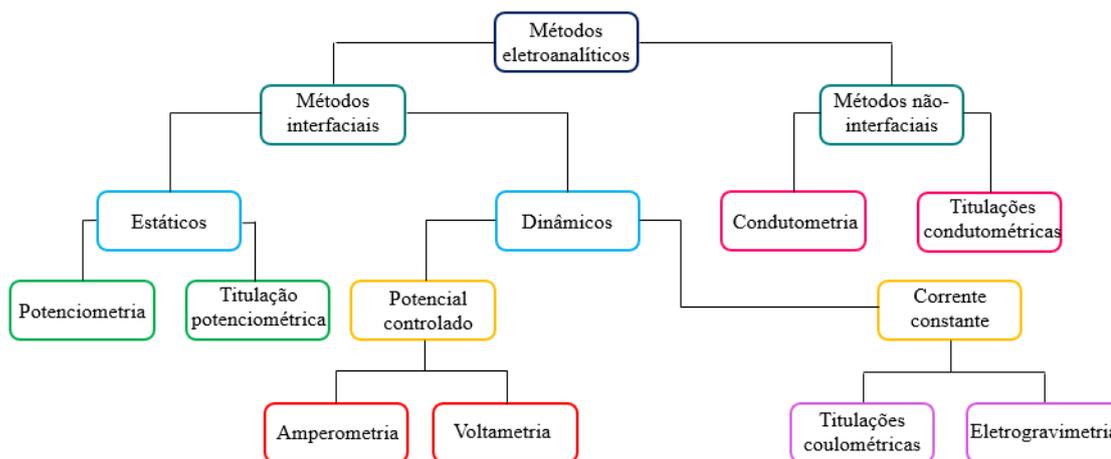


Figura 2. Classificação dos métodos eletroanalíticos. Figura adaptada da referência [46].

Técnicas de potencial controlado (como a voltametria cíclica) se preocupam em estudar como ocorrem os processos de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução em situações dinâmicas (todo o processo redox é monitorado durante o procedimento), onde o potencial do eletrodo é usado para derivar uma reação de transferência de cargas que resulta em uma corrente, e é esta corrente que é medida na análise, e estas técnicas relacionam essa corrente medida com a concentração do analito [34].

Os diferentes tipos de técnicas voltamétricas geram sinais que são expressos em voltamogramas, que podem ser obtidos em função do potencial-tempo ou potencial-corrente nas quais são registrados a magnitude da transferência de elétrons nos processos redox [35].

A corrente resultante do processo redox é denominada corrente faradaica, corrente esta que obedece a lei de Faraday e é uma medida direta da taxa da reação. A reação no eletrodo passa por vários passos e a velocidade das reações dependem da etapa mais lenta da reação. A corrente resultante medida pode ser limitada pela velocidade de transferência eletrônica ou pelo transporte de massa. Esse limite imposto é dependente de vários fatores tais como o material do eletrodo, faixa de potencial analisada, meio reacional, dentre outros. Quando as reações são controladas unicamente pela transferência de elétrons (quando as espécies eletroativas atingem a superfície do eletrodo), o transporte de massa é considerado limitado. Reações como estas, por obedecerem às relações termodinâmicas, são chamadas de reversíveis [34,35,47].

A quantificação da espécie eletroativa estudada ocorre pelo transporte de massa dessas espécies até a superfície do eletrodo de trabalho. O transporte de massa pode ocorrer de três maneiras (**Figura 3**) [35,47]:

- Difusão, que é o movimento espontâneo dos íons devido ao gradiente de concentração do analito na solução;
- Convecção, causada pela perturbação mecânica (rotação ou agitação da solução), que promove maior contato entre o analito e o eletrodo;
- Migração das espécies eletroativas, através do movimento de atração ou repulsão entre os íons causado pelo campo elétrico gerado entre analito e eletrodo.

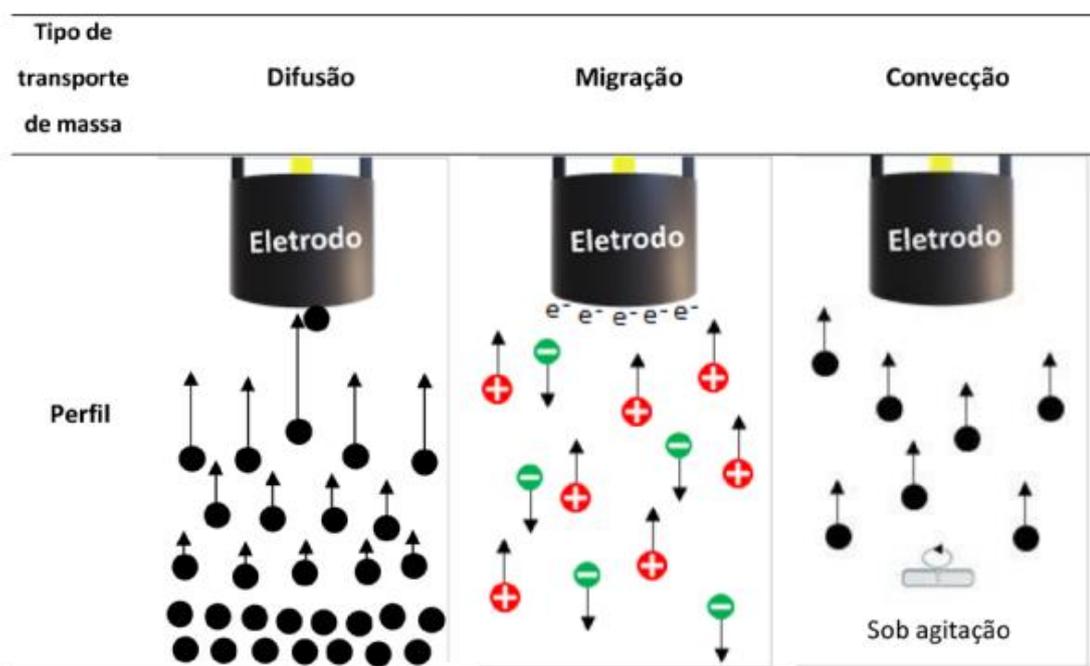


Figura 3. Tipos de transporte de massa das espécies eletroativas para o eletrodo de trabalho em solução. Fonte: [46].

Para evitar que os três transportes de massa ocorram ao mesmo tempo, deve-se ajustar as condições experimentais de uma forma a suprimir os efeitos da convecção e da migração, pois estes não refletem a concentração da espécie de interesse no seio da solução. Este ajuste pode ser feito para que a correlação entre a corrente e a concentração da espécie de interesse não seja afetada. Dessa forma, utilizar um eletrólito suporte em concentrações muito altas (pelo menos 50 vezes maior que a concentração do analito) impede a formação do campo elétrico e minimiza o processo de migração. Utilizar um meio estacionário é uma maneira de evitar a contribuição da convecção. Logo, aplicando essas considerações, o transporte de massa ocorrerá majoritariamente pelo processo de difusão. A difusão é o processo que ocorre primordialmente nas técnicas voltamétricas e, os processos adsorptivos acontecem na superfície

do eletrodo de trabalho por um processo homogêneo, onde a corrente será proporcional à concentração do analito [35].

2.1.1. Voltametria cíclica

Dos diversos métodos dinâmicos em eletroanalítica, a voltametria cíclica (VC) é a técnica mais versátil, e é muito utilizada para se obter informações qualitativas em reações eletroquímicas. Essa versatilidade, combinada com a facilidade de medida de parâmetros de interesse, faz com que ela seja largamente utilizada em química orgânica, química inorgânica ou bioquímica, no estudo de processos de adsorção, de transferência eletrônica em eletrodos semicondutores, e em muitos outros tipos de processos dependentes do potencial [48].

A voltametria cíclica consiste na varredura de potencial (em um formato de onda triangular) de um eletrodo de trabalho o qual se encontra mergulhado numa solução em repouso, medindo-se a corrente resultante. O potencial deste eletrodo é medido relativamente a um eletrodo de referência. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e eletrodo de referência pode ser considerado um sinal de excitação e a corrente resultante pode ser tida como um sinal de resposta [35,48].

O sinal de excitação do eletrodo tem a forma indicada na **Figura 4**. Neste caso, o sinal de excitação compreende de uma varredura linear de potencial no sentido positivo desde um valor inicial (E_i) até um valor considerado como um potencial de retorno ($E_{\lambda 1}$). A este valor a direção da varredura de potencial é invertida, ocorrendo então uma nova varredura linear de potencial, agora no sentido inverso, até um valor final (E_f) que pode, ou não, coincidir com o valor inicial E_i . Este ciclo pode ser repetido, e então, E_f é de fato um novo potencial de retorno, $E_{\lambda 2}$. Esta variação de uma varredura de potencial pode dar informações importantes relativas ao mecanismo do processo de eletrodo [34,35,47,48].

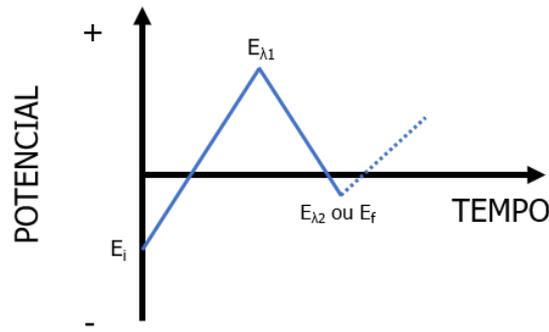


Figura 4. Aplicação de potencial em voltametria cíclica. Figura adaptada da referência [48].

Em resumo, na voltametria cíclica o potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, e a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. Este potencial é aplicado em uma forma triangular, e como resultado temos um gráfico que expressa corrente em função do potencial, chamado de voltamograma (**Figura 5**).

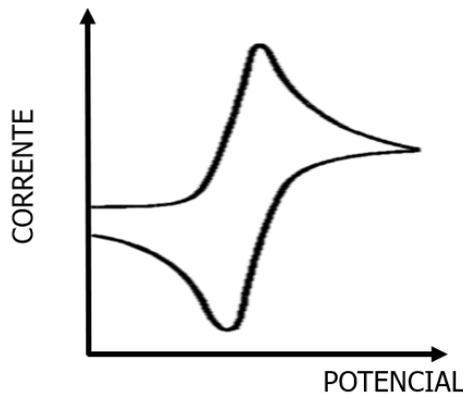


Figura 5. Voltamograma cíclico hipotético, que é um gráfico que expressa a corrente obtida em função do potencial aplicado.

Além da varredura cíclica linear, existe a varredura cíclica na forma de uma escada (staircase), onde cada degrau de potencial terá um tempo de duração, geralmente entre 10 - 50 ms, ou seja, ao final desse tempo de aplicação do potencial, a leitura da corrente será realizada. O intuito desse tempo é minimizar a contribuição da corrente capacitiva (que é uma corrente referente à separação de cargas da dupla camada entre o eletrodo e a solução, sem ocorrer transferência eletrônica) na corrente final que resultará no voltamograma [35].

Vamos analisar agora a transferência de carga de uma espécie eletroativa **O** e o eletrodo de trabalho, ou vice-versa. Para que a reação de transferência de elétrons ocorra, a espécie

eletroativa **O** deve estar localizada dentro de uma distância molecular da superfície do eletrodo. Portanto, a espécie **O_{seio}** localizada no seio da solução, por meio dos processos de transporte de massa é carregada até próxima da superfície do eletrodo, sendo agora **O_{eletrodo}**. Posteriormente, supondo que a espécie ganhe elétrons ela irá se reduzir, transformando-se em **R_{eletrodo}**, que posteriormente por meio dos processos de transporte de massa se afasta do eletrodo virando **R_{seio}**. Este processo pode ocorrer no sentido inverso no qual **R_{eletrodo}** (espécie reduzida) doa elétrons e se transforma em **O_{eletrodo}** (espécie oxidada), conforme é visto na **Figura 6**.

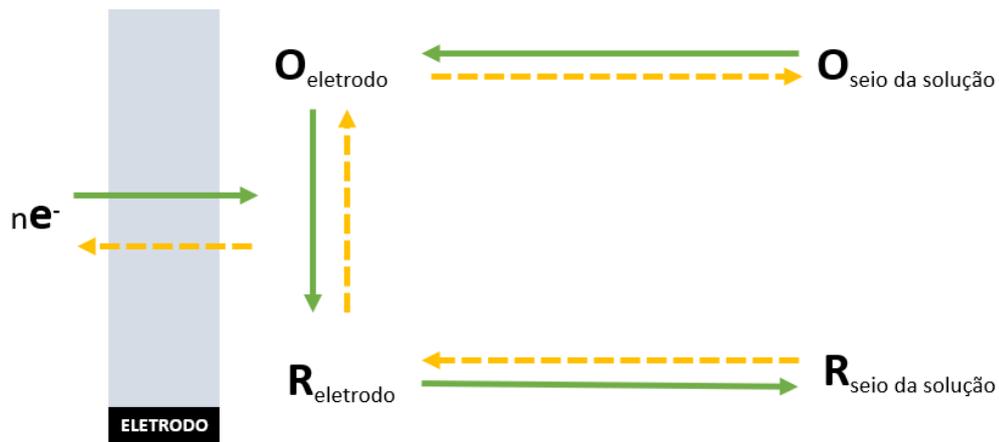


Figura 6. Etapas envolvidas no processo de oxidação ou redução de uma espécie sobre a superfície de um eletrodo. Figura adaptada da referência [35].

Um processo reversível é aquele no qual a velocidade de transferência de carga é tão elevada que se estabelece um equilíbrio dinâmico à superfície do eletrodo. Neste caso, a Equação de Butler-Volmer (equação que descreve a transferência de carga) se reduz a equação de Nernst, uma vez que as concentrações de C_O e C_{Ox} dependem apenas do potencial do eletrodo e não de efeitos cinéticos (**Equação 1**) [35,48].

$$E = E^\circ - (RT / nF) * \ln(C_{Ox}/C_O) \quad \text{(Equação 1)}$$

A **Figura 7** apresenta um voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível, envolvendo espécies solúveis e um eletrodo de trabalho inerte.

