

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a  
determinação de fármacos em formulações farmacêuticas  
e fluidos biológicos empregando sensores à base de  
carbon black**

**Laís Pereira Silva\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de MESTRE EM  
QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA  
ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho**

**\* Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS**

**2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lais Pereira Silva, realizada em 28/02/2019:

---

Prof. Dr. Oriando Fatibello Filho  
UFSCar

---

Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro  
IQSC/USP

---

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes  
UFSCar

*Dedico este trabalho,  
aos meus pais, Maria de Fátima e Jovanildo, símbolo de esperança, por  
jamais medirem esforços e sacrifícios para que eu pudesse chegar até aqui.*

*À minha irmã Larissa,  
pelo incentivo, conselho e momentos de alegria.*

*Amo vocês!!*

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

*Leonardo da Vinci*

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas  
se quiser conhecer as borboletas”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus, pois Nele encontrei força para superar todas as dificuldades;

À minha mãe, Maria de Fátima, meu pai, Jovanildo e minha irmã, Larissa, por deixarem a porta aberta para que eu escolhesse o caminho e por sempre me apoiar em minhas decisões, com muito amor e paciência. Não há palavras para expressar o quanto sou grata;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela oportunidade, orientação, incentivo, amizade, paciência e inspiração de crescimento profissional;

Ao mestre Tiago Almeida Silva por toda paciência, prontidão em sempre me ajudar nas etapas experimentais, discussão de resultados e amizade;

À mestre Patricia Batista Deroco pela amizade, paciência, ajuda durante minha jornada no laboratório, conselhos e momentos de diversão;

Aos amigos do LABBES e LABIE: Patrícia, Amanda, Fernando Lindo, Tiago Almeida, Tiago Prado, Geiser, Anderson, Elson, Bruna, Ademar, Marina, Fernando (Codorna), Maria Fernanda, Thatyara, Taísa, Camila Peverari, Camila Proença, Thássia, Benedito e Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes pelo apoio e horas de discussões;

Aos meus amigos de pós-graduação: Amanda, Herisson, Lorrany e Gustavo pela ajuda durante as disciplinas e momentos de alegria;

A todos os meus familiares, principalmente minha avó, que mesmo longe nunca deixaram de me ajudar e incentivar a estudar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química e Professores da UFSCar por fornecer todo o suporte necessário para o meu bom desenvolvimento acadêmico;

Aos órgãos de fomento: CAPES, FAPESP e principalmente CNPq pelos anos de bolsa de mestrado concedida. O presente trabalho foi realizado com

apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

---

---

*Lista de Abreviaturas e Símbolos*

<i>a</i>	amplitude de pulso de potencial
A	Ampère (unidade de corrente)
A	área eletroativa
[ ]	concentração
AuNPs	nanopartículas de ouro
BR	tampão Britton-Robinson
CB	carbon black
CTO	cetoconazol
CTS	quitosana (do inglês: <i>chitosan</i> )
CB-CTS-EPC/GCE	eletrodo de carbono vítreo modificado com carbono black, quitosana e epicloridrina
CB-CTS-AuNPs/GCE	eletrodo de carbono vítreo modificado com carbono black, quitosa e nanopartículas de ouro
CV	voltametria cíclica (do inglês: <i>cyclic voltammetry</i> )
D	coeficiente de difusão
DPV	voltametria de pulso diferencial (do inglês: <i>differential pulse voltammetry</i> )
XRD	difração de raios-x (do inglês: <i>x-ray diffraction</i> )
$\Delta E$	diferença de potencial
$\Delta E_p$	diferença de potencial de pico
$\Delta E_s$	incremento de varredura
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: <i>electrochemical impedance spectroscopy</i> )
EPC	epicloridrina (do inglês <i>epichlorohydrin</i> )
<i>f</i>	frequência de aplicação de pulso
<i>F</i>	constante de Faraday (96485 C / equivalente)

---

---

GCE	eletrodo de carbono vítreo (do inglês: <i>glassy carbon electrode</i> )
$I$	corrente
$I_p$	corrente de pico
$k^0$	constante heterogênea de transferência de elétrons
LD	limite de detecção
LOS	losartana potássica
SEM	microscopia eletrônica de varredura (do inglês: <i>scanning electron microscopy</i> )
$n$	número de elétrons
NPs	nanopartículas metálicas
pH	concentração hidrogeniônica
$r$	coeficiente de correlação
$R$	constante universal dos gases perfeitos ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
RSD	desvio padrão relativo (do inglês: <i>relative standard deviation</i> )
SD	desvio padrão (do inglês: <i>standard deviation</i> )
SWV	voltametria de onda quadrada (do inglês: <i>square-wave voltammetry</i> )
$\nu$	velocidade de varredura de potenciais
vs.	<i>versus</i>

---

---

*Lista de Tabelas*

TABELA 4.1 - Valores de resistência de transferência de carga e constante de transferência heterogênea de elétrons. ....	31
TABELA 4.2 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica em função de $v^{1/2}$ .....	33
TABELA 4.3 - Estudo de repetibilidade intra e inter-dias para diferentes concentrações de LOS .....	42
TABELA 4.4 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de LOS a um nível de concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .....	43
TABELA 4.5 - Determinação de LOS em três amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n = 3) .....	44
TABELA 4.6 - Determinação de LOS em amostra sintética de urina e soro humano .....	45
TABELA 4.7 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica em função de $v^{1/2}$ .....	50
TABELA 4.8 - Parâmetros experimentais estudados para a técnica de SWV e os respectivos valores selecionados para a determinação de CTO.....	57
TABELA 4.9 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura.....	59
TABELA 4.10 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de CTO a um nível de concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .....	61
TABELA 4.11 - Determinação de CTO em duas amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n = 3) .....	62
TABELA 4.12 - Determinação de CTO em amostra sintética de urina e soro humano .....	62

### *Lista de Figuras*

FIGURA 1.1 - Estrutura de compostos de carbono.....	3
FIGURA 1.2 - Representação Esquemática da morfologia do CB, adaptada da referência 19.....	5
FIGURA 1.3 - Esquema das rotas de síntese <i>Top down</i> e <i>Bottom up</i> para obtenção de NPs, adaptada da referência 34. ....	8
FIGURA 1.4 – Representação idealizada simplificada da cadeia de CTS. ....	11
FIGURA 1.5 - Reação de reticulação da CTS com EPC.....	11
FIGURA 1.6 - Fórmula estrutural da LOS.....	13
FIGURA 1.7 – Fórmula estrutural do CTO. ....	15
FIGURA 3.1 - Esquema geral de montagem do eletrodo de trabalho de CB–CTS–EPC/GCE. ....	21
FIGURA 3.2 - Esquema geral de montagem do eletrodo de trabalho CB–CTS–AuNPs /GCE. ....	23
FIGURA 4.1 - Imagens obtidas por SEM do GCE (a) e CB–CTS–EPC/GCE (b). ....	28
FIGURA 4.2 - Voltamogramas cíclicos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o GCE (–) e CB–CTS–EPC/GCE (–); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	29
FIGURA 4.3 - Diagramas de Nyquist obtidos para CB–CTS–EPC/GCE (■) e GCE (●). As medidas foram realizadas em presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em uma faixa de frequência de 0,01 Hz a 100 kHz. ....	30
FIGURA 4.4 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ( $10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$ ) para o GCE e (b) CB–CTS–EPC/GCE em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . (c) Gráfico com o registro de $I_p$ vs. $\nu^{1/2}$ para correntes de pico anódica ( $I_a$ ) para GCE e CB–CTS–EPC/GCE. ....	32

FIGURA 4.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de LOS $1,96 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 3,0), empregando-se o GCE (–) e o CB–CTS–EPC/GCE (–). $\nu = 50$ mV s <sup>-1</sup> .....	34
FIGURA 4.6 - Voltamogramas cíclicos para solução de LOS $1,96 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> nos diferentes pHs (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0), empregando-se o CB–CTS–EPC/GCE. $\nu = 50$ mV s <sup>-1</sup> (a), $I_p$ vs. pH (b) e $E_p$ vs. pH (c).....	36
FIGURA 4.7 - Voltamogramas cíclicos para solução de LOS $1,96 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em tampão BR 0,04 mol L <sup>-1</sup> pH 2,0 (–) e tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> pH 2,0 (–). $\nu = 50$ mV s <sup>-1</sup> .....	37
FIGURA 4.8 - Voltamogramas cíclicos para (a) LOS $1,96 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 30, 50, 70, 100, 150 e 200 mV s <sup>-1</sup> ). Inserido: (b) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a LOS. Equação da reta: $\log I_p = -3,52 + 0,764 \log \nu$ [LOS].....	38
FIGURA 4.9 - Reação de oxidação da molécula de LOS. ....	40
FIGURA 4.10 - Voltamogramas de SW obtidos usando o CB–CTS–EPC/GCE para diferentes concentrações de LOS em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,0): (0) 0,0 (branco); (1) 4,97; (2) 9,99; (3) 14,8; (4) 19,6; (5) 29,1; (6) 38,6 e (7) 47,6 $\mu$ mol L <sup>-1</sup> . Parâmetros da SWV: $f = 10$ Hz, $a = 100$ mV, $\Delta E_s = 7$ mV. Inserido: Curva analítica ( $I_p$ vs. [LOS]). ....	41
FIGURA 4.11 - Imagens obtidas por SEM do CB–CTS/GCE (a) e (b) e CB–CTS–AuNPs/GCE (c) e (d).....	46
FIGURA 4.12 - Espectro de difração de raio-x para a amostra de CB–CTS (–) e CB–CTS–AuNPs (–). ....	47
FIGURA 4.13 - Voltamogramas cíclicos para GCE (–), CB–CTS/GCE (–) e CB–CTS–AuNPs/GCE (–) em ácido sulfúrico 0,5 mol L <sup>-1</sup> . $\nu = 50$ mV s <sup>-1</sup> . ....	48
FIGURA 4.14 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 – 500 mV s <sup>-1</sup> ) para o eletrodo de GCE (b) CB–CTS/GCE e (c) CB–CTS–AuNPs/GCE em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> em KCl	