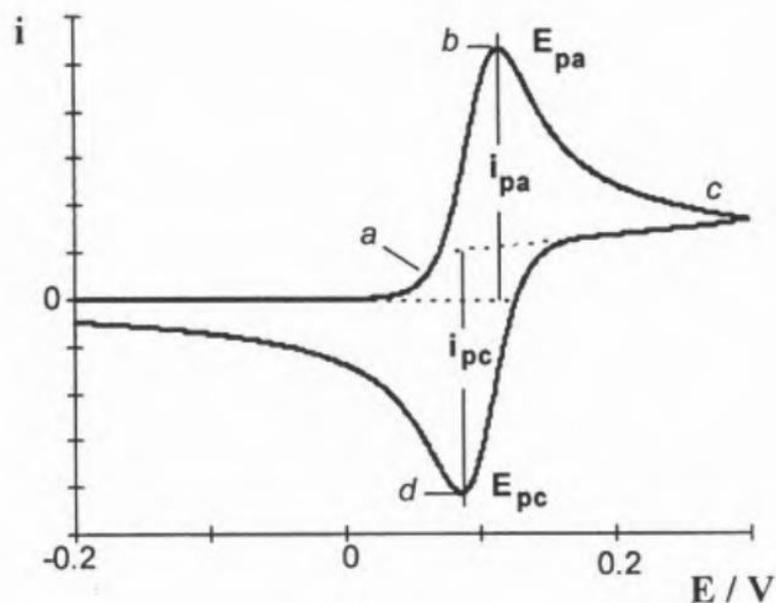


Figura 7. Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível. Fonte: [48]

Na **Figura 7** são observados alguns pontos destacados. Supondo que uma varredura de potencial positivo é escolhida, no ponto (a) temos o início da oxidação da espécie O. No ponto (b) temos o ponto máximo de oxidação da espécie O. Posteriormente, esta concentração começa a diminuir, o que é observado no ponto (c). Na varredura inversa, a espécie O começa a se reduzir, e em (d) temos o ponto máximo de redução da espécie O. Outros parâmetros que são importantes de serem destacados e que são de interesse em qualquer voltametria cíclica são a corrente de pico de anódico (I_{pa}) e corrente de pico catódico (I_{pc}), juntamente com os seus potenciais de pico de anódico (E_{pa}) e potencial de pico de catódico (E_{pc}) [35,48].

Reações químicas paralelas à reação na superfície do eletrodo podem afetar o formato do voltamograma. A corrente de pico I_p é dada pela equação de Randles-Sevcik (**Equação 2**):

$$i_p = (2,69 * 10^5)n^{3/2}ACD^{1/2}v^{1/2} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C é a concentração (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura do potencial (V s^{-1}). O indício do tipo de transporte de massa pode ser encontrado por meio da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) em relação à corrente de pico, caso o gráfico apresente linearidade, isso vai significar um transporte de massa por difusão [47]. Além disso, a separação entre os potenciais de pico do voltamograma pode fornecer informações sobre o número de elétrons envolvidos no processo redox, conforme a **Equação 3**:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} V \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde E_{pa} é o potencial de pico anódico, E_{pc} é o potencial de pico catódico, e n é o número de elétrons envolvidos.

A irreversibilidade eletroquímica resulta de uma transferência eletrônica lenta entre as espécies redox e o eletrodo de trabalho, os picos individuais têm seu tamanho reduzido e a separação entre eles aumenta. A corrente de pico será proporcional à concentração do analito, entretanto será menor a depender do valor de α (coeficiente de transferência)[47]. Sendo assim, a seguinte equação deverá ser usada para encontrar a corrente de pico **(Equação 4)**:

$$i_p = (2,99 * 10^5)n (\alpha n_a)^{1/2} ACD^{1/2}v^{1/2} \quad \text{(Equação 4)}$$

Considerando uma reação quase-reversível, assume-se um processo controlado tanto pela transferência de carga quanto de massa. Dessa maneira os dois processos, direto e inverso, são importantes, mas não são rápidos o suficiente para alcançarem o equilíbrio assim como ocorre no processo reversível. Baseado nisso, uma aproximação de equação de Nernst é satisfeita [47].

Para resumir, os três tipos de voltamogramas cíclicos, sistemas reversíveis, quase-reversíveis e os irreversíveis estão demonstrados na **Figura 8**.

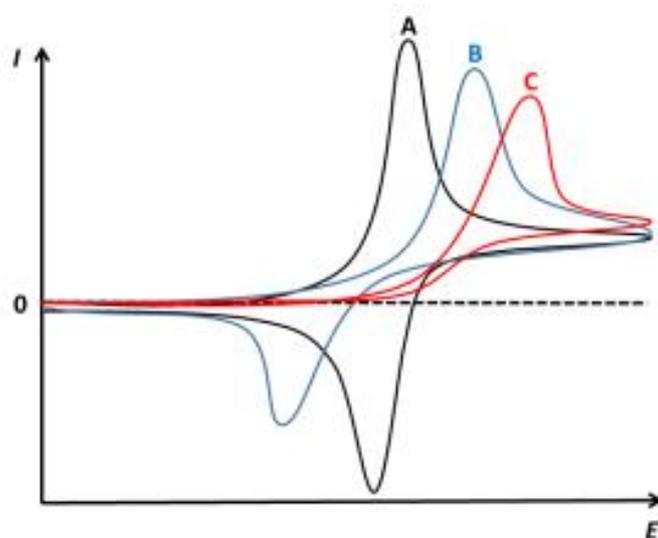


Figura 8. Voltamogramas cíclicos para processos reversíveis (A), quase-reversíveis (B) e irreversíveis (C). Figura adaptada da referência [48]

A **Figura 9**, apresenta um resumo dos diagnósticos para verificar se um processo eletroquímico é reversível, quase-irreversível ou irreversível [49].

| REVERSÍVEL | QUASE REVERSÍVEL | IRREVERSÍVEL |
|---------------------------------------|--|--|
| $I_p \propto v^{1/2}$ | I_p aumenta com v | $I_p \propto v^{1/2}$ |
| $ I_{pa}/I_{pc} = 1$ | $ I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha' = 0,5$ | Ausência de pico reverso |
| $E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ (mV) | $E_p > 59/n$ (mV) e aumenta com v | $ dE_p/d\log v = 29,6/(\alpha' n')$ (mV) |
| $ E_p - E_{p/2} = 56,6/n$ (mV) | - | $ E_p - E_{p/2} = 47,7/(\alpha' n')$ (mV) |
| E_p independe de v | E_p depende de v | E_p depende de v |

I_p : corrente de pico ("a" anódico e "c" catódico)
 v : velocidade de varredura
 E_p : potencial de pico ("a" anódico e "c" catódico)

α = proporcional
 α' = coeficiente de transferência de carga
 n = números de elétrons

Figura 9. resumo dos diagnósticos para verificar se um processo eletroquímico é reversível, quase-irreversível ou irreversível. Fonte: [49].

2.1.2. Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), pulsos de potencial sucessivos de igual amplitude (ΔE_p) são aplicados sobre uma rampa linear ou escada de potencial com incremento

(ΔE_s) em intervalos de tempo e a corrente é medida antes do pulso ser aplicado (I_1) e logo ao final do pulso (I_2), **Figura 10-a**. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é principalmente a contribuição da corrente capacitiva e a segunda a contribuição da corrente faradaica, e então registradas contra o potencial, gerando um voltamograma de pulso diferencial [34,35,47], **Figura 10-b**.

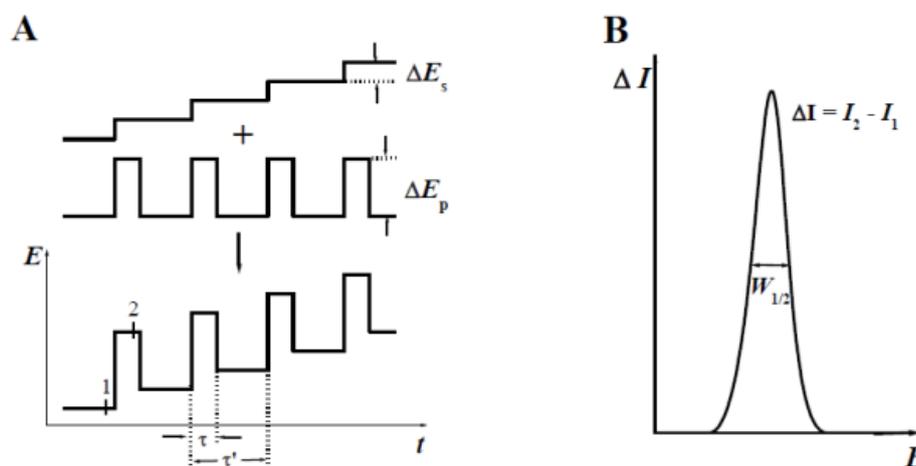


Figura 10. (A) Forma de aplicação do potencial e medição da corrente em VPD; (B) voltamograma típico da VPD. Fonte: [35]

O decaimento da corrente capacitiva, após a aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido do que da corrente faradaica, pois ao se aplicar o pulso, ocorre um aumento da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente, assim, escolhendo um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se a leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva pode ser desconsiderada. Assim, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter sido minimizada [34,35,47], conforme ilustrado na **Figura 11**.

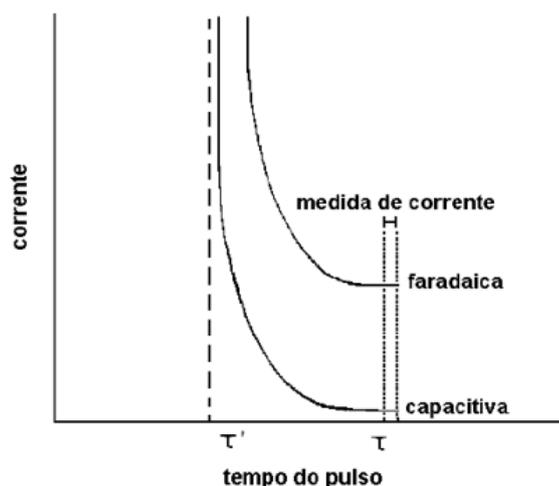


Figura 11. Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso. Fonte: [35].

O tempo τ durante o qual o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de pulso, e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s e a velocidade de varredura $v = \tau \Delta E_s$. Em VPD, a velocidade de varredura varia normalmente entre 1 e 10 mV s^{-1} [35,47].

2.1.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de pulso diferencial (VPD) ainda é a técnica muito utilizada para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detectabilidade e resolução frente às técnicas de corrente contínua. Mas, ao lado dela, uma técnica muito conveniente do ponto de vista analítico que tem sido incorporada em diversos instrumentos comerciais é a voltametria de onda quadrada (VOQ) [50].

Esta técnica pode ser usada para realizar-se experimentos de um modo bem mais rápido do que usando-se a técnica de pulso diferencial, com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor, pois aqui também ocorrem compensações da corrente capacitiva [50].

A VOQ é uma técnica em que a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, onde pulsos de potencial (ΔE_p) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_s) e duração $2t_p$ (período). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto e reverso, originando um pico simétrico com posição, largura e altura

característicos do sistema avaliado (ΔI), que é um sinal obtido diferencialmente, e apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas [47].

Nesta técnica, o regime de amostragem permite obter como resposta três tipos de curvas: a corrente I_1 (ou I_d) registrada no final do pulso de potencial direto (corrente direta), a corrente I_2 (ou I_r) registrada no final do pulso reverso (corrente reversa) e a corrente total ou resultante (ΔI ou I_t) que corresponde à diferença entre essas duas. A corrente I_2 possui sinal contrário a I_1 [35,47,50]. O sinal da excitação e os voltamogramas correspondentes às amostragens de corrente estão na **Figura 12**.

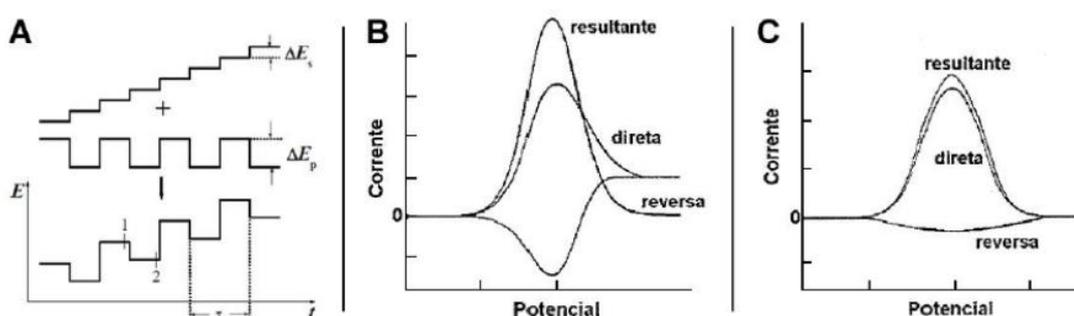


Figura 12. (A) Forma de aplicação de potencial e medição da corrente em VOQ; (B) voltamograma esquemático de um processo redox de um sistema reversível; (C) voltamograma esquemático de um processo redox de um sistema irreversível. Fonte [49].

De modo semelhante à técnica de pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada produz picos para processos faradaicos, cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa [50].

2.2. Eletrodos de carbono

Associada à versatilidade das técnicas eletroanalíticas, a condutividade elétrica é um fator determinante para a escolha do material do eletrodo. Os eletrodos à base de carbono apresentam diversas vantagens como ampla janela de potencial, baixas correntes de fundo e inércia química, quando comparados aos eletrodos de metais nobres, como o ouro e a platina [51].

O carbono, por apresentar diferentes alótropos, existe em diferentes formas (pó, fibras, espumas e compósitos) e se apresenta como um material muito atrativo em aplicações eletroquímicas [51].

As reações eletroquímicas são, normalmente, mais lentas em materiais à base de carbono que em comparação com eletrodos metálicos, sendo a cinética de transferência do elétron dependente da estrutura e preparação da superfície do eletrodo. No entanto, o carbono tem uma atividade superficial elevada, que pode ser aumentada no caso da presença de grupos funcionais na estrutura [52–54].

Existem na literatura diversas aplicações para os eletrodos de carbono em diferentes formas, são elas eletrodos de pasta de carbono [55], carbono vítreo [56], nanotubos de carbono [57], grafeno [58] e eletrodo de carbono impresso [59], dentre outras. O carbono não se limita a detectores eletroquímicos e tem sido amplamente aplicado, por exemplo, para melhorar as técnicas de pré-concentração e separação de amostras.

As duas formas de carbono elementar mais conhecidas são o grafite e o diamante, dois materiais que possuem características completamente diferentes. O grafite é um material opaco e um ótimo condutor de eletricidade, enquanto o diamante é transparente, e isolante. Esta abrangência de possibilidades é o que torna o carbono um elemento bastante interessante [29].

Dentre os vários tipos de eletrodo de carbono, o eletrodo de grafite de lapiseira (PGEs – do inglês pencil graphite electrodes) é o que vem ganhando destaque. Algumas de suas características o tornam uma excelente opção para compor um eletrodo em relação a outros materiais convencionais [52–54,60], são elas:

- Fácil manuseio;
- Vasta disponibilidade;
- Facilmente encontrado, não sendo necessário importar de grandes fornecedores;
- Baixo custo;
- É descartável;
- Sua superfície é facilmente renovável;
- Não é tóxico;
- Portátil;
- Tem boa estabilidade química e mecânica;
- Boa sensibilidade e condutividade;

A composição dos PGEs consiste em uma mistura de grafite natural (75 - 80 %), aglutinante orgânico (13 %) e óleo fuso (8 %) que é espremida em formato de haste e aquecida

300 °C para desidratação seguida de uma sinterização a 1000 °C. Além disso, o grafite é a forma mais estável de carbono, sendo encontrado em carvão e minérios naturais. Os PGEs possuem uma subclassificação que relaciona a quantidade de grafite nele, sendo de dois tipos: H (representando sua dureza, do inglês hardness) e B (representando sua negritude, do inglês blackness), aquele com maior teor de grafite, é também o mais macio. A junção HB também existe, tendo a mesma quantidade em argila e grafite. Ambos possuem numerações que representam sua dureza e maciez, variando de 1 a 9 [60].

Como foi visto, na literatura ainda são encontrados poucos trabalhos que utilizam métodos eletroquímicos como método de análise de bromadiolona. Assim, o presente trabalho, reporta pela primeira vez o estudo eletroquímico da bromadiolona por meio da sua redução eletroquímica, bem como o desenvolvimento de um método analítico para detecção do raticida em amostras forenses e de produtos comerciais utilizando uma célula estacionária e eletrodos de grafite de lapiseira, como material renovável.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica para determinação do rodenticida bromadiolona em amostras forenses de chocolate em pó e produtos comerciais, por meio da redução eletroquímica da bromadiolona, utilizando eletrodo de grafite de lapiseira e voltametria de onda quadrada como técnica voltamétrica.

Objetivos específicos

- ✓ Realizar o estudo da redução eletroquímica da bromadiolona por meio da voltametria cíclica utilizando eletrodo de grafite de lapiseira e solução tampão Britton-Robinson;
- ✓ Realizar o estudo da concentração da solução tampão e do pH do meio;
- ✓ Realizar estudo da velocidade de varredura;
- ✓ Realizar a comparação das técnicas eletroquímicas VPD e VOQ;
- ✓ Otimizar os parâmetros da melhor técnica eletroquímica;
- ✓ Realizar estudo da repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade;
- ✓ Realizar estudos para determinação de parâmetros analíticos, como limite de detecção e limite de quantificação;
- ✓ Construir uma curva analítica;
- ✓ Determinar bromadiolona utilizando a sua redução eletroquímica e eletrodos de grafite de lapiseira em amostras de chocolate em pó forense e amostras comerciais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e reagentes

Hidróxido de sódio (50 % p/v) e ácido ortofosfórico (85 % de concentração) foram fornecidos pela Acros Organics (Geel, Bélgica). O ácido bórico (99,5 % de pureza) foi obtido da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil). O ácido acético (99,5 % de pureza) foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Estes foram utilizados para o preparo da solução tampão Britton-Robinson (Tampão BR). As soluções tampão foram preparadas semanalmente.

O padrão de bromadiolona (91,3 % de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça). Dimetilformamida (99,5 % de pureza) foi adquirida da Merck e utilizado para preparo da solução estoque de bromadiolona. Soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque.

Grafite de lapiseira (0,7 mm de diâmetro, 2B, Faber Castell) foi adquirido em lojas locais. Lixas d'água de granulometria 2000 μm foram utilizadas para preparo da superfície dos eletrodos. Água ultrapura (resistividade $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) fornecida por um purificador de água de osmose reversa Permuton RO0310, foi utilizada para lixar os eletrodos.

4.2. Experimentos voltamétricos

Uma célula eletroquímica convencional de vidro de três eletrodos (**Figura 13-A**) foi empregada nas análises eletroquímicas. Grafites de lapiseira com diâmetro de 0,7 mm do tipo 2B (Faber Castell) foram utilizados como eletrodos de trabalho e eletrodo auxiliar. O eletrodo de referência utilizado foi um fio de prata de 0,3 mm de diâmetro. Antes das medidas voltamétricas, a solução foi homogeneizada usando um agitador magnético.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de vidro contendo 10 mL de solução tampão Britton-Robinson (Solução tampão BR), e alíquotas adequadas de soluções de bromadiolona. O eletrodo de trabalho foi preparado lixando a sua superfície com auxílio de lixas d'água de granulometria 2000 μm . Para isso, fez-se movimentos em forma de infinito (∞), por 1 minuto. Posteriormente, lavou-se o eletrodo com água purificada e deixou secar naturalmente.

Uma tampa para a célula eletroquímica (**Figura 13-B**) foi produzida a partir de uma impressora 3D utilizando filamento ABS (1,75 mm de diâmetro) adquirido da 3Dfila (Belo

Horizonte, MG, Brasil). A modelagem da tampa foi realizada por meio do software de design Fusion 360 free 3D CAD/CAM (Autodesk, San Rafael, CA, USA). O arquivo CAD obtido (.stl) foi processado com o software Ultimaker Cura 5.0 (Geldermalsen, Países Baixos) para obter o arquivo GCODE contendo os comandos de impressão. Uma impressora 3D Creality Ender 3 FDM (Creality, Shenzhen, China) equipada com bico de extrusão 0,4 mm de diâmetro foi utilizada.

Para que seja possível realizar uma medida eletroquímica, os eletrodos precisam estar em uma distância adequada para que não haja contato entre eles, provocando um curto-circuito, e também para que a corrente flua entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. Assim, fez-se necessário o uso da tampa da célula eletroquímica para auxiliar no posicionamento dos eletrodos. Os eletrodos foram colocados em ponteiros de micropipeta e encaixados na tampa impressa em 3D, assim tendo um controle da área exposta do eletrodo de trabalho, sendo de $0,28 \text{ cm}^2$.

Os eletrodos foram conectados com auxílio de conectores do tipo jacaré a um potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT 128N (Ecochemie, Utrecht, Holanda), que foi utilizado para realizar as medidas eletroquímicas, e este foi conectado a um computador e gerenciado pelo software Metrohm Autolab Nova 2.1.4.

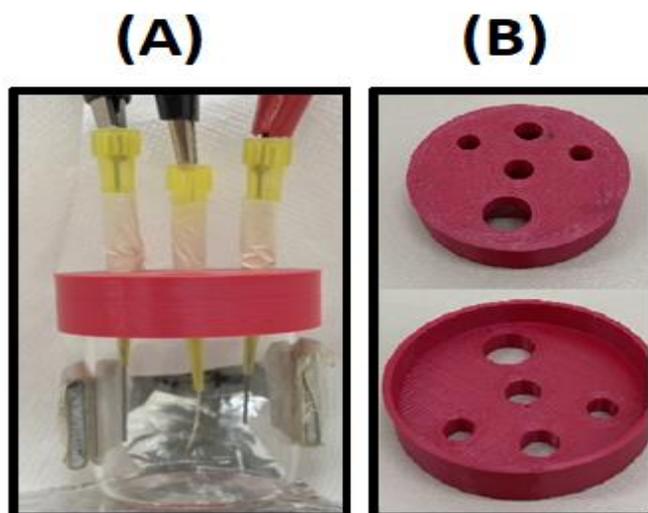


Figura 13. (A) Célula eletroquímica de vidro utilizada. (B) Tampa impressa em 3D;.

Para os experimentos eletroquímicos foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ).

4.3. Preparo e análise das amostras reais

O método desenvolvido neste trabalho foi aplicado para a análise qualitativa e quantitativa de bromadiolona em raticidas comerciais e em amostras de chocolate em pó fornecidas pela polícia forense. Para preparo da amostra de chocolate em pó, inicialmente, em um tubo de ensaio, adicionou-se uma massa apropriada de chocolate em pó e 2,0 mL de água destilada. Esta extração inicial com água faz-se necessária para que os compostos solúveis em água, como açúcares, sejam separados da bromadiolona, visto que esta é muito pouco solúvel em água (solubilidade da bromadiolona em água é de 19 mg L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Posteriormente, levou-se o tubo de ensaio para o ultrassom e sonicou-se por 10 min. Posteriormente, levou-se o tubo de ensaio para a centrifuga. Centrifugou-se por 10 min a 2500 rpm. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e reservou-se o precipitado. Ao precipitado, adicionou-se 5,0 mL de etanol 95 % e repetiu-se o procedimento descrito para a água destilada, com o diferencial que ao final do processo, reservou-se o sobrenadante. A bromadiolona é solúvel em etanol, tendo solubilidade de $8,2 \text{ g L}^{-1}$. Este sobrenadante foi utilizado para os experimentos eletroquímicos. A **Figura 14** apresenta o esquema do procedimento descrito.

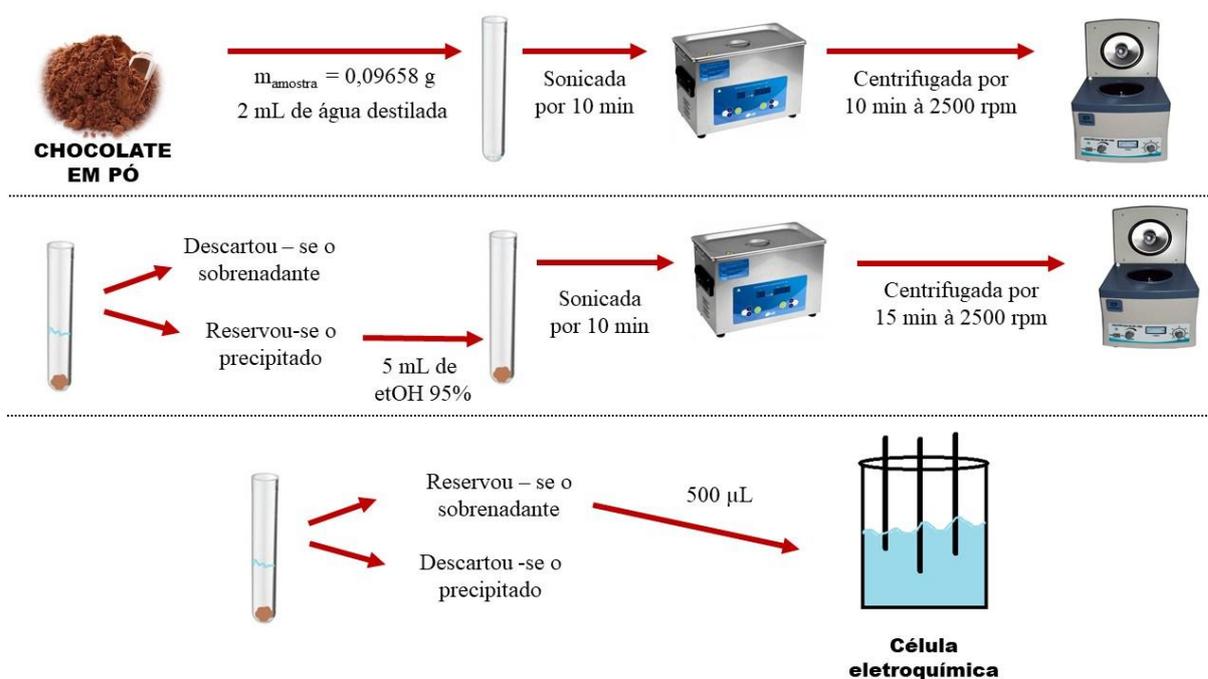


Figura 14. Esquema do procedimento de preparo da amostra de chocolate em pó.

Para determinação quantitativa de bromadiolona, amostras comerciais foram adquiridas de lojas de materiais veterinários, localizadas na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Para preparo das amostras comerciais, inicialmente, em um tubo de ensaio, adicionou-se massas apropriadas das amostras comerciais e 5,0 mL de dimetilformamida (DMF), solubilidade da bromadiolona em DMF é de 750 g L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Levou-se o tubo de ensaio para o ultrassom e sonicou-se por 10 min. Posteriormente, levou-se o tubo de ensaio para a centrífuga. Centrifugou-se por 15 min a 3000 rpm. Após a centrifugação, descartou-se o precipitado e reservou-se o sobrenadante. Este sobrenadante foi utilizado para os experimentos eletroquímicos. A **Figura 15** apresenta o esquema do procedimento descrito.

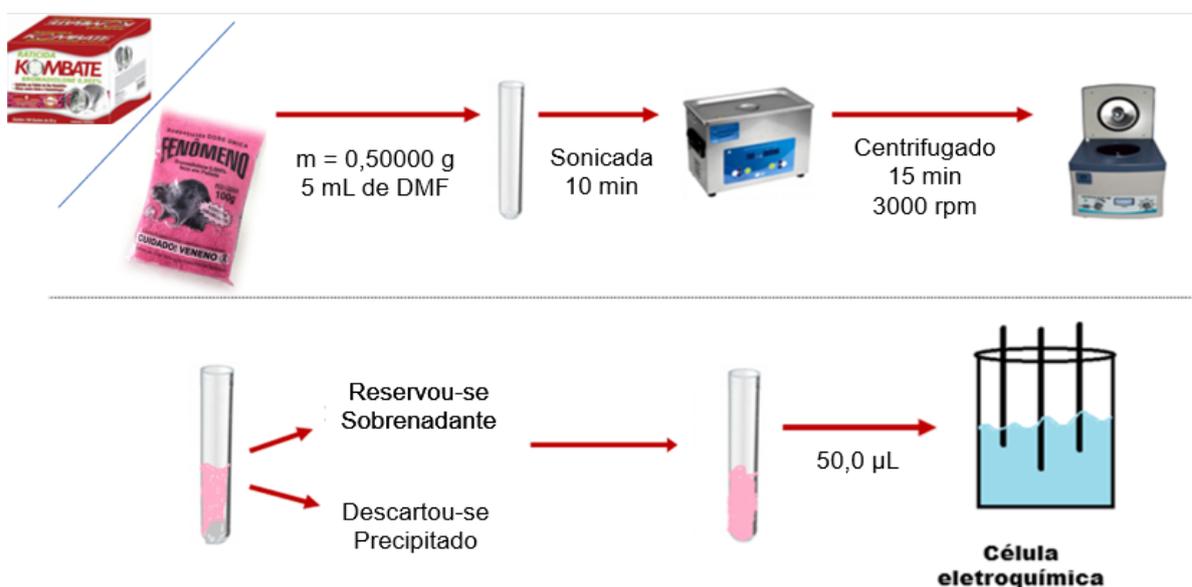


Figura 15. Esquema do preparo das amostras comerciais de bromadiolona.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comportamento eletroquímico da bromadiolona e estudo de pH

Primeiramente, o comportamento eletroquímico da bromadiolona foi investigado em solução tampão Britton-Robinson, utilizando a técnica voltametria cíclica. Na literatura, são encontrados trabalhos que utilizam a oxidação da bromadiolona, e no presente trabalho optou-se por investigar se a mesma apresentava um sinal de redução. A **Figura 16** apresenta o voltamograma cíclico da bromadiolona registrado com o eletrodo de grafite de lapiseira.