0,1 mol L <sup>-1</sup> . (d) Gráfico com o registro de $I_p$ vs. $v^{1/2}$ para correntes de pico anódica ( $I_a$ ) para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE.....	49
FIGURA 4.15 - Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 10) para o eletrodo de GCE (a), CB-CTS/GCE (b) e CB-CTS-AuNPs/GCE (c) na presença de CTO 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> . Comparação entre os três voltamogramas obtidos para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE (d). $v = 50$ mV s <sup>-1</sup> . “Branco” se refere ao voltamograma registrado para o tampão fosfato na ausência do composto CTO. ....	51
FIGURA 4.16 - Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> para solução de CTO 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> nos diferentes valores de pHs (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0), empregando-se o CB-CTS-AuNPs/GCE. $v = 50$ mV s <sup>-1</sup> (a), $I_p$ vs. pH (b) e $E_p$ vs. pH (c). ....	53
FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos para solução de CTO 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 9,0) (–), tampão BR 0,04 mol L <sup>-1</sup> pH 9,0 (–) e NaCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 9,0 (–). $v = 50$ mV s <sup>-1</sup> . ....	54
FIGURA 4.18 - Voltamogramas cíclicos para (a) CTO 1,0 × 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 9,0) para diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s <sup>-1</sup> ). Inserido: (b) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a CTO. Equação da reta: $\log I_p = - 3,90 + 0,521 \log v$ [CTO]. ....	56
FIGURA 4.19 - Voltamogramas de SW obtidos usando o CB-CTS-AuNPs/GCE para diferentes concentrações de CTO em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 9,0): (0) 0,0 (branco); (1) 0,100; (2) 0,299; (3) 0,497; (4) 0,794; (5) 1,19; (6) 1,57 e (7) 1,96; (8) 2,44 e (9) 2,91 μmol L <sup>-1</sup> . Parâmetros da SWV: $f = 10$ Hz, $a = 60$ mV, $\Delta E_s = 5$ mV. Inserido: Curva analítica ( $I_p$ vs. [CTO]). ....	58

### Resumo

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS EMPREGANDO SENSORES À BASE DE CARBON BLACK. Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos voltamétricos para a determinação de losartana potássica e cetoconazol empregando-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com carbon black. Inicialmente foi proposto um sensor utilizando carbon black, quitosana e epicloridrina e este foi empregado para a determinação do fármaco losartana potássica. Avaliou-se o comportamento deste fármaco utilizando a voltametria cíclica em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0), observando-se um pico de oxidação irreversível em 1,28 V. A voltametria de onda quadrada foi selecionada para a quantificação da losartana potássica em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos sintéticos, com os seguintes parâmetros avaliados: frequência, amplitude de pulso de potencial e incremento de varredura. Foi observada uma resposta linear no intervalo de concentrações de losartana potássica de  $4,97 \times 10^{-6}$  a  $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  representada pela equação de regressão linear:  $I_p (\mu\text{A}) = -6,04 \times 10^{-8} + 0,122 [\text{LOS}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ; com coeficiente de correlação linear,  $r = 0,990$  e limite de detecção de  $4,79 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O procedimento desenvolvido foi empregado com sucesso para a determinação de losartana potássica em amostras farmacêutica comerciais e os resultados obtidos foram comparados com o método de espectrofotometria UV-visível, sendo que não houve diferença estatística significativa entre os resultados, a um nível de confiança de 95%, segundo o teste t pareado. Além disso, a determinação deste fármaco também foi realizada em amostras de fluidos biológicos sintéticos, obtendo-se valores satisfatórios. A determinação de cetoconazol foi realizada utilizando-se um sensor com filme do compósito de carbon black, quitosana e nanopartículas de ouro. Utilizando-se a voltametria cíclica foi observado um pico de oxidação para a molécula de

cetoconazol em 0,65 V em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 10). A determinação deste fármaco foi realizada empregando-se a voltametria de onda quadrada, sendo os parâmetros da técnica previamente otimizados. A curva obtida foi linear no intervalo de concentração de cetoconazol de 1,00 × 10<sup>-7</sup> a 2,90 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, e obedeceu a seguinte equação de regressão linear:  $I_p (\mu\text{A}) = - 1,8 \times 10^{-8} + 3,6 [\text{CTO}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ;  $r = 0,999$ , sendo o LOD igual a 4,43 nmol L<sup>-1</sup>. Finalmente, o método proposto foi aplicado nas análises de amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas, sendo os valores obtidos comparados com àquele obtidos empregando-se o método espectrofotométrico.

*Abstract*

DEVELOPMENT OF ELETRONANALYTIC PROCEDURES FOR DETERMINATION OF DRUGS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND BIOLOGICAL FLUIDS USING SENSORS BASED ON CARBON BLACK. In this work, voltammetric methods for determination of losartan potassium and ketoconazole using an electrode modified with carbon black were developed. Originally, a sensor was constructed with carbon black, chitosan and epichlorohydrin. Then, it was used for the determination of losartan. The electrochemical behavior of the losartan was studied with cyclic voltammetry in 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 3.0), which presented an irreversible oxidation peak at a potential of 1.28 V. The square wave voltammetry technique was selected for the quantification of losartan in commercial pharmaceutical formulations and synthetic biological samples. The following parameters were evaluated: frequency, pulse amplitude and step potential. A linear response was observed in the concentration range from  $4.97 \times 10^{-6}$  to  $4.76 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> represented by the linear regression equation:  $I_p (\mu\text{A}) = - 6.04 \times 10^{-8} + 0.122 [\text{LOS}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ;  $r = 0.990$  and with a limit of detection of  $4.79 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. The method developed was successfully applied for the determination of losartan in pharmaceutical formulations and the comparison of these results to UV-visible spectrophotometry determination, do not presented significant difference at confidence level of 95% using a t-test student. In addition, the determination of losartan was performed in samples of synthetic biological fluids, with satisfactory results. The electrochemical behavior of the ketoconazole was performed through cyclic voltammetry using a glassy carbon electrode modified with carbon black, chitosan and gold nanoparticles in 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 10). An irreversible oxidation peak was observed at 0.65 V. The ketoconazole determination was developed using square wave voltammetry under optimized conditions. The obtained analytical curve was linear in the concentrations range

---

of ketoconazole, from  $1.00 \times 10^{-7}$  to  $2.90 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, according to the linear regression equation:  $I_p$  (μA) =  $-1,8 \times 10^{-8} + 3.6$  [CTO] (μmol L<sup>-1</sup>);  $r = 0.999$ , with a limit of detection of  $4.43 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. In addition, the voltammetric procedures were successfully applied in the ketoconazole determination in pharmaceutical formulations and synthetic biological samples with satisfactory results.

*Sumário*

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Considerações Gerais .....	1
1.2	Nanomateriais de Carbono .....	2
1.2.1	Carbon Black.....	4
1.2.2	Estrutura Morfológica do Carbon Black .....	4
1.2.3	Aplicações do Carbon Black.....	6
1.3	Nanopartículas Metálicas .....	7
1.4	Sensores à base de filmes .....	9
1.4.1	Quitosana .....	10
1.4.2	Epicloridrina.....	11
1.5	Anti-hipertensivos .....	12
1.5.1	Losartana Potássica .....	13
1.6	Antifúngicos.....	14
1.6.1	Cetoconazol.....	15
2	OBJETIVOS .....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	19
3.1	Reagentes e soluções .....	19
3.2	Instrumentação .....	20
3.3	Procedimentos .....	20
3.3.1	Preparação do eletrodo de trabalho CB-CTS-EPC/GCE .....	20
3.3.2	Preparação do eletrodo de trabalho CB-CTS-AuNPs/GCE .....	21
3.4	Procedimentos analíticos .....	23
3.4.1	Preparação das amostras de formulações farmacêuticas.....	24
3.4.2	Preparação das amostras biológicas sintéticas.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Caracterização morfológica e eletroquímica do CB-CTS-EPC/GCE ....	27

---

4.1.1	Caracterização Morfológica.....	27
4.1.2	Caracterização eletroquímica.....	28
4.2	Determinação voltamétrica de losartana potássica empregando CB–CTS–EPC/GCE .....	33
4.2.1	Comportamento eletroquímico da molécula de losartana potássica... 34	
4.2.2	Efeito do pH e do eletrólito suporte .....	35
4.2.3	Efeito da velocidade de varredura de potencial .....	37
4.2.4	Otimização dos parâmetros e curva analítica .....	40
4.2.5	Estudo de repetibilidade e possíveis interferentes .....	41
4.2.6	Determinação de losartana potássica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas .....	43
4.3	Caracterização morfológica e eletroquímica do CB–CTS–AuNPs/GCE 45	
4.3.1	Caracterização Morfológica.....	45
4.3.2	Caracterização eletroquímica.....	47
4.4	Determinação voltamétrica de cetoconazol utilizando o eletrodo de CB–CTS–AuNPs/GCE .....	50
4.4.1	Comportamento eletroquímico da molécula de cetoconazol .....	50
4.4.2	Efeito do pH e eletrólito suporte .....	52
4.4.3	Efeito da velocidade de varredura de potencial .....	55
4.4.4	Otimização do parâmetros e curva analítica .....	57
4.4.5	Estudo de repetibilidade e interferentes .....	60
4.4.6	Determinação de cetoconazol em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas .....	61
5	CONCLUSÕES .....	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

A eletroanalítica, também conhecida como eletroanálise, trata-se da união da química analítica e eletroquímica, onde relaciona-se o desenvolvimento, caracterização e aplicação de métodos de análise química utilizando os fenômenos eletroquímicos<sup>1</sup>. A eletroanalítica é uma poderosa ferramenta para os cientistas na resolução de problemas, além do entendimento de diversos processos eletroquímicos, fotoeletroquímicos e determinações analíticas<sup>1,2</sup>. O desempenho analítico dos métodos eletroanalíticos é completamente dependente do material eletródico empregado como eletrodo de trabalho, uma vez que as respostas obtidas são referentes às reações redox processadas na interface eletrodo/solução<sup>3,4</sup>. Assim, buscando-se uma maior aplicabilidade analítica e melhora na detectabilidade foram desenvolvidos os eletrodos modificados.