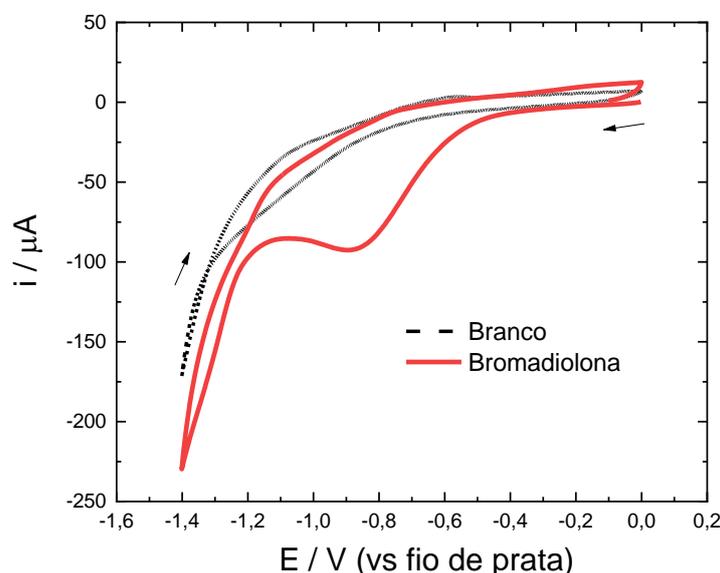


Figura 16. Voltamograma cíclico da bromadiolona 10 μM . **Curva preta:** voltamograma cíclico na ausência de bromadiolona. **Curva vermelha:** voltamograma cíclico na presença de bromadiolona. **Parâmetros:** eletrólito: solução tampão BR 0,1 M, pH 4,0. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

A partir da análise da **Figura 16**, é possível observar que a bromadiolona apresentou um único sinal eletroquímico sobre a superfície do eletrodo de grafite de lapiseira, sendo este um pico catódico em $E_p = -0,83 \text{ V}$, e comparando a curva vermelha com a curva preta, que representa o branco da medida, podemos atribuir o pico observado à bromadiolona. Este resultado demonstra a viabilidade da determinação eletroquímica da bromadiolona na superfície do eletrodo utilizado.

Visando o desenvolvimento de um método analítico robusto e confiável, as condições experimentais e instrumentais necessitam ser otimizadas. O eletrólito suporte é um componente muito importante nas medidas eletroquímicas, visto que este deve manter a mobilidade das espécies que estão no interior da solução até a superfície do eletrodo de trabalho (local aonde as reações de interesse acontecem) constantes [35]. Desta forma, a concentração do eletrólito suporte foi otimizada. A solução tampão BR foi utilizada como eletrólito suporte, e a **Figura 17** apresenta a corrente obtida em função da concentração da solução tampão BR.

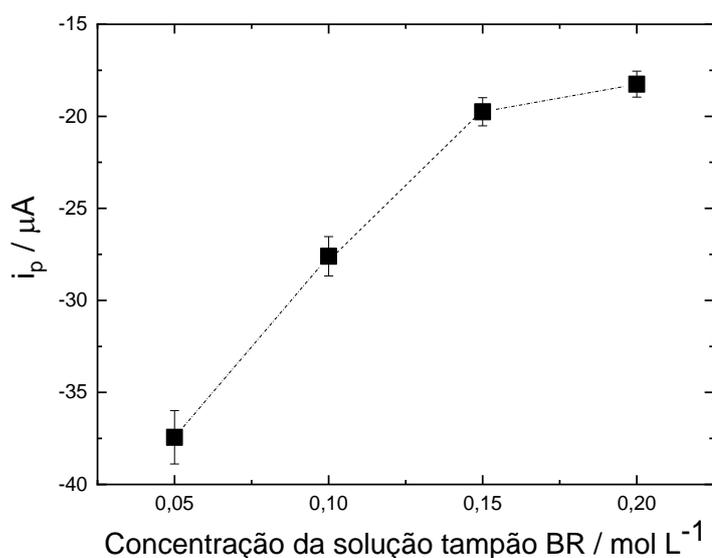


Figura 17. Influência da concentração da solução tampão BR na corrente de pico da redução da bromadiolona (10 μM). **Parâmetros:** eletrólito: solução tampão BR, pH 4,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

Pela análise da **Figura 17**, é possível observar que a corrente de pico da bromadiolona diminui conforme a concentração da solução tampão aumenta. Além disso, percebe-se que o valor máximo obtido se encontrava quando a concentração da solução tampão foi de 0,05 mol L⁻¹. Sendo assim, o valor de 0,05 mol L⁻¹ foi utilizado no decorrer dos experimentos.

Com o intuito de se verificar o efeito da concentração hidrogeniônica no comportamento voltamétrico da bromadiolona, realizou-se um estudo de pH (**Figura 18.A**). Analisando a corrente de pico de redução da bromadiolona em função do valor de pH, como pode ser observado na **Figura 18.B**, a corrente atinge o máximo em pH 4,5, e a partir do pH 5,5, a corrente começa a decair, sendo assim, este foi o valor escolhido para experimentos posteriores. Tal fato, fica evidenciado ainda analisando os voltamogramas obtidos, **Figura 18.B**.

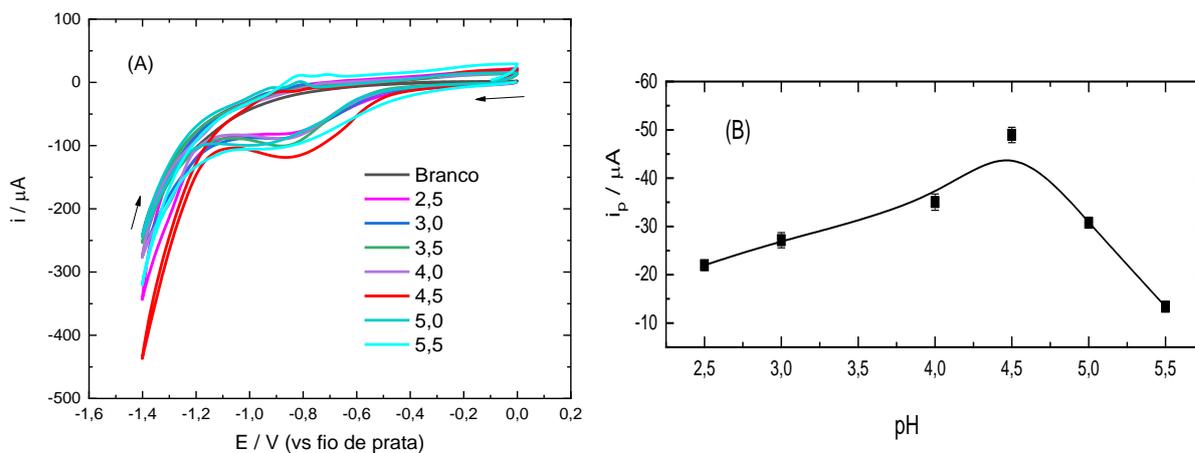


Figura 18. Avaliação do pH na redução da bromadiolona 10 μM . **(A)** voltamograma cíclico da redução de bromadiolona em diferentes pH. **Parâmetros:** eletrólito: solução tampão BR 0,05 M, em diferentes pH; Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . **(B)** corrente de pico catódico em função do pH ($n = 3$ medidas);

5.2. Estudo da velocidade de varredura

O experimento da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 10 a 250 mV s^{-1} , com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo [34,47]. A **Figura 19** apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR 0,05 M (pH 4,5), em diferentes velocidades de varredura.

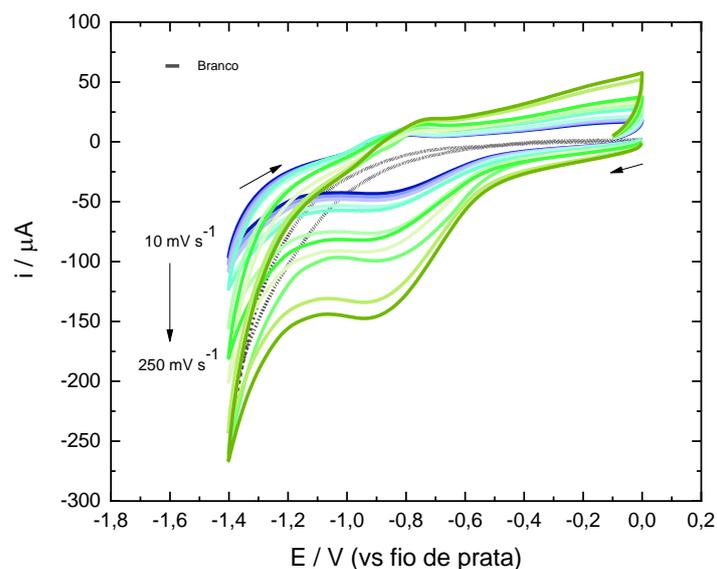


Figura 19. Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura, variando de 10 mV s^{-1} a 250 mV s^{-1} . **Parâmetros:** eletrólito: solução tampão BR $0,05 \text{ M}$, pH 4,5; Concentração de bromadiolona $250 \text{ } \mu\text{M}$.

No intervalo de velocidade estudado, verificou-se que a bromadiolona se reduz irreversivelmente pela ausência de pico na varredura reversa de potencial. Analisando a corrente de pico catódico, observou-se uma dependência linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 20**). Tal fato sugere um transporte de massa para a reação da bromadiolona sobre a superfície do eletrodo de grafite que é controlado por difusão. A equação linear do pico catódico encontrada foi $i_p / \mu\text{A} = 1,6496 \times 10^{-6} - 2,1133 \times 10^{-6} \times v^{1/2} (\text{V}^{1/2} \text{ s}^{-1/2})$, e o coeficiente de correlação (R) foi 0,975 [34,35,47].

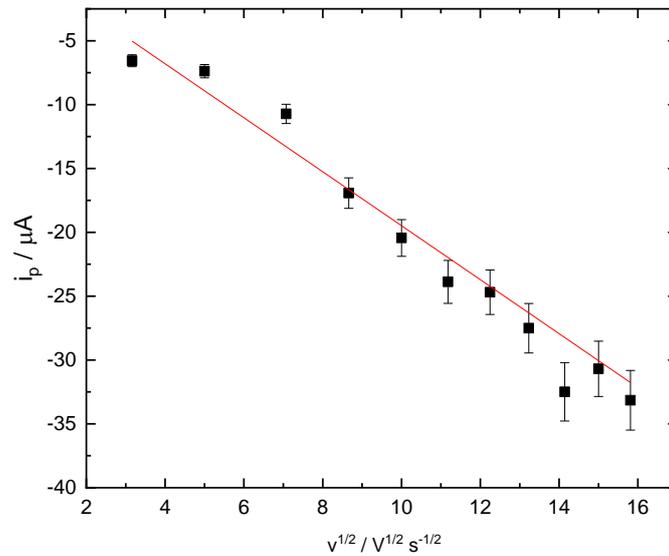


Figura 20. Gráfico da corrente de pico catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (n = 3 medidas).

A dependência entre o logaritmo da corrente de pico de redução da bromadiolona com o logaritmo da velocidade de varredura foi investigada (**Figura 21**), e uma dependência linear foi observada. A equação linear do pico catódico encontrada foi $\log i_p / \mu A = -5,914 + 0,5679 \log v (V s^{-1})$, e o coeficiente de correlação (R) foi 0,980. A inclinação da curva foi 0,568, o que indica um processo majoritariamente controlado por difusão em que a espécie eletroativa se difunde do seio da solução para a superfície do eletrodo [34,35,47].

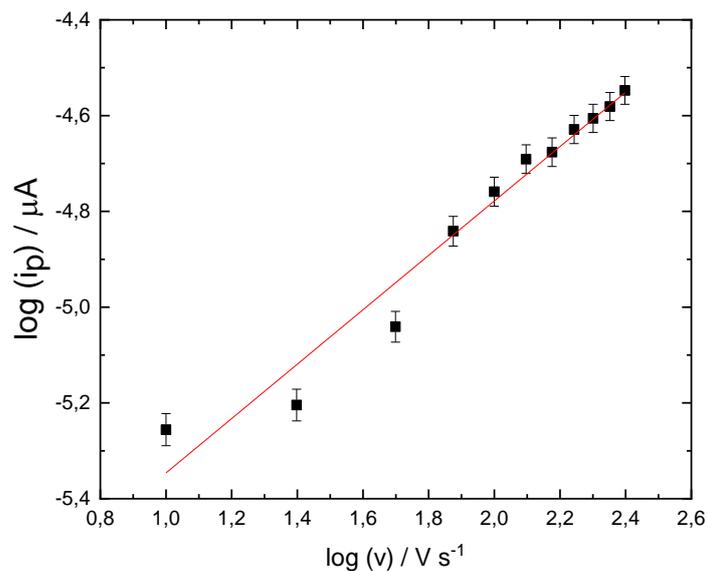


Figura 21. Gráfico do logaritmo da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (n = 3 medidas).

A **Figura 22** apresenta a dependência do potencial de pico de redução da bromadiolona e do logaritmo da velocidade de varredura. Tal fato indica que o processo eletroquímico da bromadiolona pode ser caracterizado como irreversível na faixa de trabalho estudada [34,35,47]. Os valores dos potenciais de pico catódico se tornaram mais negativos com o aumento da velocidade de varredura. A equação linear obtida foi $E_p / \text{V} = -0,64333 - 0,10749 \log v (\text{V s}^{-1})$ com R de 0,968.

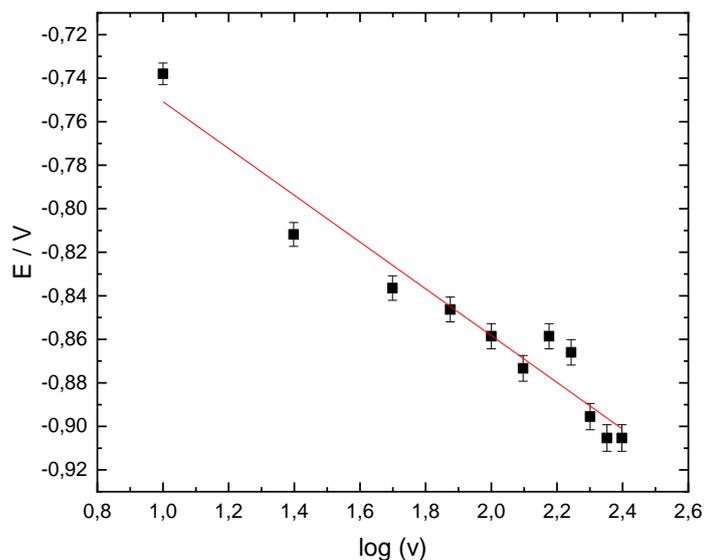


Figura 22. Gráfico do potencial de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (n = 3 medidas).

Diante dos gráficos obtidos, podemos calcular o número de elétrons que participam da reação de redução da bromadiolona. Para isso, este valor pode ser obtido a partir da equação de Laviron (**Equação 5**) [34,47].

$$E_p = E^{o'} + \left(\frac{2,303 * R * T}{\alpha * n * F} \right) * \log \left(\frac{R * T * K^o}{\alpha * n * F} \right) + \left(\frac{2,303 * R * T}{\alpha * n * F} \right) * \log v$$

Equação 5. Equação de Laviron.

Onde, R é a constante universal dos gases ideais (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹); T é a temperatura (298 K); F é a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹); α é o coeficiente de transferência, n é o número de elétrons transferidos e v é a velocidade de varredura.

A partir da curva **E_p vs log v**, é possível obter o valor do coeficiente angular (θ), que para a redução da bromadiolona foi de -0,107. Relacionando o valor do coeficiente angular da curva com a equação de Laviron apresentada, temos:

$$\theta = \frac{2,303 * R * T}{\alpha * n * F}$$

Substituindo os respectivos valores, temos que o valor de an é de 0,56. Para processos irreversíveis, o valor de α pode ser atribuído como sendo 0,5 [47]. A partir dessa informação, o número de elétrons envolvidos no processo de redução da bromadiolona é de $n = 1,11$. Assim, pode-se deduzir que o mecanismo de redução da bromadiolona sobre o eletrodo de grafite de lapiseira envolve a transferência de 1 elétron.

Trabalhos anteriores que utilizaram derivados de cumarina demonstraram a participação de 1 elétron em reações de redução eletroquímica. Assim, o valor encontrado para redução de bromadiolona indica estar de acordo com a literatura, visto esta ser um derivado de compostos cumarínicos [61].

5.3. Otimização dos parâmetros instrumentais

Para definir qual a melhor técnica voltamétrica para os estudos quantitativos na determinação de bromadiolona, escolheu-se a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ). Para isso, medidas de VPD e VOQ foram realizadas sob as mesmas condições experimentais, sendo a velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. A **Figura 23** apresenta os resultados obtidos. A VPD forneceu uma corrente de pico de $-3,34 \mu\text{A}$, enquanto a VOQ apresentou um sinal com intensidade de $-7,47 \mu\text{A}$. Dessa forma, considerando uma maior detectabilidade a VOQ foi selecionada para os estudos seguintes.

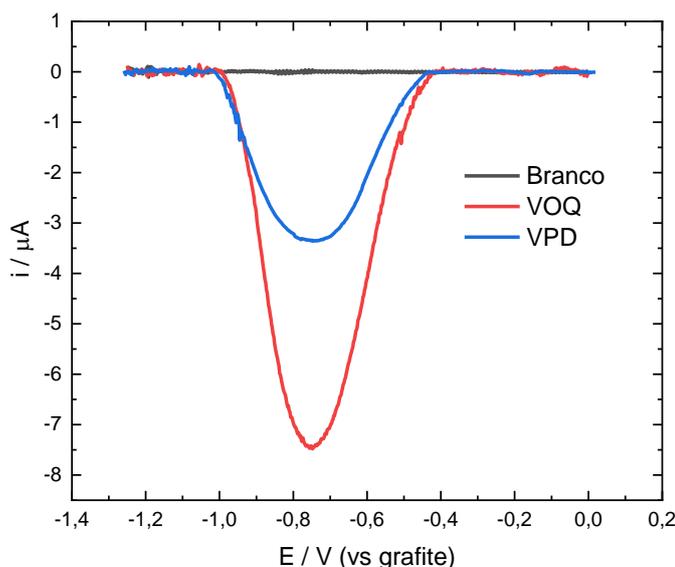


Figura 23. Voltamograma de pulso diferencial e voltamograma de onda quadrada na presença de bromadiolona $10 \mu\text{M}$. Parâmetros VPD: step potential = $0,004 \text{ V}$; amplitude = $0,03$

V; modulation time = 0,05 s; intervalo de tempo = 0,080 s; Parâmetros VOQ: step potential = 0,004 V; amplitude = 0,03 V; frequência = 12,50 Hz;

Visando as melhores condições experimentais, os parâmetros da VOQ foram otimizados. Os parâmetros avaliados foram frequência, incremento de potencial, amplitude do pulso, potencial de deposição e tempo de deposição.

A **frequência** foi estudada na faixa de 10 a 60 Hz (**Figura 24**), e a corrente de pico em função da frequência mostrou uma dependência linear ($R = 0,984$). Como a corrente de pico apresentou uma dependência linear, o valor ótimo escolhido para a frequência foi 10 Hz, pois foi o que apresentou a maior corrente.

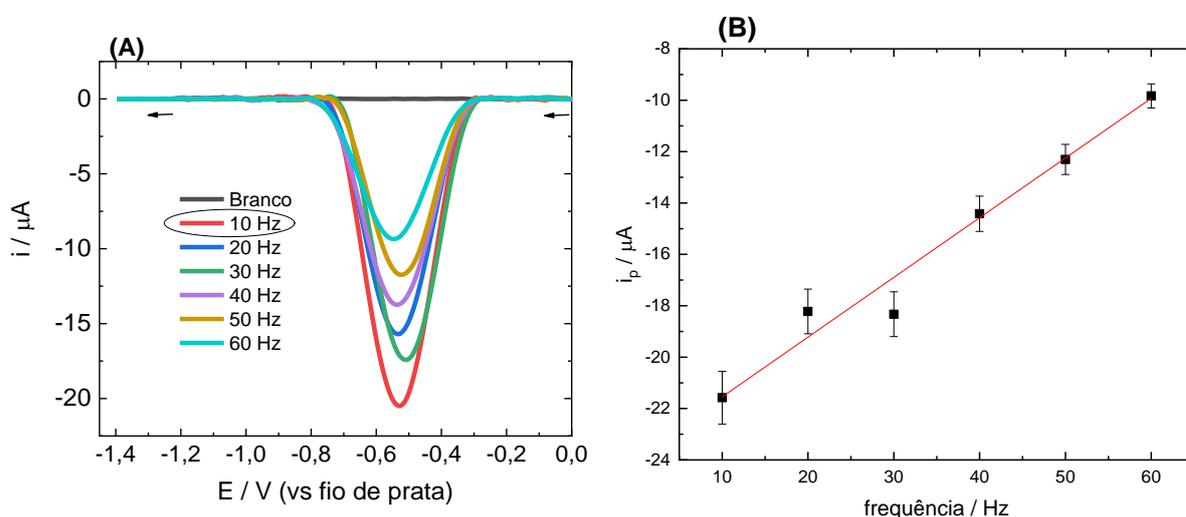


Figura 24. (A) voltamograma de onda quadrada da frequência variando de 10 Hz à 60 Hz. (B) correntes de pico em função da frequência ($n = 3$ medidas). **Parâmetros utilizados:** Solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; amplitude = 0,03 V; step Potential: 0,004 V.

O **incremento de potencial (step potential)** foi estudado na faixa de 1 a 9 mV (**Figura 25**), e a corrente de pico em função do step potential mostrou uma dependência linear ($R = 0,970$). O valor ótimo escolhido para o incremento de potencial foi 6 mV, pois este valor apresentou a melhor relação entre resolução/intensidade do sinal, e acima deste valor não foram observadas grandes diferenças na intensidade do sinal.

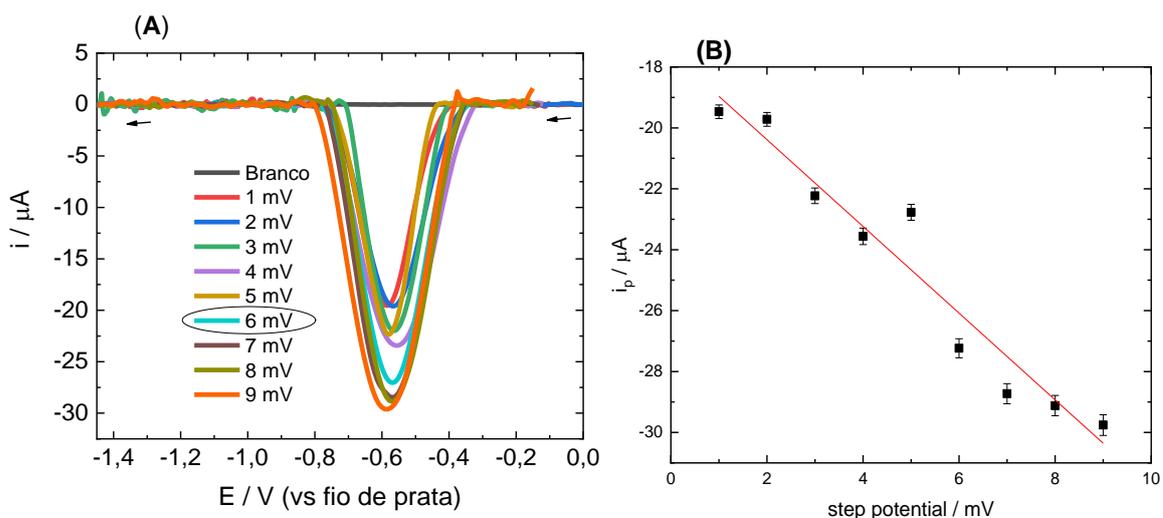


Figura 25. (A) voltamograma de onda quadrada do incremento de potencial variando de 1 mV à 9 mV; (B) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do step potential ($n = 3$ medidas). **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μ M; frequência = 10 Hz; amplitude: 60 mV.

A **amplitude** foi estudada na faixa de 10 a 70 mV (**Figura 26**), e a corrente de pico em função da amplitude mostrou uma dependência linear ($R = 0,984$). O valor ótimo escolhido para a amplitude foi 60 mV, pois este valor apresentou a maior intensidade de sinal e não prejudicou a resolução da medida.

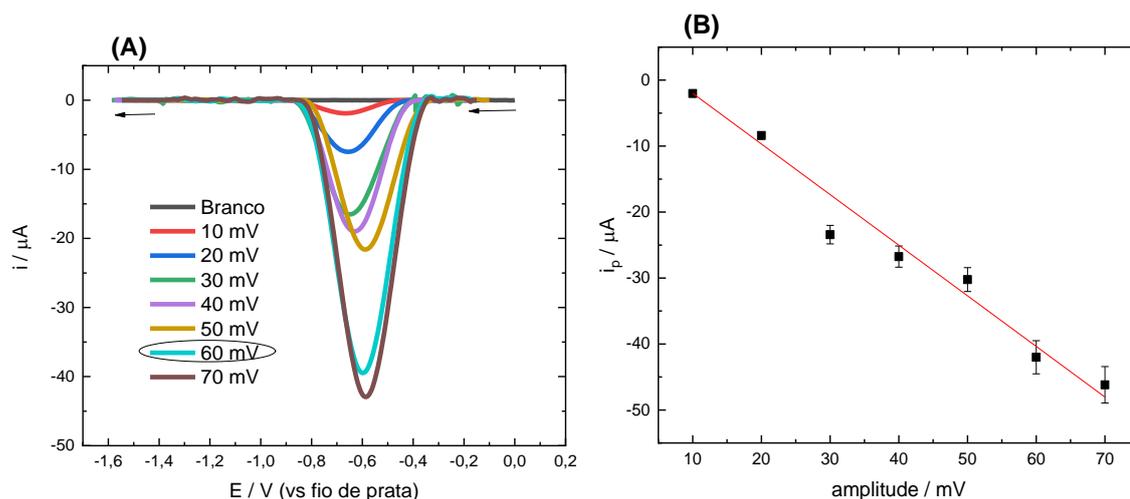


Figura 26. (A) voltamograma de onda quadrada da amplitude variando de 10 mV à 70 mV; (B) corrente de pico da redução da bromadiolona em função da amplitude ($n = 3$ medidas). **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μ M; frequência = 10 Hz; step potential: 0,004 V.

O **potencial de deposição** foi estudado na faixa de -0,10 a -0,35 V (**Figura 27**), que era um potencial próximo do início da redução da bromadiolona. A corrente de pico em função do potencial de deposição não demonstrou uma dependência linear. O valor escolhido como ótimo foi -0,35 V, visto que apresentou o maior valor de corrente.

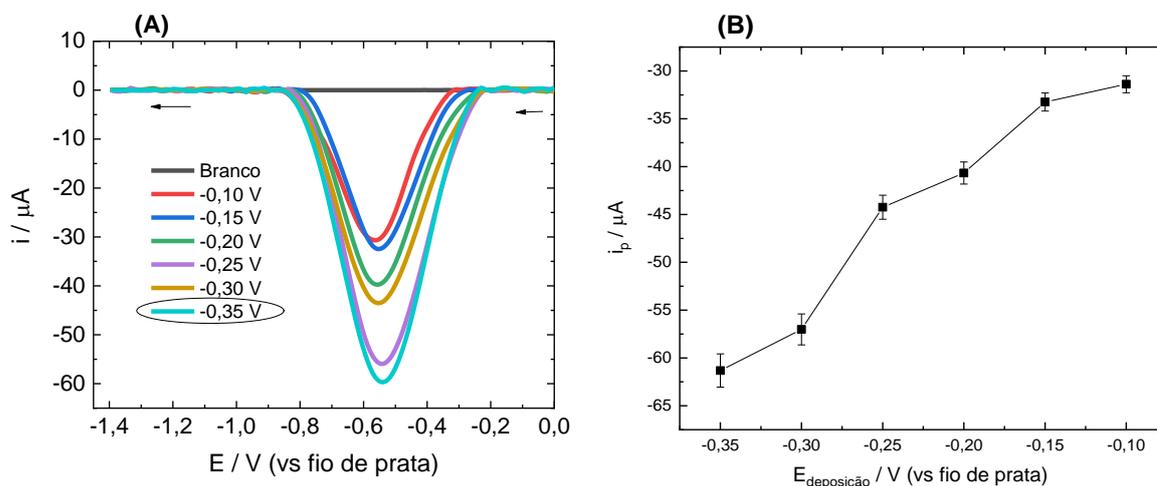


Figura 27. (A) voltamograma de onda quadrada do potencial de deposição variando de 0,0 V à -0,35 V; (b) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do potencial de deposição ($n = 3$ medidas). **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,008 V; tempo de deposição = 30 s.