Os eletrodos modificados, também conhecido como sensores, são dispositivos que possibilitam a imobilização de espécies quimicamente ativas em sua superfície<sup>3</sup>. Ao realizar a modificação do eletrodo, geralmente isto confere ao sensor as características físico-químicas do agente modificador, tais como reatividade, seletividade, estabilidade, entre outras<sup>3</sup>. Neste contexto, a investigação de diferentes nanomateriais para serem imobilizados na superfície do eletrodo tem atraído grande interesse em eletroanalítica<sup>5,6</sup>. Dentre os diferentes tipos de agentes modificadores, destacam-se os materiais nanoestruturados (materiais em escala nanométrica) que têm proporcionado resultados bastante promissores quando aplicados para o desenvolvimento de novas arquiteturas de eletrodos<sup>7-10</sup>.

Os sensores são empregados juntamente com as técnicas eletroanalíticas, como por exemplo, a voltametria cíclica (CV, do inglês – *Cyclic Voltammetry*), voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês – *Square Wave Voltammetry*) e voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês – *Differential*

*Pulse Voltammetry*), podendo ser aplicadas em diferentes áreas como a medicina, biologia, bioquímica, química, entre outras<sup>11,12</sup>. Desta forma, a utilização de sensores eletroquímicos, despertam um grande interesse da comunidade científica, uma vez que podem proporcionar algumas vantagens, como por exemplo, menor tempo de análise, custo relativamente baixo, além da possibilidade de se obter baixos limites de detecção e alta sensibilidade empregando-se as técnicas de pulso. Ademais, muitas vezes não há necessidade de preparo laborioso das amostras.

## 1.2 Nanomateriais de Carbono

Nos últimos anos, materiais em escala nanométrica têm despertado um grande interesse, tanto na indústria, quanto na área acadêmica. A nanotecnologia tem se revelado como uma nova área do conhecimento científico multidisciplinar, pois engloba conceitos fundamentais de várias áreas diferentes, como a química, física, ciências dos materiais, bioquímica, entre outras. As propriedades dos materiais, são fortemente dependentes do tamanho das partículas deste material, ou seja, todas as propriedades óticas, magnéticas, elétricas, de transporte, catalíticas, etc<sup>7</sup>.

Para serem utilizados como agente modificador de eletrodo, os nanomateriais podem ser selecionados de acordo com a necessidade da aplicação, entretanto, o material empregado deve atender alguns dos seguintes requisitos, a saber: elevada área superficial, boa condutividade, alta estabilidade química e física e capacidade de aumentar a velocidade da transferência de elétrons. Dentre os tipos de materiais mais comumente empregados, destacam-se os materiais à base de carbono por apresentarem muitas dessas propriedades<sup>3,5</sup>.

O elemento carbono é amplamente distribuído na natureza, sendo a maior parte encontrado na forma de compostos. O carbono é destacado por possuir diversas formas que são conhecidas como formas alotrópicas, gerando assim diversos tipos de materiais os quais são compostos inteiramente de carbono, mas

possuem estruturas físicas e propriedades diferentes<sup>13,14</sup>, como por exemplo, o grafite, diamante, carbono, coque, fulerenos, dentre outras, sendo que estes possuem estrutura cristalina. Entretanto, também existem as formas de carbono amorfo com baixo grau de cristalinidade, dentre os quais se destacam o *Carbon Black* (CB) (ou negro de fumo), carvão e coque. Na FIGURA 1.1 são apresentadas algumas estruturas de compostos de carbono. Dentre os tipos de materiais carbonáceos encontrados, muitos estão sendo empregados na construção de sensores eletroquímicos com sucesso. Recentemente, o CB têm chamado a atenção como material modificador para a construção de sensores em decorrência das suas boas propriedades eletroquímicas e baixo custo quando comparado aos outros materiais carbonáceos geralmente utilizados<sup>15</sup>.

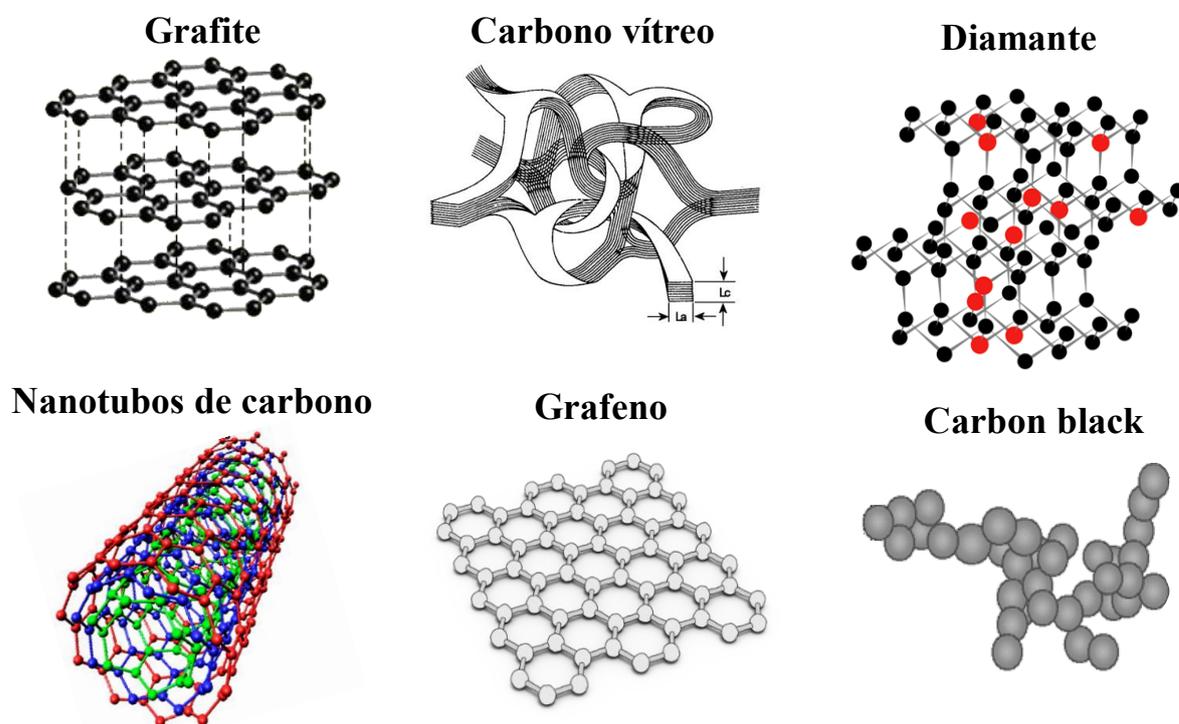


FIGURA 1.1 - Estrutura de compostos de carbono.

### 1.2.1 Carbon Black

O CB é um tipo de carbono amorfo, também conhecido como negro de fumo, produzido há muito tempo pela combustão parcial ou decomposição térmica de materiais que contêm derivados de carbono como, por exemplo, óleos, resinas e derivados do petróleo sob condições controladas e otimizadas<sup>16</sup>. O processo pelo qual o CB é produzido é semelhante ao que dá origem à fuligem de motores de combustão<sup>15</sup>. No entanto, os termos CB e fuligem são empregados de forma equivalente, enquanto a fuligem é um material indesejado, com propriedades e características muito variáveis, o CB possui especificações bem definidas, que podem ser reproduzidas pelo controle das condições dos processos de produção<sup>15,16</sup>.

A variação das condições e dos equipamentos utilizados para a produção de CB têm possibilitado obter uma grande variedade de CB, com características adequadas para diferentes aplicações industriais. Os processos mais comumente empregados são: negro de fumo de canal (*channel carbon black*) obtido da combustão direta de combustíveis fósseis, negro de fumo térmico (*thermal carbon black*) produzido pela combustão térmica do metano e finalmente o negro de fumo de forno (*furnance carbon black*) que usa como matéria-prima um óleo aromático (em geral resíduo de craqueamento catalítico de refinaria, e/ou material derivado do alcatrão da hulha), que é convertido em CB mediante a combustão parcial ou pirólise<sup>17</sup>.

O CB também possui grande atuação como agente reforçante em borrachas, além de ser aplicado na produção de papel, de material têxtil, revestimentos, de pigmento em tintas, de agente condutor, de catalisadores e de baterias<sup>18,19</sup>.

### 1.2.2 Estrutura Morfológica do Carbon Black

O CB pode ser definido como uma estrutura semi-grafítica, pois apresenta uma estrutura formada por camadas hexagonais paralelas, porém com

uma maior separação destas camadas do que a apresentada no grafite<sup>15</sup>. Grupos de três a quatro camadas hexagonais se agregam para formar cristalitos, estes por sua vez se combinam para formar a partícula primária de carbono. As partículas primárias possuem geometria esférica e diâmetros de aproximadamente 3 a 100 nm<sup>20</sup>. Estas nanopartículas agregam-se formando agregados de diferentes tamanhos e formas que podem variar de aproximadamente 30 a 1000 nm<sup>19</sup>. Quando muitos agregados se juntam acabam formando um aglomerado (~ 100 a 1000 μm)<sup>20</sup>, como mostrado na FIGURA 1.2.

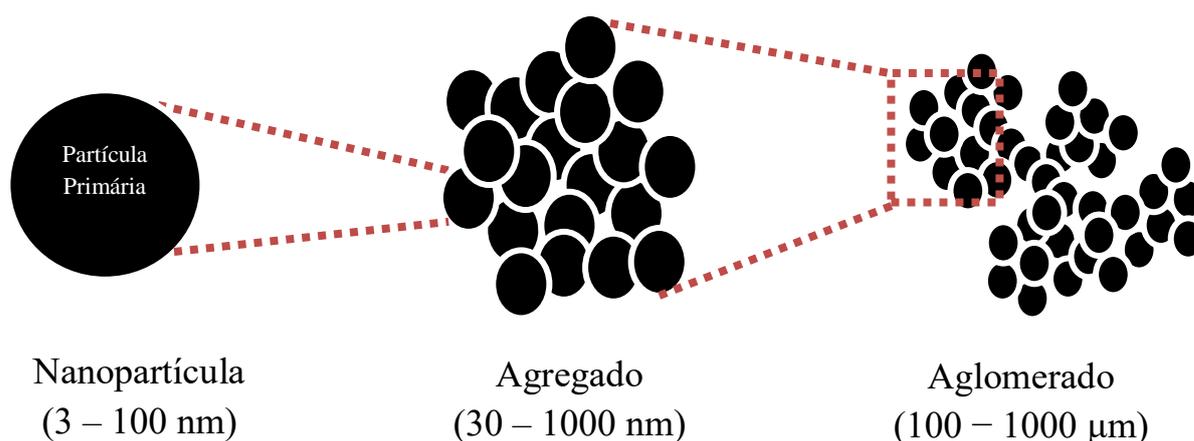


FIGURA 1.2 - Representação esquemática da morfologia do CB, adaptada da referência 19.

O CB é composto principalmente de carbono e hidrogênio, entretanto, pode-se encontrar em sua composição outros elementos como, enxofre, nitrogênio, oxigênio, dentre outros<sup>20</sup>. A proporção e a composição química na qual estes elementos são encontrados no CB difere de um material para outro, pois depende diretamente do processo de fabricação, bem como também, do tamanho das partículas primárias<sup>18,20</sup>. Assim, o CB é classificado principalmente com base em três propriedades: tamanho da partícula, estrutura e composição química<sup>20</sup>. O CB Vulcan VCX72R é produzido pelo método de decomposição térmica do metano cujas propriedades físicas e químicas são: área superficial de 241<sup>21</sup> m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, tamanho de partícula de 30–60<sup>22</sup> nm, número de Iodo

de 253<sup>23</sup> mg g<sup>-1</sup> (número de ligações insaturadas) e porcentagem de oxigênio 7,8<sup>9</sup> % wt.

### 1.2.3 Aplicações do Carbon Black

O CB é um dos materiais mais fabricados, todo ano aproximadamente 10 milhões de toneladas de CB são produzidas no mundo, sendo que 90% é destinado à indústria da borracha e os outros 10% têm sido explorados e aplicados em diferentes áreas<sup>15,16</sup>.

O CB é um material bastante atraente do ponto de vista eletroanalítico, devido às suas propriedades físico-químicas, pois apresenta alta área superficial, boa condutividade, estabilidade química e capacidade de produzir dispersões estáveis, dependendo do tipo de solvente, sem necessitar de procedimentos sofisticados<sup>24</sup>. Além disso, trata-se de um material de baixo custo (aproximadamente R\$ 4,00 reais o kg)<sup>15</sup>. Deste modo, o número de trabalhos relatados na literatura utilizando nanomateriais à base de CB para a preparação de sensores está crescendo nos últimos anos<sup>24-30</sup>.

Os primeiros trabalhos reportados utilizando CB como modificador para o desenvolvimento de sensor, em 2010, foi descrito por Arduini *et al.*<sup>31</sup>. Em um de seus trabalhos, os autores avaliaram o comportamento eletroquímico de um eletrodo construído com pasta de CB N220 empregando-se diferentes moléculas, tais como: hexacianoferrato (III) de potássio, hexacloroiridato (III) de sódio, cloreto de hexaamminerutênio (III), ácido ferroceno monocarboxílico, dopamina, epinefrina, dentre outras. Os resultados obtidos apresentaram deslocamentos dos potenciais de pico e/ou aumento da intensidade de correntes de pico quando comparados com o eletrodo de pasta de grafite (usado como eletrodo comparativo) demonstrando o efeito eletrocatalítico ao utilizar o CB como material modificador. Em seguida, o CB começou a ser empregado em diversos trabalhos para a construção de sensores e biosensores.

As propriedades eletroquímicas e morfológicas de três diferentes tipos de CB (VXC72R, BP4750 e E2000) também foram estudadas e avaliadas por Vicentini *et al.*<sup>24</sup> em diferentes dispersões poliméricas, empregando-se diferentes sondas eletroquímicas. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que o eletrodo modificado com CB VXC72R teve o melhor desempenho analítico, sendo então selecionado para trabalhos futuros de nosso grupo de pesquisa.

### 1.3 Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas (NPs) são denominadas como compostos constituídos por átomos ou moléculas que apresentam um tamanho reduzido, na faixa de 1 a 100 nm, sendo intermediário entre o átomo e o bulk<sup>32</sup>. Como discutido anteriormente, as propriedades físicas e químicas dos materiais estão fortemente relacionados ao tamanho de suas partículas, deste modo, espera-se que as propriedades ópticas, magnéticas, de transporte, eletroquímicas e catalíticas possam ser diferenciadas em relação ao mesmo material quando este se encontra na forma de sólido estendido, podendo assim ser aplicado em diversas áreas da tecnologia<sup>33-36</sup>. Existem diferentes métodos para produzir NPs, sendo a maioria voltada para a síntese química, mas ainda se tem os métodos físicos, irradiação e eletrodeposição.

De um modo geral, há duas estratégias principais para a obtenção de NPs. Os métodos físicos, chamados também de *Top down* em que se parte de um material na escala bulk, quebrando as partículas até chegar à escala nanométrica. A síntese química ou *Bottom up*, são reações em que os precursores são átomos<sup>37</sup>. Na FIGURA 1.3 são apresentadas as duas estratégias de preparação das NPs. A síntese química é a estratégia mais utilizada, uma vez que possibilita a obtenção de nanopartículas menores e com maior controle de tamanho e forma<sup>37</sup>.

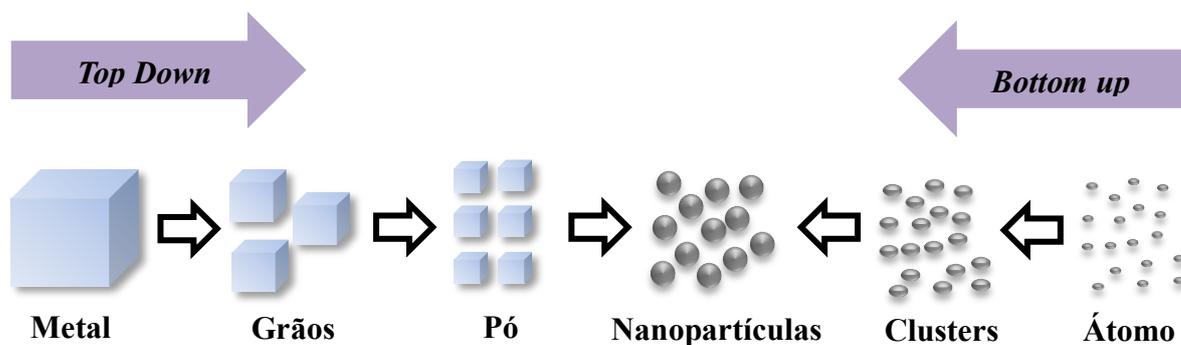


FIGURA 1.3 - Esquema das rotas de síntese *Top down* e *Bottom up* para obtenção de NPs, adaptada da referência 34.

Dentre os métodos químicos mais empregados para a síntese de nanopartículas, destacam-se o Método de Turkevich, também conhecido como Método do citrato e o Método de redução com borohidreto de sódio.

O Método de Turkevich<sup>38</sup> consiste na reação de óxido-redução, em meio aquoso, entre o citrato e o sal metálico, como por exemplo, o cloreto ácido de ouro (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ). Além do citrato podem ser empregados outros agentes redutores como o ácido ascórbico, por exemplo.

Outro método muito empregado para a síntese de nanopartículas metálicas é a redução com borohidreto de sódio<sup>38,39</sup>, neste caso ocorre uma reação de óxido-redução entre o borohidreto e o sal metálico. Esta síntese é considerada simples, rápida e reproduzível.

As nanopartículas metálicas têm sido cada vez mais empregadas na eletroanalítica para a construção de novos sensores, uma vez que podem proporcionar um aumento na estabilidade, maior sensibilidade, menor limite de detecção, efeito eletrocatalítico, diminuindo assim os efeitos de possíveis interferentes presentes nas amostras já que é permitido trabalhar em potenciais menores. Na literatura são apresentados diversos trabalhos que fazem o uso de nanopartículas metálicas para a modificação de eletrodos à base de carbono<sup>40-43</sup>.

Compton *et al.*<sup>44</sup> relataram uma melhora significativa na transferência de elétrons do sistema quando foram utilizadas nanopartículas de

ouro com dimensões reduzidas como modificador sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo.

Santos *et al.*<sup>45</sup> desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação simultânea de salbutamol e propranolol utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado, líquido iônico e nanopartículas de prata. O sensor proposto mostrou uma resposta linear de 79 nmol L<sup>-1</sup> a 2,9 μmol L<sup>-1</sup> para salbutamol e de 0,1 a 2,9 μmol L<sup>-1</sup> para propranolol com limites de detecção de 13 e 17 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente utilizando a SWV.

Zhao *et al.*<sup>46</sup> sintetizaram nanofolhas de óxido de grafeno reduzido modificadas com nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e *coresheel* Ag/Au para a determinação voltamétrica de arsênio (III). Os autores observaram um efeito sinérgico ao utilizar as nanopartículas metálicas e associaram este efeito ao bom desempenho do sensor para a determinação de traços de arsênio (III) da ordem de ppb em amostras reais de água.