O **tempo de deposição** foi estudado na faixa de 10 a 60 s (**Figura 28**), e a corrente de pico em função do potencial de deposição não demonstrou uma dependência linear. O valor ótimo escolhido foi 60 s, pois foi o que apresentou o maior valor de corrente.

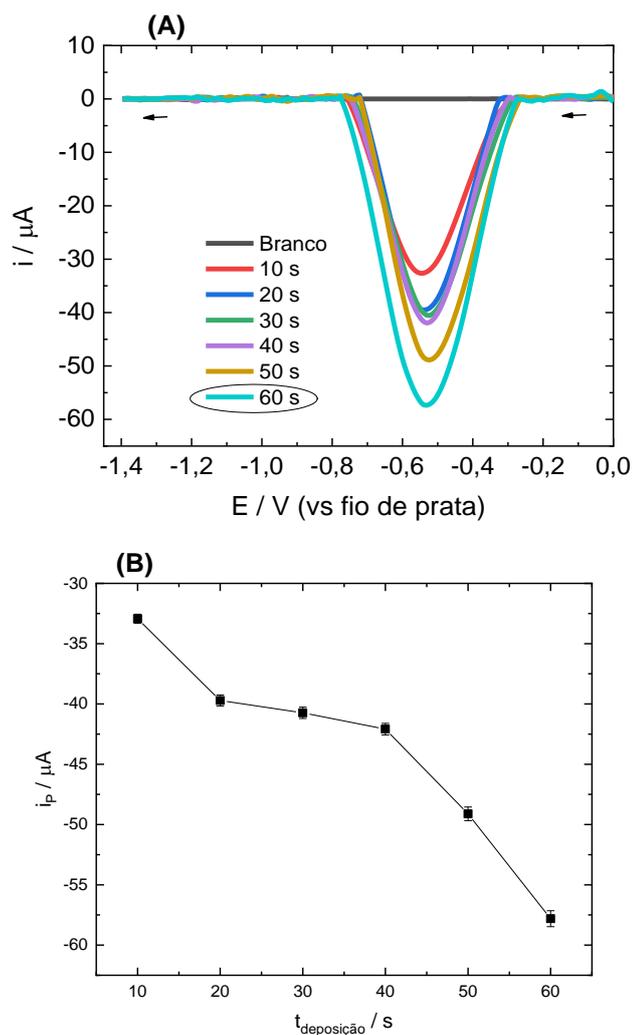


Figura 28. (A) voltamograma de onda quadrada do tempo de deposição variando de 10 s à 60 s; (B) correntes de pico da redução da bromadiolona em função do potencial de deposição ($n = 3$ medidas). **Parâmetros utilizados:** Solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; bromadiolona 10 μM ; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,008 V; Potencial de deposição = -0,35 V.

Após a realização de todos os experimentos de otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada, os valores obtidos foram dispostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada.

| Parâmetro | Condições investigadas | Valor otimizado |
|----------------|------------------------|-----------------|
| Frequência | 10 a 60 Hz | 10 Hz |
| Step potential | 1 a 9 mV | 6 mV |
| Amplitude | 10 a 70 mV | 60 mV |

| | | |
|------------------------|-----------------|---------|
| Potencial de deposição | -0,10 a -0,35 V | -0,35 V |
| Tempo de deposição | 10 a 60 s | 60 s |

A **Figura 29**, apresenta a redução da bromadiolona utilizando eletrodo de grafite, por meio da voltametria de onda quadrada sob condições otimizadas. Observa-se que a bromadiolona apresenta um único pico de redução em $E_p = -0,64$ V.

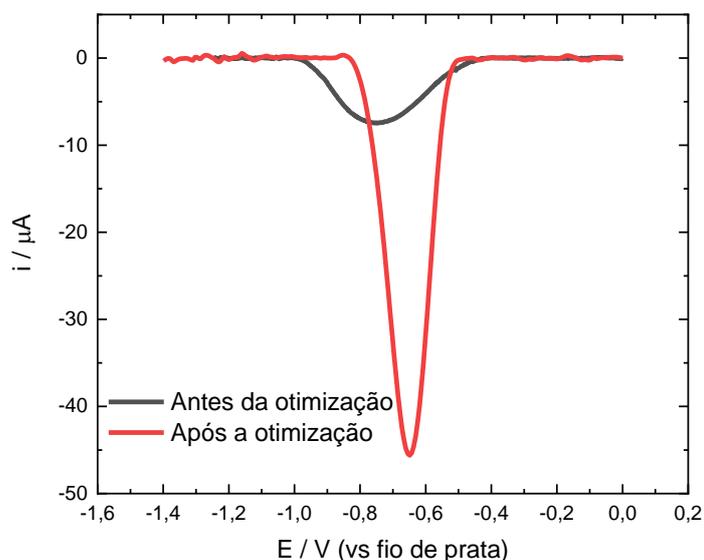


Figura 29. Voltamograma de onda quadrada da redução da bromadiolona ($10 \mu\text{M}$) antes da otimização dos parâmetros instrumentais (**curva preta**) e após otimização dos parâmetros instrumentais (**curva vermelha**). **Parâmetros antes da otimização:** step potential = $0,004$ V; amplitude = $0,03$ V; frequência = $12,50$ Hz; **Parâmetros após a otimização:** ver Tabela 1.

É possível notar que após a otimização dos parâmetros instrumentais, houve um ganho de corrente muito expressivo e o pico de redução da bromadiolona ficou menos alargado e mais definido. Comprovando assim o sucesso no processo de otimização dos parâmetros instrumentais.

5.4. Reprodutibilidade, repetibilidade e estabilidade

A repetibilidade da redução de bromadiolona ($10 \mu\text{M}$) sobre a superfície de grafite de lapiseira foi avaliada por meio de medidas repetidas ($n = 10$ medidas) utilizando o mesmo eletrodo, em solução tampão BR $0,05$ M pH $4,5$ (**Figura 30**). Para isso, entre cada uma das

medidas, retirou-se o eletrodo de trabalho da célula eletroquímica e fez-se uma lavagem com DMF para retirar o excesso de bromadiolona que possa ter sido impregnado na superfície do eletrodo de grafite, e posteriormente com água destilada. Após isso, inseriu-se o eletrodo novamente na célula eletroquímica para seguimento das medidas.

A corrente de pico foi avaliada e o desvio padrão relativo (DPR) obtido foi de 3,05 %. Isso sugere uma boa estabilidade para a resposta do eletrodo, e indica também que não foi observada diminuição significativa na atividade do eletrodo (passivação).

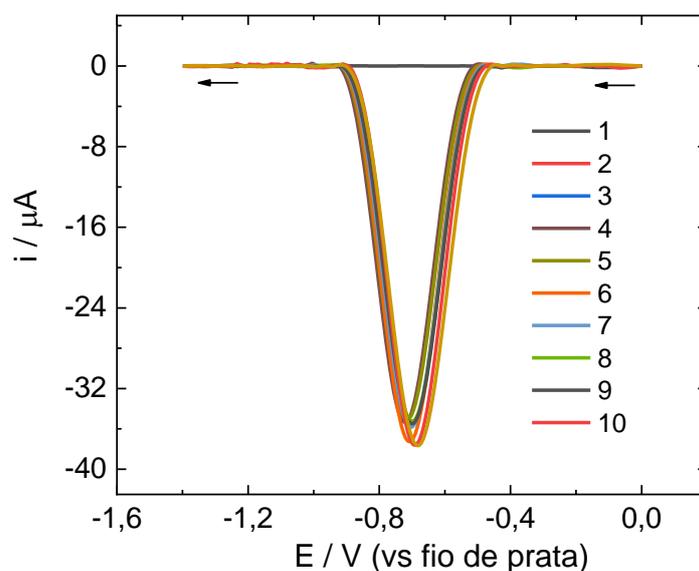


Figura 30. Voltamograma de onda quadrada do estudo da repetibilidade (n = 10 medidas). Concentração de bromadiolona: 10 μM ; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5.

A reprodutibilidade da redução de bromadiolona (10 μM) sobre a superfície de grafite de lapiseira foi avaliada por meio de medidas utilizando cinco eletrodos diferentes, em solução tampão BR 0,05 M pH 4,5 (**Figura 31**). O DPR obtido foi de 6,70 %.

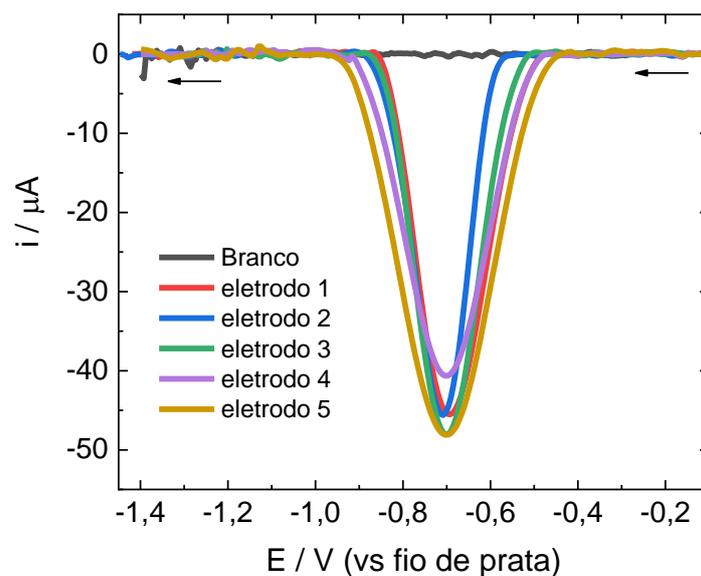


Figura 31. Voltamograma de onda quadrada do estudo da reprodutibilidade. Concentração de bromadiolona: 10 μM ; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5.

A estabilidade da bromadiolona foi avaliada durante 15 dias (**Figura 32**) utilizando o mesmo eletrodo de grafite, com a finalidade de verificar a evolução da degradação da molécula ao longo dos dias, para que se tenha uma noção de quantos dias tem-se entre a coleta de amostra e a análise da mesma em laboratório. Para realização deste estudo, a solução de bromadiolona foi armazenada na geladeira e vedada para que impurezas não entrassem em contato com a solução. Durante os dias, deixou-se que a solução chegasse em temperatura ambiente antes de ser feita a análise por meio da voltametria de onda quadrada. Após a análise, o eletrodo de trabalho era retirado da célula eletroquímica, enxaguado e guardado em um guardanapo, para a análise no dia seguinte. Repetiu-se este procedimento ao longo dos 15 dias.

Analisando os voltamogramas de onda quadrada obtidos, pode-se observar que a partir do sétimo dia, a bromadiolona começa a apresentar um segundo sinal de redução ($E_p = -0,97$ V), que pode ser oriundo de uma possível degradação. Porém, não há interferência deste segundo sinal sobre o pico principal, que aparece em aproximadamente - 0,64 V.

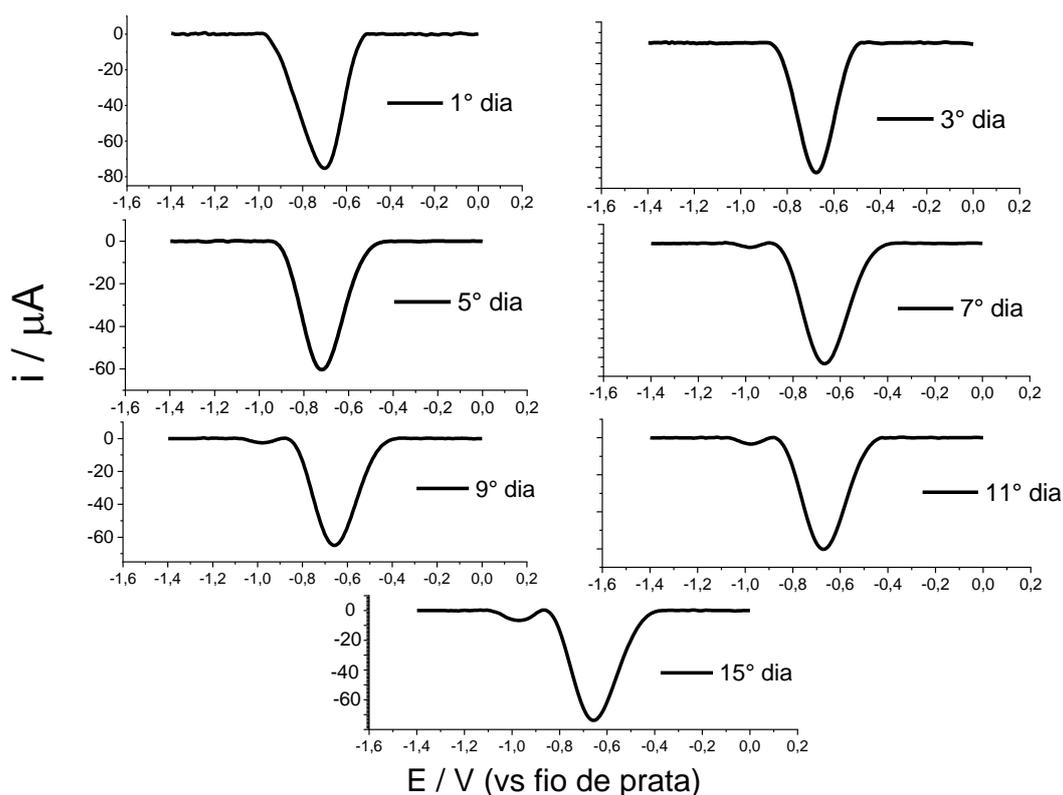


Figura 32. Estudo da estabilidade. Concentração de bromadiolona: 10 μM ; eletrólito: solução tampão BR 0,05 M pH 4,5.