## 1.4 Sensores à base de filmes

Os nanomateriais podem ser empregados como agentes modificadores em eletrodos convencionais e têm sido utilizados para a fabricação de pasta, compósitos ou de filmes. Existem diferentes métodos para a imobilização do agente modificador em um substrato, sendo os métodos mais usuais: adsorção, ligação covalente, recobrimento por secagem e a formação de filmes poliméricos<sup>47</sup>. A preparação de dispersões estáveis com diferentes tipos de nanomateriais para a formação de filmes poliméricos têm sido cada vez mais utilizadas para a modificação da superfície de diferentes tipos de eletrodo, como o de carbono vítreo (GCE: *Glassy carbon electrode*), carbono pirolítico ou de ouro. Este tipo de modificação é vantajoso, pois permite a construção de várias monocamadas da espécie química ativa na superfície do eletrodo, o que resulta no aumento da resposta analítica. Assim, algumas substâncias são empregadas para

o preparo dessas dispersões estáveis, como, por exemplo, quitosana<sup>48</sup>, dihexadecil hidrogenofosfato<sup>49</sup>, hidrocloreto de polialilamina<sup>50</sup>, entre outros.

### 1.4.1 Quitosana

A quitosana (CTS, do inglês *chitosan*) é um heteropolissacarídeo produzido a partir da reação de N-desacetilação da quitina, um biopolímero encontrado principalmente nas carapaças e exoesqueletos de crustáceos. A CTS apresenta na sua estrutura grupos amina ( $-\text{NH}_2$ ), hidroxila ( $-\text{OH}$ ) e acetamida ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) ligados diretamente ao anel heterocíclico, como apresentado na FIGURA 1.4. Este polissacarídeo tem um  $\text{pK}_a$  em torno de 6,5, sendo insolúvel em água, solventes orgânicos e em bases, entretanto é solúvel em meio ácido. Isto pode ser explicado, pois em meio ácido os grupos amino ficam protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ), conferindo à molécula um caráter catiônico e estas são solvatadas por moléculas de água e assim, solubilizando-a<sup>51</sup>.

A molécula de CTS apresenta diversos sítios reativos em sua estrutura, o que confere a este material versatilidade para modificações químicas, tais como N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, dentre outras. Além disso, pode-se fazer a reticulação das cadeias poliméricas da CTS que é um tipo de modificação com intuito de unir as cadeias poliméricas às de outros polímeros, gerando assim, uma rede polimérica híbrida. As reações de reticulação tem como objetivo modificar algumas propriedades do biopolímero, como por exemplo, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, capacidade de imobilização proteica, dentre outras<sup>51</sup>. Deste modo, são utilizados os agentes de reticulação que possuem grupos ativos capazes de fazer ligações inter ou intracadeias poliméricas. Dentre os tipos de agentes de reticulação empregados, pode-se citar: glutaraldeído, glioxal, etilenoglicol, epícloridrina, dentre outros<sup>51</sup>.

Assim, a CTS é capaz de formar dispersões estáveis com alguns nanomateriais para a construção de novos sensores e biossensores. Na literatura

são encontrados diferentes trabalhos<sup>52-56</sup> empregando a CTS como agente de dispersão para a formação de filmes poliméricos.

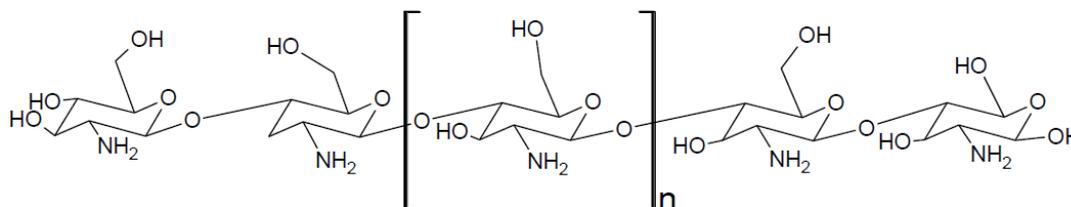


FIGURA 1.4 – Representação idealizada simplificada da cadeia de CTS.

## 1.4.2 Epicloridrina

A epicloridrina (EPC, do inglês: *epichlorohydrin*) é um epóxido organoclorado e forma ligações covalentes com os grupos hidroxila da CTS<sup>57</sup>. Na FIGURA 1.5 é apresentada a reação entre a EPC e CTS, que resulta na abertura do epóxido e saída do íon cloreto do monômero, assim uma molécula de EPC se liga à duas moléculas de CTS<sup>58,59</sup>. Este agente reticulante é muito empregado para a formação de filmes poliméricos, conferindo ao biopolímero formado resitência a meios fortemente ácidos, melhor estabilidade física e química e maior aderência do filme de CTS sobre superfícies<sup>51</sup>.

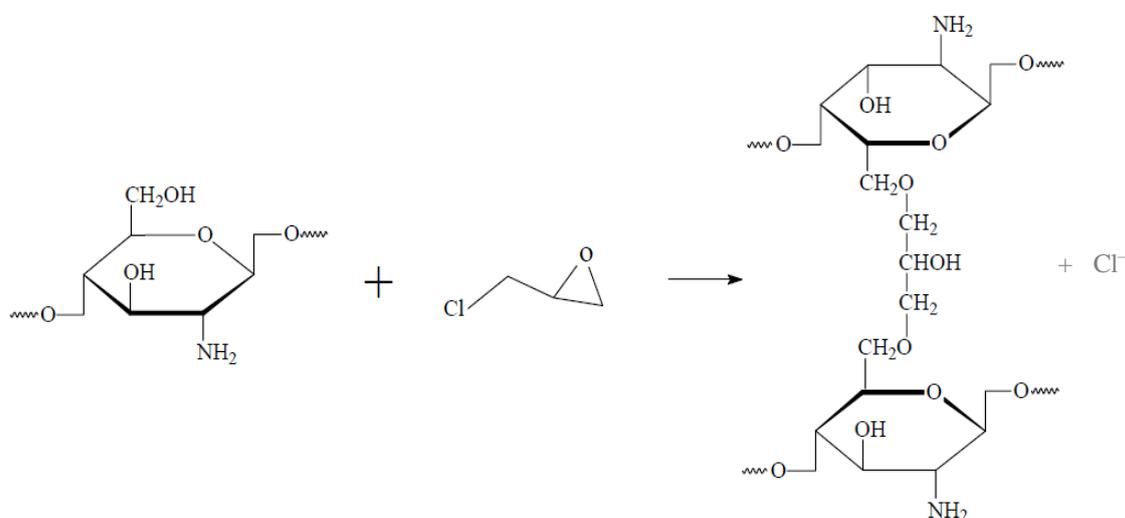


FIGURA 1.5 - Reação de reticulação da CTS com EPC.

## 1.5 Anti-hipertensivos

A hipertensão, comumente chamada de pressão alta, é uma doença crônica que ocorre devido à elevação da pressão arterial sistólica acima de 140 milímetros de mercúrio (mmHg) ou da pressão diastólica acima de 90 mmHg, ou 14 por 9. A elevação da pressão pode ser causada por vários fatores, entretanto principalmente porque os vasos onde há a circulação de sangue se contraem, assim o coração tem que exercer um esforço maior que o normal para que o sangue chegue corretamente aos outros órgãos. A hipertensão pode ocasionar diversos problemas no coração, rins, vasos sanguíneos e cérebro, sendo assim um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, renais e cerebrovasculares<sup>60</sup>.

Segundo o Ministério da Saúde, a prevalência da hipertensão passou de 22,6% em 2006 para 24,3% em 2017. A pressão alta tende a aumentar com a idade, chegando a 60,9% entre os adultos de 65 anos ou mais. A pressão alta é herdada dos pais em 90% dos casos, mas há diversos fatores que influenciam os níveis da pressão arterial, como os hábitos de vida de cada indivíduo<sup>61</sup>.

A hipertensão não tem cura, mas possui tratamento e pode ser controlada. Existem, basicamente, dois tipos de tratamento contra hipertensão arterial: sendo o primeiro baseado na modificação do estilo de vida, com incentivo a práticas de atividades físicas, alimentação saudável e o segundo baseado no tratamento com a utilização de medicamentos, neste caso, faz-se o uso de agentes anti-hipertensivos<sup>60-62</sup>.

Os tratamentos medicamentosos geralmente empregados para a doença consistem no uso sistemático de princípios ativos de forma isolada ou pela combinação sinérgica de fármacos de diferentes classes<sup>60,62</sup>.

### 1.5.1 Losartana Potássica

A losartana potássica (LOS) (FIGURA 1.6) é um composto sintético classificado, dentro dos anti-hipertensivos, como antagonista do receptor da angiotensina II. É muito empregada para o tratamento da doença, pois reduz o risco de acidentes cardiovasculares, cerebrais vasculares e além disso, oferece proteção renal para pacientes com proteinúria e diabetes tipo 2<sup>62,63</sup>.

Este fármaco é bastante eficaz via administração oral, sendo bem absorvida pelo trato gastrintestinal, passando por metabolismo de primeira passagem formando um metabólito de ácido carboxílico ativo e outros metabólitos inativos. Aproximadamente 4% da dose de LOS administrada via oral é excretada na forma inalterada na urina<sup>64</sup>.

Seu comportamento farmacocinético é linear, até a dose de 200 mg, ou seja há um aumento da concentração sérica proporcionalmente ao aumento da dose administrada<sup>64</sup>.

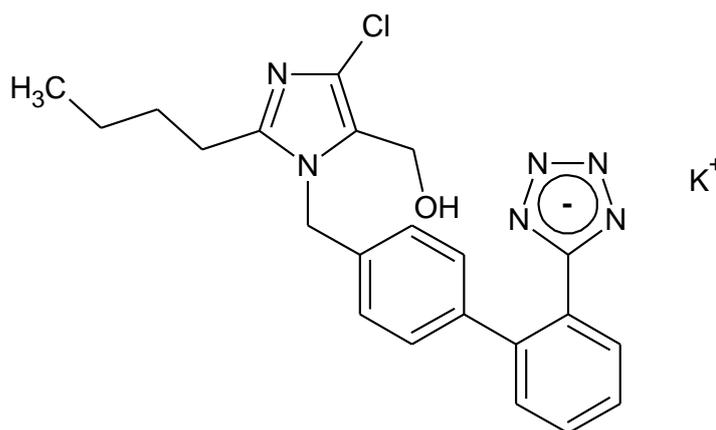


FIGURA 1.6 - Fórmula estrutural da LOS.

A LOS parece ser bem tolerada pelos pacientes, entretanto pode apresentar alguns efeitos colaterais adversos, como tontura, vertigem, insuficiência renal e hepática, hipercalcemia e não deve ser ingerido por grávidas<sup>64</sup>. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos para o controle deste fármaco em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos. A

maioria dos procedimentos descritos na literatura emprega as técnicas cromatográficas<sup>65-69</sup> e espectrofotométricas<sup>70-72</sup>. Porém, poucos métodos eletroquímicos são descritos na literatura para a determinação deste fármaco<sup>73-77</sup>.

Sartori *et al*<sup>75</sup>, desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês: *Boron-doped Diamond*). Para LOS, o limite de detecção obtido utilizando-se DPV foi de 95  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com uma curva analítica no intervalo de concentração linear de 3,0 a 74  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Srivastava *et al*<sup>74</sup>, utilizou um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocomposito de carbono e ferro (metalo-orgânico), empregando-se a DPV para determinação de LOS em amostras farmacêuticas. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de LOS de 0,009 a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de 2,03  $\text{nmol L}^{-1}$ .

## 1.6 Antifúngicos

Os fungos são microrganismos presentes em solo, ar, plantas, animais e detritos em geral. Os fungos podem apresentar diferentes morfologias dependendo das condições nutricionais e temperatura. Muitos destes microrganismos apresentam potencial patogênico para os seres humanos, ocasionando as chamadas micoses. As micoses são classificadas em micoses superficiais (pele, unhas e pêlos), micoses subcutâneas, micoses sistêmicas ou profundas<sup>78,79</sup>.

Nos últimos 20 anos tem aumentado drasticamente o número de indivíduos com infecções fúngicas sistêmicas. Os fungos se tornaram agressivos, ou seja, estão mais resistentes aos antifúngicos, se espalhando pelo organismo e causando infecções graves e fatais<sup>78,79</sup>.

No Brasil, cerca de 4 milhões de pessoas têm infecções fúngicas por ano. Desse total, 2,8 milhões são causadas por *Candida* e 1 milhão por

*Aspergillus*. Para complicar, o mesmo fungo pode ocasionar doenças diferentes, dependendo da capacidade de defesa do organismo, por exemplo, *Aspergillus* provoca dois tipos de pneumonia: a aguda e a crônica. Desta maneira, este tipo de doença é considerado um problema de saúde pública, uma vez que o número de fármacos para o tratamento de infecções fúngicas é limitado<sup>80</sup>.

Os anti-fúngicos são medicamentos que possuem como alvo atingir a membrana celular do fungo, tendo como objetivo aumentar a permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversos tipos de moléculas, levando à morte celular. A anfotericirina B e os azóis – principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol – são os fármacos mais utilizados para a terapia<sup>79</sup>. Entretanto, o uso incorreto e utilização constante destes medicamentos, podem acarretar em fungos mais resistentes aos diferentes tipos de fármacos existentes<sup>80</sup>.

### 1.6.1 Cetoconazol

O cetoconazol (CTO) (FIGURA 1.7) é um antifúngico sintético imidazólico, dentro dos antifúngicos, pertencente à classe dos azóis, sendo um dos fármacos mais empregado para o combate infecções fúngicas, sendo o primeiro composto azol a ser sintetizado em 1979 e administrado oralmente. Também ele é utilizado como agente anti-incrustante em shampoos e cremes dermatológicos<sup>81,82</sup>.

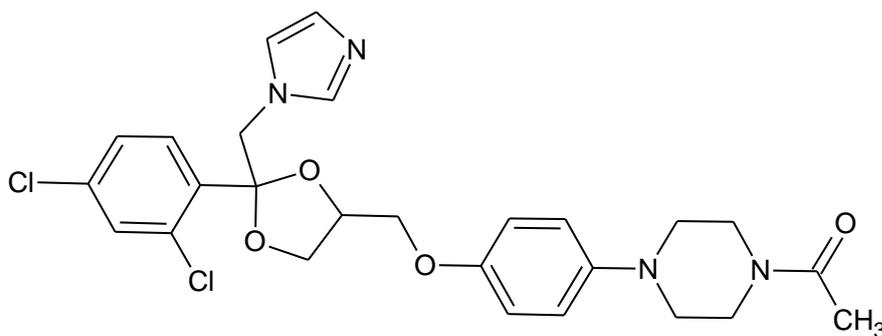


FIGURA 1.7 – Fórmula estrutural do CTO.

O CTO é um antifúngico metabolizado em diversos metabólitos inativos, sendo as principais vias metabólicas de oxidação e degradação dos anéis imidazólicos e piperazínico. Ademais, ocorre a orto-desalquilação oxidativa e hidroxilação aromática<sup>83</sup>.

A eliminação do CTO ocorre via urinária com aproximadamente 13% do fármaco na sua forma inalterada, das quais 4% é do fármaco inalterado. Entretanto, a principal forma de eliminação é pela bile no trato intestinal excretado pelas fezes (cerca de 57%)<sup>82</sup>.

A administração oral de CTO deve ser realizada com cautela, apesar que não há restrição quanto a compra do medicamento em estabelecimento comercial. Devido ao risco de hepatotoxicidade grave, o CTO deve ser ingerido somente quando houver a avaliação da função hepática antes de iniciar o tratamento para excluir o risco de doença hepática aguda ou crônica. Além disso, pode ocasionar supressão da produção de testosterona, inibição de esteroides gonadais, urticárias, náuseas, vômitos dentre outros<sup>84</sup>. Assim, faz-se necessário realizar o monitoramento, com certa frequência e regularidade, nos indivíduos em tratamento a fim de evitar a hepatotoxicidade.

Na literatura são encontrados diferentes métodos analíticos para a determinação de CTO em formulações farmacêuticas e/ou fluidos biológicos, como por exemplo, métodos espectrofotométricos<sup>85-87</sup> e cromatográficos<sup>88-94</sup>. Alguns métodos eletroquímicos<sup>84,95-97</sup> são descritos para a determinação deste fármaco.

Zhang *et al*<sup>84</sup>, desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de CTO em amostras de formulações farmacêuticas, empregando-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a técnica DPV. Foi obtida uma faixa linear nas concentrações de 1,0 a 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de 0,44  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Mielech-Lukasiewicz e Roginska<sup>98</sup> utilizaram um eletrodo de BDD, juntamente com a técnica de SWV para a determinação de CTO em amostras farmacêuticas. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração deste fármaco entre 0,29 e 3,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de 0,083  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente projeto de mestrado é o desenvolvimento e investigação do comportamento eletroquímico de novos sensores modificados com filmes de carbon black e sua aplicabilidade para o estabelecimento de novos métodos analíticos para a determinação de fármacos (losartana potássica e cetoconazol) em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar e caracterizar o compósito de carbon black utilizando o método de síntese química.
- Investigar as propriedades eletroquímicas dos sensores propostos utilizando sonda redox.
- Desenvolver procedimentos voltamétricos para a detecção e determinação de losartana potássica e cetoconazol em amostras de formulações farmacêuticas e biológicas sintéticas.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão descritos os reagentes, soluções, equipamentos, eletrodos, célula eletroquímica e procedimentos experimentais empregados para a realização deste trabalho de mestrado.

#### 3.1 Reagentes e soluções

Padrões de losartana potássica (LOS) e cetoconazol (CTO) foram adquiridos da Farmácia Rosário (Grau de pureza > 99%).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (Grau de pureza > 98 %). O CB utilizado foi o Vulcan VCX72R, gentilmente cedido pela Cabot Corporation®.

A solução-estoque de LOS e CTO, ambas com concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente em solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e etanol, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida em um sistema Millipore Milli-Q® (modelo Direct 8), com resistividade superior a  $18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ .

Soluções tampão fosfato de concentração  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  com pH variando de 2,0 a 10,0 foram preparadas a partir da diluição do volume adequado de  $\text{H}_3\text{PO}_4 \text{ conc.}$  e dissolução das respectivas massas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{K}_3\text{PO}_4$ . Soluções tampão Britton-Robinson (BR) com pH igual a 2,0 e 9,0 foram preparadas utilizando-se volumes adequados de soluções de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  todos de concentração igual a  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  e seguidas do ajuste do pH com solução concentrada de NaOH.

## 3.2 Instrumentação

A morfologia do filme foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) com um microscópio Magellan 400 L.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato  $\mu$ Autolab (EcoChemie BV) interfaciado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9 e/ou NOVA 2.1. A célula eletroquímica de compartimento único (volume de 10 mL) contendo uma tampa de Teflon<sup>®</sup> com três orifícios para a entrada de eletrodos, foi montada de forma a compor um sistema convencional de três eletrodos: GCE ( $\phi = 3$  mm) modificado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) como eletrodo de referência, e uma placa de Pt como eletrodo auxiliar.

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro Orion, modelo EA 940. As balanças analíticas utilizadas para as pesagens foram e Mettler (modelo H10) e Shimadzu (modelo AUW220D) com quatro e cinco casas decimais, respectivamente.

Um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 foi empregado no método espectrofotométrico comparativo para a determinação de LOS e CTO nas formulações farmacêuticas.