5.5. Parâmetros analíticos e curva de calibração

Para determinar o limite de detecção (LD) utilizou-se o método experimental no qual a partir de uma concentração inicial de bromadiolona muito baixa, ia-se aumentando gradativamente até que algum sinal eletroquímico fosse observado e que pudesse ser diferenciado do branco da medida (**Figura 33**). O limite de detecção experimental encontrado foi de 0,5 nM (0,264 ng mL⁻¹). O limite de quantificação (LQ) foi obtido por meio da expressão (LQ = 3,3 × LD). Desta forma, o valor do LQ foi igual a 1,65 nM (0,8712 ng mL⁻¹).

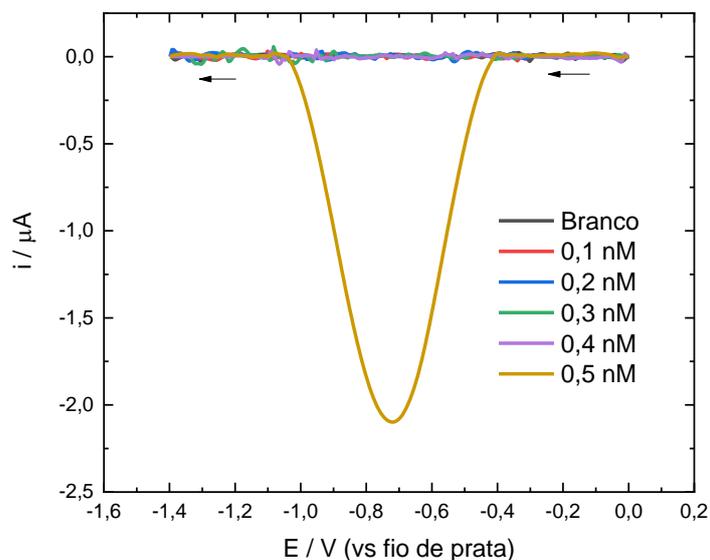


Figura 33. Estudo do limite de detecção experimental. Eletrólito: solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5.

Na literatura [15,20], o valor do LD é de 0,948 nM e 9,48 nM, respectivamente. Comparando o valor obtido no presente trabalho com o da literatura, nota-se que os valores encontrados no presente trabalho são menores que os da literatura, assim, a técnica proposta apresenta uma maior detectabilidade.

A construção da curva analítica foi realizada utilizando os parâmetros otimizados da VOQ, e padrões de bromadiolona na faixa de concentração de 1,65 nM até 100 nM. A **Figura 34** apresenta a curva obtida.

Para a curva analítica da **Figura 34**, obteve-se um R de 0,991, indicando uma boa linearidade, e conseqüentemente esta curva pode ser utilizada para determinação quantitativa de bromadiolona. A equação da curva de calibração está descrita abaixo (**Equação 6**):

$$I_p / A = -6,5814 * 10^{-6} (\pm 2,8582 * 10^{-7}) - 56,465 (\pm 4,4987) * C_{\text{Bromadiolona}}$$

$$R = 0,991$$

Equação 6: Equação da curva analítica.

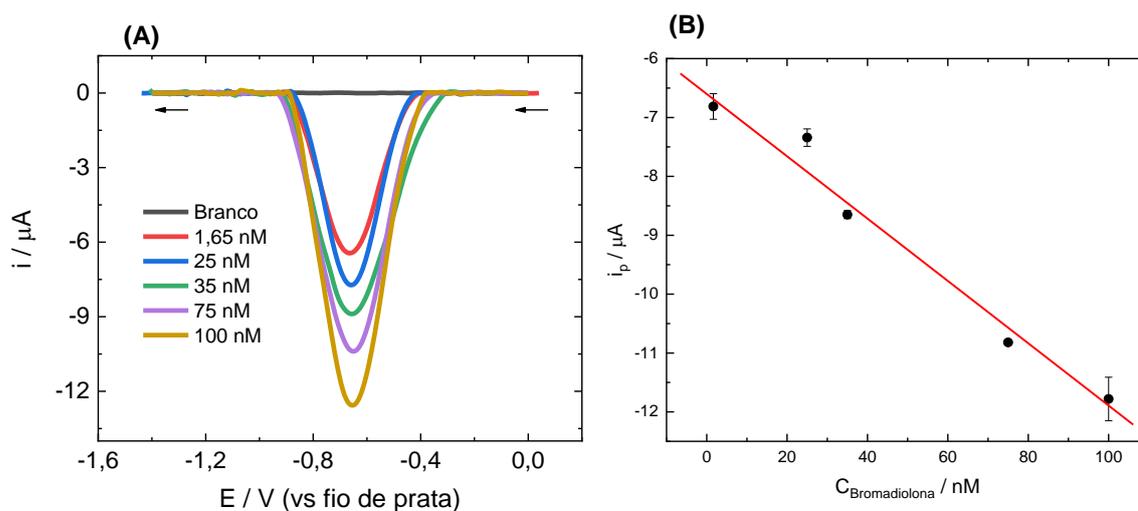


Figura 34. (A) voltamograma de onda quadrada obtido para a curva de calibração. (B) Curva de calibração construída com padrões de bromadiolona nas concentrações variando de 1,65 nM à 100 nM. ($R = 0,991$);

5.6. Avaliação da eficácia do preparo de amostra

Para avaliar se o preparo de amostra estava sendo eficaz, preparou-se duas soluções padrões de bromadiolona de concentração conhecida e as submeteu ao processo de preparo de amostra descrito na **Figura 15**, presente no procedimento experimental do presente trabalho. Este procedimento teve a finalidade de verificar se haveria perda de analito na etapa de preparo de amostra. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Quantificação do padrão de bromadiolona.

| | Concentração conhecida | Média da concentração recuperada (n = 3 medidas) | % Recuperação |
|-----------------|------------------------|--|---------------|
| Quantificação 1 | 19 nM | 17,73 nM \pm 0,7104 | 93,29 |
| Quantificação 2 | 62 nM | 60,89 nM \pm 0,6286 | 98,22 |

Analisando os dados da **Tabela 2**, é possível notar que o método após submeter os padrões ao procedimento de preparo de amostra, há uma perda de analito, porém esta perda é

muito pequena visto que ao compararmos o valor encontrado, com o valor inicial, chegamos a uma porcentagem de recuperação acima dos 90%. Tal fato indica que o método proposto pode ser empregado para determinações quantitativas de bromadiolona., visto que os valores de recuperação estão dentro dos valores esperados para métodos analíticos, que devem ser de 90 - 110% [62].

5.7. Análises em amostras reais

5.7.1. Determinação qualitativa

A polícia civil de Mato Grosso do Sul, apreendeu uma amostra de chocolate em pó, proveniente de crime, onde buscavam saber se havia ou não a presença de bromadiolona, visto que no local do crime foi encontrado um pacote do rodenticida. Para determinar a bromadiolona qualitativamente através do método proposto, a fim de comparação, escolheu-se duas marcas de chocolate em pó para o controle da medida. A **Figura 35** mostra os resultados obtidos.

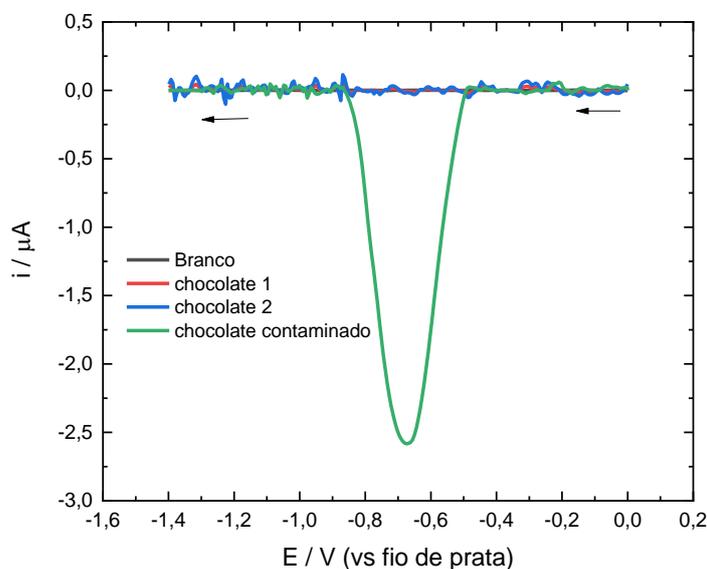


Figura 35. Determinação qualitativa de bromadiolona em chocolate obtido da polícia civil do Mato Grosso do Sul. **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = - 0,35 V; tempo de deposição = 60 s.

É possível observar que os chocolates controle não apresentaram nenhum pico de redução na faixa estudada, indicando que não são passíveis de interferências na redução da bromadiolona. Ao analisar o chocolate obtido da polícia civil, é possível notar que há o aparecimento de um pico de redução na região de $E_p = -0,68$ V, que é uma região característica de bromadiolona. Quando comparamos o sinal obtido, com os observados com os padrões de bromadiolona (**Figura 36**), é possível constatar que o sinal observado na amostra de chocolate contaminado trata-se de uma contaminação pelo raticida.

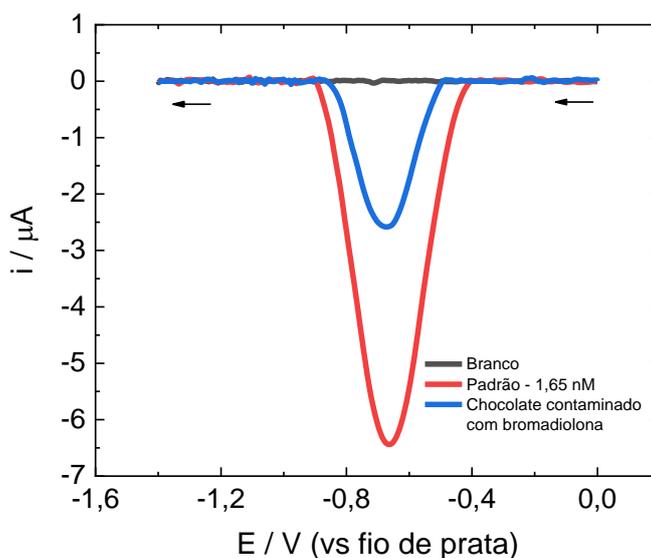


Figura 36. Comparação do sinal eletroquímico obtido para o chocolate contaminado e os padrões de bromadiolona. **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = -0,35 V; tempo de deposição = 60 s.

Assim, conclui-se que o método proposto pode ser empregado em triagens forenses, visando diferenciar produtos e saber se determinada amostra apresenta contaminação com bromadiolona.

5.7.2. Determinação quantitativa

Para a determinação quantitativa de bromadiolona pelo método proposto, obteve-se duas amostras comerciais de bromadiolona, que foram adquiridas localmente. A **Figura 37** apresenta os resultados obtidos.

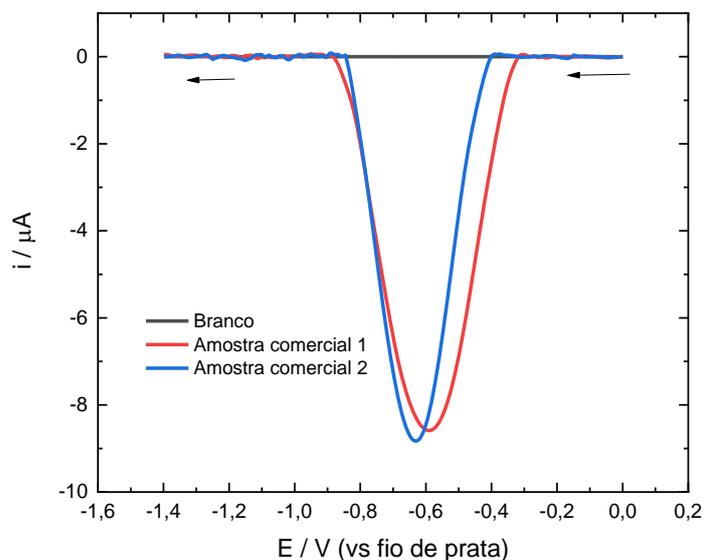


Figura 37. Determinação quantitativa de bromadiolona em amostras comerciais. **Parâmetros utilizados:** solução tampão BR 0,05 M, pH 4,5; amplitude = 0,06 V; frequência = 10 Hz; step potential = 0,006 V; potencial de deposição = -0,35 V; tempo de deposição = 60 s.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e utilizando-se as médias dos valores obtidos para a corrente de pico, e aplicando na equação da curva de calibração, podemos verificar a quantidade real de bromadiolona presente em cada amostra. Conforme é descrito na **Tabela 3:**

Tabela 3. Quantificação de bromadiolona em amostras comerciais.

| | % Bromadiolona na embalagem | % Bromadiolona encontrada (n = 3 medidas) | % Recuperação sobre o valor da embalagem |
|---------------------|-----------------------------|---|--|
| Amostra comercial 1 | 0,00500 % p/p | 0,00360 % ± 0,000162 | 72 % |
| Amostra comercial 2 | 0,00500 % p/p | 0,00390 % ± 0,000164 | 78 % |

Ambas as amostras comerciais apresentaram uma porcentagem de recuperação acima de 70%, indicando que o método proposto pode ser utilizado em controle de qualidade. O valor de recuperação em torno de 70% pode ser devido ao fato da amostra não ser totalmente

homogênea. Além disso, pode ter havido uma perda parcial no procedimento de preparo da amostra.

Porém, comparando os valores obtidos para as amostras comerciais, e os valores obtidos para os padrões, podemos notar que as concentrações do padrão ficaram acima dos 90%, o que indica que o baixo rendimento encontrado para as amostras comerciais esteja relacionado provavelmente à não homogeneidade das amostras.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, é reportado pela primeira vez o estudo eletroquímico da bromadiolona por meio da sua redução eletroquímica, bem como o desenvolvimento de um método analítico para detecção do raticida em amostras forenses e de produtos comerciais utilizando uma célula estacionária e eletrodos de grafite de lapiseira.

A metodologia proposta apresenta baixo custo, e ambientalmente amigável, o que está de acordo com os princípios de Química verde, visto que uma quantidade muito baixa de amostra é utilizada. Além disso, o método proposto pode ser miniaturizado visando aplicações em campo.

A voltametria cíclica foi utilizada para caracterizar eletroquimicamente a bromadiolona, e os dados experimentais mostraram que esta apresenta uma redução irreversível, frente ao eletrodo de grafite. Além disso, os processos de transporte de massa foram caracterizados por terem contribuições de difusão, o que indica que a espécie eletroativa migra do seio da solução para a superfície do eletrodo.

Estudos de estabilidade indicaram que mesmo após 15 dias, ainda é possível quantificar a bromadiolona, o que é um bom resultado visto que em análises reais, o dia da coleta de amostra e o de análise do material geralmente são diferentes. Isso indica que o método permite tempo suficiente para a amostra chegar nos laboratórios de análise.