## 3.3 Procedimentos

### 3.3.1 Preparação do eletrodo de trabalho CB-CTS-EPC/GCE

Antes da modificação, a superfície do GCE foi cuidadosamente polida e, posteriormente, exaustivamente enxaguada com água ultrapura. Em seguida, o GCE foi levado ao banho ultrassônico com álcool isopropílico seguido de água ultrapura, durante 2 min cada uma, e depois seco à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C).

Para a realização da modificação do GCE foi preparada uma dispersão contendo 1,0 mg de CB, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução CTS 0,1 % (m/v) (preparada em ácido acético 1,0% (v/v)) e 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de EPC 0,1 % (v/v) (preparada em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, sendo a mistura obtida levada ao banho ultrassônico durante 60 minutos.

Em seguida, 8  $\mu\text{L}$  da dispersão foi gotejada sobre a superfície do GCE limpo e o solvente evaporado sob luz infravermelha durante aproximadamente 25 min. O eletrodo modificado foi então chamado de CB-CTS-EPC/GCE, conforme apresentado no esquema da FIGURA 3.1 em seguida.

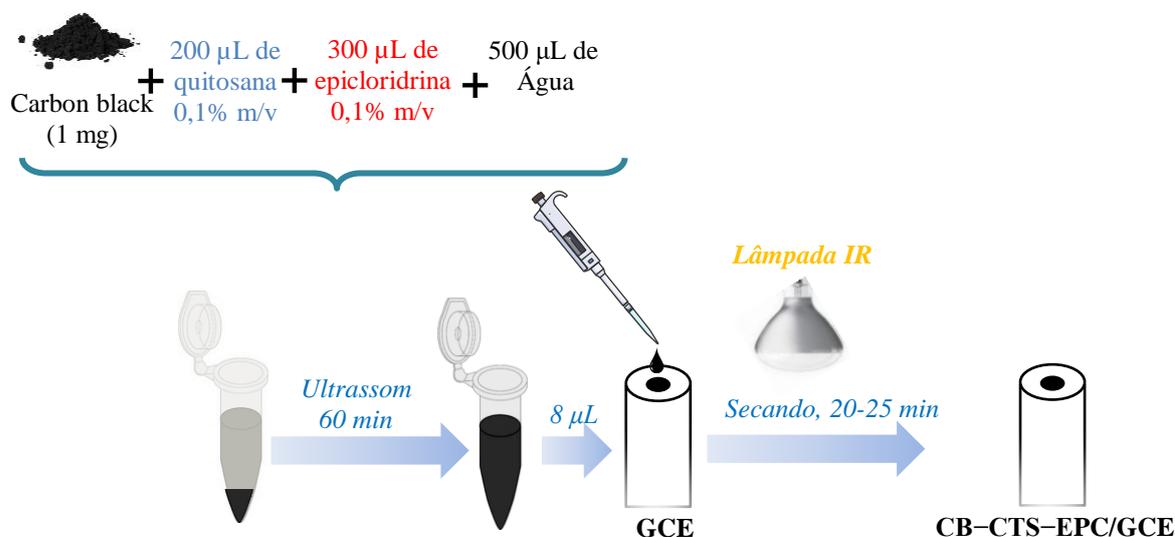


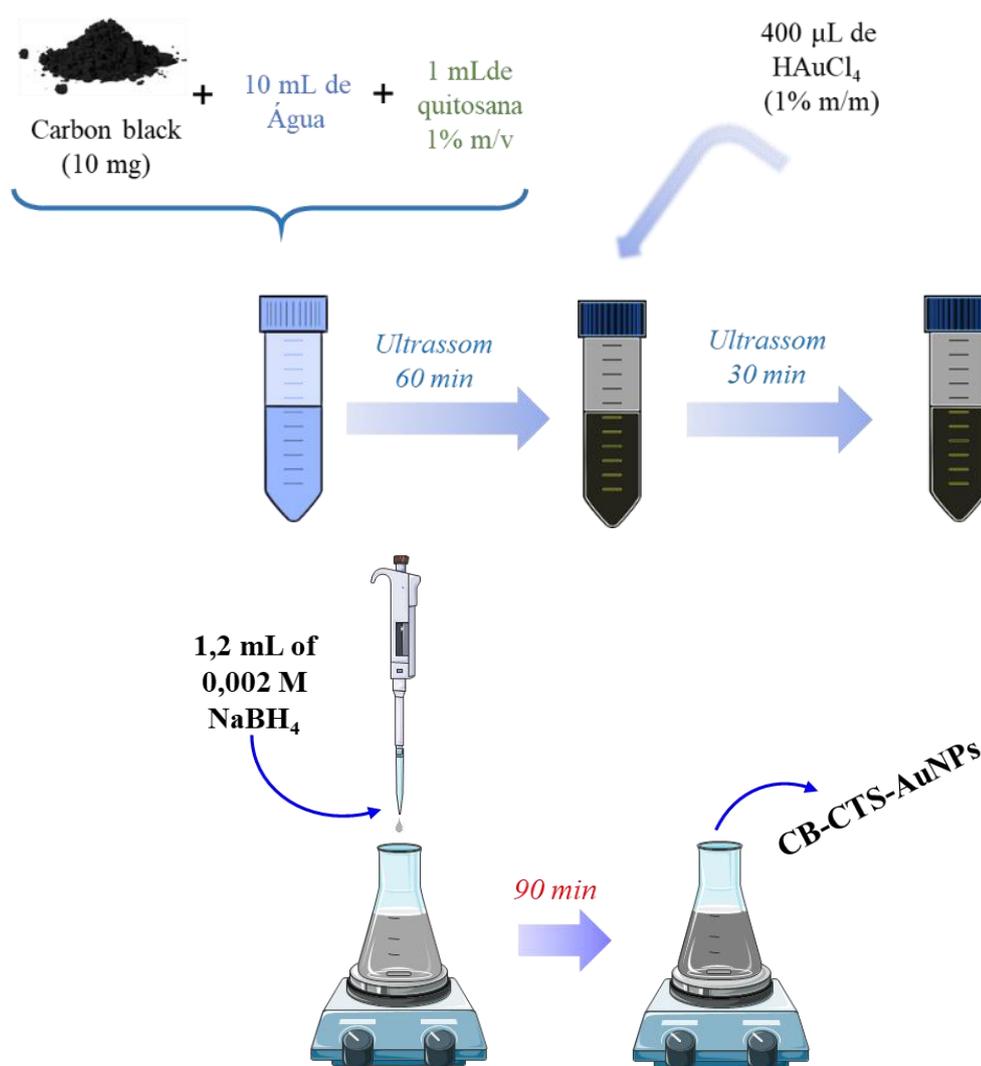
FIGURA 3.1 - Esquema geral de montagem do eletrodo de trabalho de CB-CTS-EPC/GCE.

### 3.3.2 Preparação do eletrodo de trabalho CB-CTS-AuNPs/GCE

Inicialmente, foi feita uma dispersão contendo 10,0 mg de CB, 1 mL de uma solução de CTS, 1 % (m/v) (preparada em ácido acético 1,0% (v/v)) e 10 mL de água ultrapura, sendo esta suspensão sonicada em um banho ultrassom por 60 minutos. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) (1% m/m) foram adicionados a dispersão previamente preparada e a mistura levada novamente ao banho de ultrassom por 30 min. Após esta etapa, a solução foi

transferida para um Erlenmeyer e sob agitação constante foram gotejados 1,2 mL de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ )  $0,002 \text{ mol L}^{-1}$  e deixados sob agitação por 90 minutos.

Em seguida,  $8 \mu\text{L}$  da dispersão foram gotejados sobre a superfície do GCE previamente limpo, como descrito anteriormente, e o solvente evaporado sob luz infravermelha durante 25 min. O eletrodo modificado foi então chamado de CB-CTS-AuNPs/GCE, conforme apresentado no esquema da FIGURA 3.2.



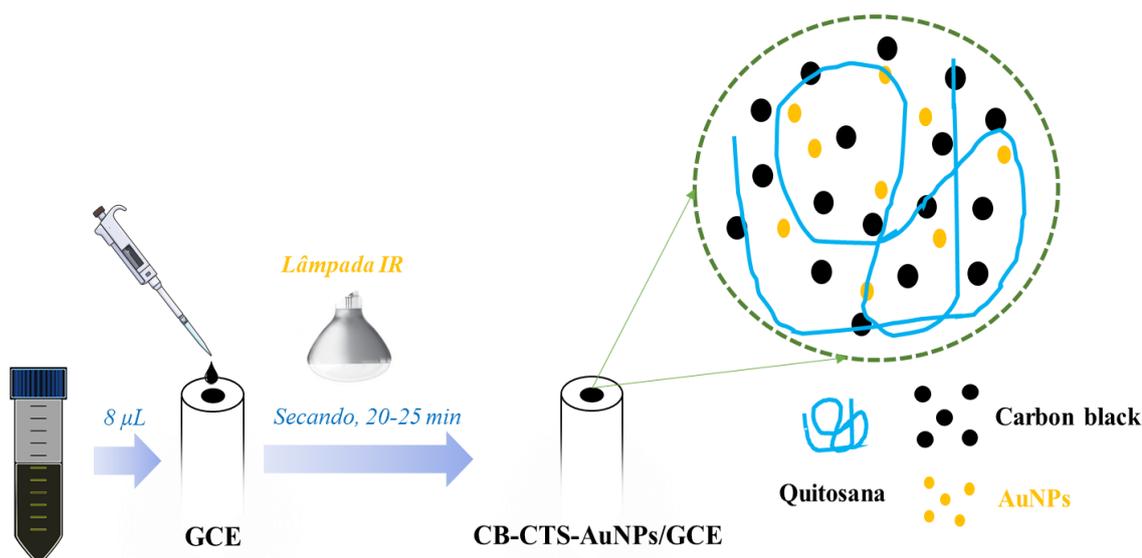


FIGURA 3.2 - Esquema geral de montagem do eletrodo de trabalho CB-CTS-AuNPs /GCE.