A metodologia proposta neste trabalho apresentou valores de limite de detecção e quantificação experimentais de 0,5 e 1,65 nM, respectivamente, que estão abaixo dos valores encontrados na literatura. O método permitiu identificar bromadiolona em amostra forense de chocolate em pó fornecida pela polícia civil de Mato Grosso do Sul, indicando que o método proposto pode ser aplicado em análises forenses. Além disso, a detecção quantitativa foi realizada em amostras comerciais, tendo como recuperação 72 e 78 %, indicando que a metodologia proposta pode ser empregada em controle de qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Britton-Davidian, T.J. Robinson, F. Veyrunes, Systematics and evolution of the African pygmy mice, subgenus *Nannomys*: A review, *Acta Oecologica*. 42 (2012) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2012.01.001>.
- [2] J.O. WOLFF, Social biology of rodents, *Integr Zool*. 2 (2007) 193–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2007.00062.x>.
- [3] E.A. Lacey, N.G. Solomon, SOCIAL BIOLOGY OF RODENTS: TRENDS, CHALLENGES, AND FUTURE DIRECTIONS, *J Mammal*. 84 (2003) 1135–1140. <https://doi.org/10.1644/BLe-016>.
- [4] D. Tsakiris, L. Scudder, K. Hodivala-Dilke, R. Hynes, B. Coller, Hemostasis in the Mouse (*Mus musculus*): A Review, *Thromb Haemost*. 81 (1999) 177–188. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1614439>.
- [5] N. Garg, N. Singla, V. Jindal, B.K. Babbar, Studies on bromadiolone resistance in *Rattus* populations from Punjab, India, *Pestic Biochem Physiol*. 139 (2017) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.005>.
- [6] S. Endepols, N. Klemann, J. Jacob, A.P. Buckle, Resistance tests and field trials with bromadiolone for the control of Norway rats (*Rattus norvegicus*) on farms in Westphalia, Germany, *Pest Manag Sci*. 68 (2012) 348–354. <https://doi.org/10.1002/ps.2268>.
- [7] BRASIL, Manual de controle integrado de pragas, PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS, CAMPINAS, 2006.
- [8] A.M. PEREIRA, Principais doenças dos camundongos, ratos e hamsters, in: *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2002: pp. 127–137.
- [9] BRASIL, Manual de controle de roedores, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, BRASÍLIA, 2002.
- [10] BRASIL, Manual de saneamento, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, BRASÍLIA, 2006.
- [11] V.L.T. SAVOY, R.D.C.B. PRISCO, E. VIEIRA, L.C. LUCHINI, Avaliação da degradação do bromadiolona formulado como bloco parafinado e como pélete após exposição ambiental, *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e Da Saúde*. 7 (2011).
- [12] A.I.F. GALLARDO, F.G. LIZANA, W.T. GUTIERREZ, Intoxicaciones con rodenticidas superwarfarínicos, *Acta Toxicológica Argentina*. 23 (2015) 44–52.

- [13] D.G. Nosal, D.L. Feinstein, L. Chen, R.B. van Breemen, Separation and quantification of superwarfarin rodenticide diastereomers—Bromadiolone, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum, and difethialone—in human plasma, *J AOAC Int.* 103 (2021) 770–778. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa007>.
- [14] M.J. Murphy, Anticoagulant Rodenticides, in: *Veterinary Toxicology*, Elsevier, 2018: pp. 583–612. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00046-5>.
- [15] M. Beklova, S. Krizkova, V. Supalkova, R. Mikelova, V. Adam, J. Pikula, R. Kizek, Determination of bromadiolone in pheasants and foxes by differential pulse voltammetry, *Int J Environ Anal Chem.* 87 (2007) 459–469. <https://doi.org/10.1080/03067310601170472>.
- [16] S. Deepa, A.K. Mishra, Fluorescence spectroscopic study of serum albumin-bromadiolone interaction: Fluorimetric determination of bromadiolone, *J Pharm Biomed Anal.* 38 (2005) 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.023>.
- [17] M. Elmeros, R. Bossi, T.K. Christensen, L.J. Kjær, P. Lassen, C.J. Topping, Exposure of non-target small mammals to anticoagulant rodenticide during chemical rodent control operations, *Environmental Science and Pollution Research.* 26 (2019) 6133–6140. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04064-3>.
- [18] J. Martínez-Padilla, D. López-Idiáquez, J.J. López-Perea, R. Mateo, A. Paz, J. Viñuela, A negative association between bromadiolone exposure and nestling body condition in common kestrels: management implications for vole outbreaks, *Pest Manag Sci.* 73 (2017) 364–370. <https://doi.org/10.1002/ps.4435>.
- [19] H. Alomar, A. Chabert, M. Coeurdassier, D. Vey, P. Berny, Accumulation of anticoagulant rodenticides (chlorophacinone, bromadiolone and brodifacoum) in a non-target invertebrate, the slug, *Deroceras reticulatum*, *Science of The Total Environment.* 610–611 (2018) 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.117>.
- [20] S. Krizkova, M. Beklova, J. Pikula, V. Adam, A. Horna, R. Kizek, Hazards of secondary bromadiolone intoxications evaluated using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Sensors.* 7 (2007) 1270–1286. <https://doi.org/10.3390/s7071271>.
- [21] H. Yan, L. Zhu, X. Zhuo, M. Shen, P. Xiang, Anticoagulant rodenticide intoxication in east China: a three-year analysis, *Forensic Sci Res.* 1 (2016) 22–27. <https://doi.org/10.1080/20961790.2016.1242042>.
- [22] T. Grobosch, B. Angelow, L. Schonberg, D. Lampe, Acute Bromadiolone Intoxication, *J Anal Toxicol.* 30 (2006) 281–286. <https://doi.org/10.1093/jat/30.4.281>.

- [23] M. de F. Vilela, B.M. de Paula, Tentativa de autoextermínio por gestante com uso de Cumarínico/ Attempted self-extermination by pregnant woman using Coumarin, *Brazilian Journal of Health Review*. 4 (2021) 25070–25074. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n6-117>.
- [24] M.L.I. LEPINE, F.E. GONZALO, F.C. FERRER, E.G. TOUS, Intoxicación por rodenticidas superwarfarínicos en adultos: bromadiolona, brodifacoum y difetialona, *Emergencias*. 25 (2013) 201–203.
- [25] R. BINEV, P. PETKOV, A. RUSENOV, Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog, *Vet Arh*. 75 (2005) 273–282.
- [26] G.P. SALINAS, Bromadiolona: un caso judicial relacionado con la muerte de abejas, *Acta Toxicológica Argentina*. 19 (2011) 80–84.
- [27] T.C. PEIXOTO, V.A. NOGUEIRA, S.A. CALDAS, T.N. FRANÇA, B.L. ANJOS, A.P. ARAGÃO, P. v. PEIXOTO, Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), *Pesquisa Veterinária Brasileira*, . 32 (2012) 319–328.
- [28] J.F. GODINHO, A.C. MACHADO, A.M.F.O. LOURDES, B.T. DALBERTO, G.M. PEREIRA, J.S. SANTANA, J. BOTH, L.S. SANTOS, M.A.M. CASTANHEIRA, N.L. SILVA, *Tópicos especiais em físico-química: cinética e eletroquímica*, SAGAH, 2022.
- [29] T.L. BROWN, H.E.L. JR., B.E. BURSTEN, C.J. MURPHY, P.M. WOODWARD, M.W. STOLTZFUS, *Chemistry: the central science*, 13 Ed., Pearson, 2016.
- [30] M.L. Brusseau, J. Chorover, Chemical Processes Affecting Contaminant Transport and Fate, in: *Environmental and Pollution Science*, Elsevier, 2019: pp. 113–130. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814719-1.00008-2>.
- [31] M.G.O. JUNIOR, R.S. LAPA, J.R.C. SALGADO, J.L.C. CARMONA, Pilhas e baterias: relato científico nas principais descobertas para sua formação, *A Física Na Escola*. 18 (2020) 23.
- [32] M. TOLENTINO, R.C. ROCHA-FILHO, O bicentenário da invenção da pilha elétrica, *Química Nova Escola*. 11 (2000) 35–39.
- [33] L. HART, *Electrochemistry and electrochemical engineering: an introduction*, Library Press, New York, 2018.
- [34] J. WANG, *Analytical Electrochemistry*, 3 ed., John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [35] W.F. Pacheco, F.S. Semaan, V.G.K. de Almeida, A.G.S.L. Ritta, R.Q. Aucélio, Voltammetry: A brief review about concepts, *Revista Virtual de Química*. 5 (2013) 516–537. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>.

- [36] D.C. HARRIS, *Análise Química Quantitativa*, 8 ed, W. H. FREEMAN AND COMPANY, New York, 2012.
- [37] A.A.G.F. Beati, R.M. Reis, R.S. Rocha, M.R. v. Lanza, Development and Evaluation of a Pseudoreference Pt//Ag/AgCl Electrode for Electrochemical Systems, *Ind Eng Chem Res.* 51 (2012) 5367–5371. <https://doi.org/10.1021/ie2026025>.
- [38] E.T.S.G. da Silva, S. Miserere, L.T. Kubota, A. Merkoçi, Simple On-Plastic/Paper Inkjet-Printed Solid-State Ag/AgCl Pseudoreference Electrode, *Anal Chem.* 86 (2014) 10531–10534. <https://doi.org/10.1021/ac503029q>.
- [39] P.T. KISSINGER, W.R. HEINEMAN, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2 ed, CRC Press, 1996.
- [40] F. SCHOLZ, *Electroanalytical Methods*, 2 ed, Springer Science & Business Media, 2009.
- [41] D.A. SKOOG, F.J. HOLLER, T.A. NIEMAN, *Princípios de Análise Instrumental*, 5 ed, Bookman, 2006.
- [42] A.P.F. Turner, Biosensors, *Curr Opin Biotechnol.* 5 (1994) 49–53. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(05\)80069-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(05)80069-2).
- [43] Math. Ho, G. Cunningham, Analytical methods in forensic chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 5 (1986) X–XII. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(86\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0165-9936(86)90006-3).
- [44] W. Jin, G. Maduraiveeran, Electrochemical detection of chemical pollutants based on gold nanomaterials, *Trends in Environmental Analytical Chemistry.* 14 (2017) 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.05.001>.
- [45] M. Zhou, L. Han, D. Deng, Z. Zhang, H. He, L. Zhang, L. Luo, 4-mercaptobenzoic acid modified silver nanoparticles-enhanced electrochemical sensor for highly sensitive detection of Cu²⁺, *Sens Actuators B Chem.* 291 (2019) 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.060>.
- [46] M.D.S. Monteiro, J.C. dos Santos Júnior, E.M. Sussuchi, Electrochemistry: Modified electrodes and their potentialities, *Revista Virtual de Química.* 12 (2020) 1145–1160. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200092>.
- [47] A.J. BARD, L.R. FAULKNER, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2 ed, JOHN WILEY & SONS, INC., 2000.
- [48] M.F.C.G. da SILVA, Voltametria Cíclica: aplicações ao estudo de mecanismos de reacções induzidas por transferência electrónica, *Técnicas Experimentais.* 70 (1998) 20–6.

- [49] D.J.E. da COSTA, Metomil: investigação eletroquímica e desenvolvimento de metodologias voltamétricas usando eletrodo de diamante dopado com boro, Universidade Federal Da Paraíba. (2013).
- [50] L. Manoel Aleixo, VOLTAMETRIA: CONCEITOS E TÉCNICAS, n.d.
- [51] L. Silva, Desenvolvimento de métodos eletroquímicos de análise empregando papel pirolisado como eletrodo de trabalho, Universidade Federal de Uberlândia, 2017. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.540>.
- [52] Annu, S. Sharma, R. Jain, A.N. Raja, Review—Pencil Graphite Electrode: An Emerging Sensing Material, *J Electrochem Soc.* 167 (2020) 037501. <https://doi.org/10.1149/2.0012003JES>.
- [53] Md.R. Akanda, M. Sohail, Md.A. Aziz, A.-N. Kawde, Recent Advances in Nanomaterial-Modified Pencil Graphite Electrodes for Electroanalysis, *Electroanalysis*. 28 (2016) 408–424. <https://doi.org/10.1002/elan.201500374>.
- [54] Á. Torrinha, C.G. Amorim, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, Biosensing based on pencil graphite electrodes, *Talanta*. 190 (2018) 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.086>.
- [55] M.S. Vishwanath, B.E.K. Swamy, K.A. Vishnumurthy, Electrochemical detection of bisphenol A in presence of catechol and hydroquinone at copper oxide modified carbon paste electrode, *Mater Chem Phys.* 289 (2022) 126443. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126443>.
- [56] P. Murugan, R.D. Nagarajan, A.K. Sundramoorthy, D. Ganapathy, R. Atchudan, D. Nallaswamy, A. Khosla, Electrochemical Detection of H₂O₂ Using an Activated Glassy Carbon Electrode, *ECS Sensors Plus*. 1 (2022) 034401. <https://doi.org/10.1149/2754-2726/ac7c78>.
- [57] S.N. Kim, J.F. Rusling, F. Papadimitrakopoulos, Carbon Nanotubes for Electronic and Electrochemical Detection of Biomolecules, *Advanced Materials*. 19 (2007) 3214–3228. <https://doi.org/10.1002/adma.200700665>.
- [58] Y. Wei, L. Yao, Y. Wu, X. Liu, J. Feng, J. Ding, K. Li, Q. He, Ultrasensitive electrochemical detection for nanomolarity Acyclovir at ferrous molybdate nanorods and graphene oxide composited glassy carbon electrode, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 641 (2022) 128601. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128601>.

- [59] J.M. Petroni, B.G. Lucca, V.S. Ferreira, Simple approach for the fabrication of screen-printed carbon-based electrode for amperometric detection on microchip electrophoresis, *Anal Chim Acta*. 954 (2017) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.027>.
- [60] I.G. David, D.-E. Popa, M. Buleandra, Pencil Graphite Electrodes: A Versatile Tool in Electroanalysis, *J Anal Methods Chem.* 2017 (2017) 1–22. <https://doi.org/10.1155/2017/1905968>.
- [61] L.-H. Wang, H.-H. Liu, Electrochemical Reduction of Coumarins at a Film-Modified Electrode and Determination of Their Levels in Essential Oils and Traditional Chinese Herbal Medicines, *Molecules*. 14 (2009) 3538–3550. <https://doi.org/10.3390/molecules14093538>.
- [62] BRASIL, ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, (2011).