### 3.4 Procedimentos analíticos

O CB-CTS-EPC/GCE foi caracterizado eletroquimicamente utilizando a sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por CV na faixa de potencial de  $-0,3$  a  $0,7 \text{ V}$  com velocidade de varredura de potencial igual a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS do inglês: *electrochemical impedance spectroscopy*) foram realizadas empregando a sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para isso, o potencial aplicado foi selecionado utilizando a CV (potencial de meia-onda,  $E_{1/2}$ ), na faixa de frequência de  $10 \text{ MHz}$  a  $100 \text{ kHz}$  (10 pontos por década) e com amplitude de  $10 \text{ mV}$ .

No desenvolvimento dos procedimentos voltamétricos para a determinação dos fármacos de LOS e CTO foram seguidas etapas semelhantes, como descritas a seguir.

Primeiramente, foi identificado o melhor eletrólito suporte (composição e pH) para a obtenção do melhor sinal analítico (resposta voltamétrica) para os fármacos estudados.

Os parâmetros que influenciam a SWV, tais como frequência, amplitude e incremento, foram avaliados e otimizados. As curvas analíticas foram construídas por meio da adição sucessiva de diferentes volumes das soluções-estoque de LOS e CTO de forma a obter-se diferentes concentrações do analito na célula eletroquímica. O limite de detecção (LOD) foi calculado como sendo três vezes o desvio-padrão do branco ( $n = 10$ ), dividido pela inclinação da curva analítica (sensibilidade analítica).

A precisão do procedimento voltamétrico foi verificada a partir de estudos de repetibilidade intra-dia ( $n = 10$ ) e inter-dias ( $n = 3$ ).

O procedimento voltamétrico desenvolvido foi empregado na análise de amostras farmacêuticas comerciais e fluidos biológicos. A concentração de LOS e CTO em cada amostra farmacêutica foi determinada em triplicata por interpolação na curva analítica, previamente obtida. Nas seções seguintes são descritos os procedimentos adotados para preparação das amostras citadas anteriormente.

As amostras farmacêuticas de LOS e CTO também foram analisadas empregando-se um método comparativo para a avaliação da exatidão do procedimento voltamétrico estabelecido. Foram empregados como métodos comparativos o espectrofotométrico na região do UV-Vis<sup>87,99</sup>.

### **3.4.1 Preparação das amostras de formulações farmacêuticas**

As amostras farmacêuticas de LOS (50 e 100 mg/comprimido) foram adquiridas em comércio local. Para o preparo destas amostras, 10 comprimidos foram pesados, macerados com auxílio de almofariz e pistilo e a massa média de um comprimido determinada. Em seguida, a massa equivalente a um comprimido foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e volume aferido

com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Para garantia da total solubilização do analito alvo LOS, o balão foi deixado em banho ultrassônico por 10 min, sendo então filtrada para obtenção de uma solução-estoque límpida da amostra. As soluções-estoque obtidas foram utilizadas imediatamente após a sua preparação. Para a adequação da curva analítica empregando-se o método voltamétrico, cada solução-estoque foi diluída por um fator de 10, e alíquotas de 200 µL de cada amostra diluída em água ultrapura foram adicionadas à célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte para a determinação de LOS.

As amostras farmacêuticas de CTO (200 mg/comprimido) e creme dermatológico (20 mg/g) foram adquiridas em comércio local. Para o preparo das amostras, 10 comprimidos foram pesados, macerados utilizando almofariz e pistilo e a massa média destes comprimidos foi determinada. Em seguida, a massa equivalente a um comprimido foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e volume aferido com etanol. Para solubilização total do analito de CTO, o balão foi deixado em banho ultrassom por 10 min, e mistura final obtida filtrada para obtenção de uma solução-estoque límpida. As soluções-estoque obtidas foram utilizadas imediatamente após a sua preparação. Para adequação da faixa linear do método voltamétrico, a solução estoque foi diluída em etanol até a concentração  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e 120 µL foram adicionados à célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte para análise. Já, para o preparo da amostra de creme dermatológico, a massa equivalente de 20 mg de CTO foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL e, completada com etanol para completa solubilização da amostra. Em seguida, foi realizada a diluição da solução estoque para adequação da faixa linear do método voltamétrico proposto e 120 µL foram adicionados à célula eletroquímica para análise.

### 3.4.2 Preparação das amostras biológicas sintéticas

Para aplicação do método analítico desenvolvido, os analitos de interesse foram determinados em amostras de urina e soro sanguíneo. As amostras

sintéticas foram preparadas de acordo com procedimentos pré-estabelecidos na literatura<sup>100,101</sup>.

A urina sintética foi preparada adicionando 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,56 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g de NH<sub>4</sub>Cl e 6,25 g de ureia em um balão volumétrico de 250 mL e dissolvidos em água. No caso da amostra de soro sanguíneo, 3,0 g de NaCl, 0,16 g de NaHCO<sub>3</sub>, 3,5 mg de triptofano, 2,3 mg de glicina, 3,2 mg de serina, 3,7 mg de tirosina, 6,6 mg de fenilalanina, 9,1 mg de lisina, 6,3 mg de histidina, 29,0 mg de ácido aspártico, 9,1 mg de alanina e 10,0 mg de arginina foram dissolvidos em água em um balão volumétrico de 250 mL.

Em seguida, foram adicionadas duas concentrações diferentes dos analitos de interesse e uma alíquota adequada foi adicionada na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte e analisada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos nos estudos da caracterização morfológica e comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados propostos na presença da sonda redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  e também dos fármacos LOS e CTO. Apresentar-se-ão os resultados obtidos no procedimento eletroanalítico empregando-se a técnica de voltamétrica de onda quadrada para a determinação desses fármacos.

### 4.1 Caracterização morfológica e eletroquímica do CB-CTS-EPC/GCE

#### 4.1.1 Caracterização Morfológica

O filme de CB-CTS-EPC preparado conforme descrito na seção experimental foi depositado sobre a superfície do GCE. Na FIGURA 4.1 são apresentadas as imagens de MEV obtidas para superfície do GCE (Figura 4.1 (a)) e para o filme de CB-CTS-EPC depositadas sobre a superfície do GCE (Figura 4.1(b)). Analisando-se a FIGURA 4.1 (a), é possível observar que o GCE apresentou uma superfície planar uniforme. Já na FIGURA 4.1 (b) pode ser observada a formação de um filme homogêneo que foi uniformemente distribuído sobre a superfície do GCE.

É bem conhecido que o CB é constituído por agregados de nanopartículas esféricas, deste modo ao observar as imagens de SEM obtidas, pode-se concluir que ao utilizar a CTS reticulada, esta promoveu a formação de um filme polimérico homogêneo com a aparição de pequenos poros<sup>18</sup>.

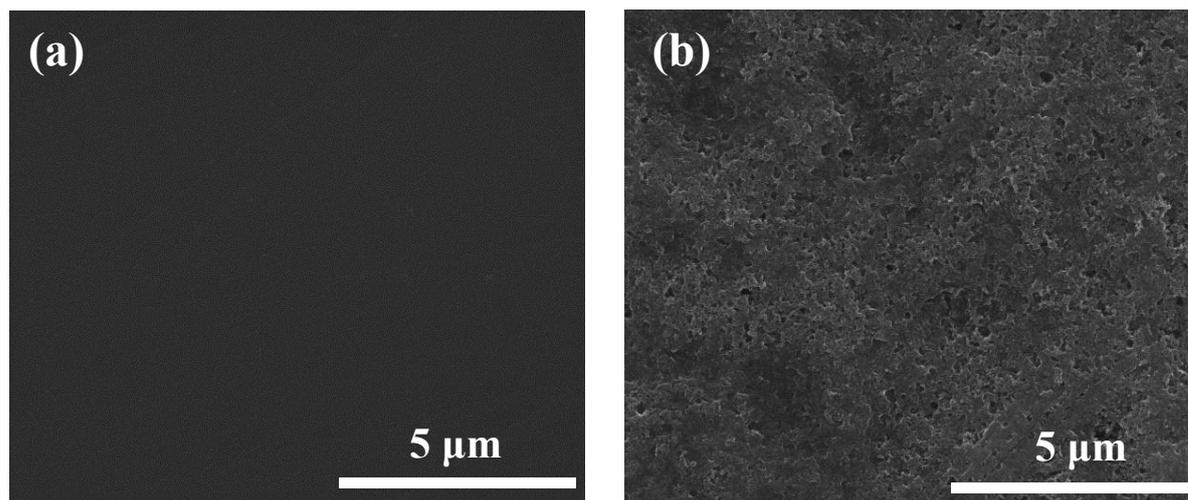


FIGURA 4.1 - Imagens obtidas por SEM do GCE (a) e CB-CTS-EPC/GCE (b).

### 4.1.2 Caracterização eletroquímica

Inicialmente, o GCE e o CB-CTS-EPC/GCE foram caracterizados eletroquimicamente utilizando o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  como sonda eletroquímica. Na FIGURA 4.2 são apresentados os voltamogramas cíclicos para solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  empregando-se o GCE e o CB-CTS-EPC/GCE. Como pode ser observado, pares de pico redox bem definidos com separação entre os potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) de aproximadamente 181 mV para o GCE e 70,8 mV para CB-CTS-EPC/GCE (*vs.* Ag/AgCl (KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ )) foram obtidos. A sonda eletroquímica apresentou um comportamento *quasi-reversível*<sup>102</sup>, quando o CB-CTS-EPC/GCE foi utilizado. Além disso, o CB-CTS-EPC/GCE (FIGURA 4.2, linha vermelha) proporcionou maiores correntes de pico anódica e catódica ( $I_{pa} = +24,9 \mu\text{A}$  e  $I_{pc} = -23,9 \mu\text{A}$ ) em relação ao GCE (FIGURA 4.2, linha preta:  $I_{pa} = +16,7 \mu\text{A}$  e  $I_{pc} = -12,4 \mu\text{A}$ ). Indicando assim, o efeito eletrocatalítico que o GCE modificado pode proporcionar.

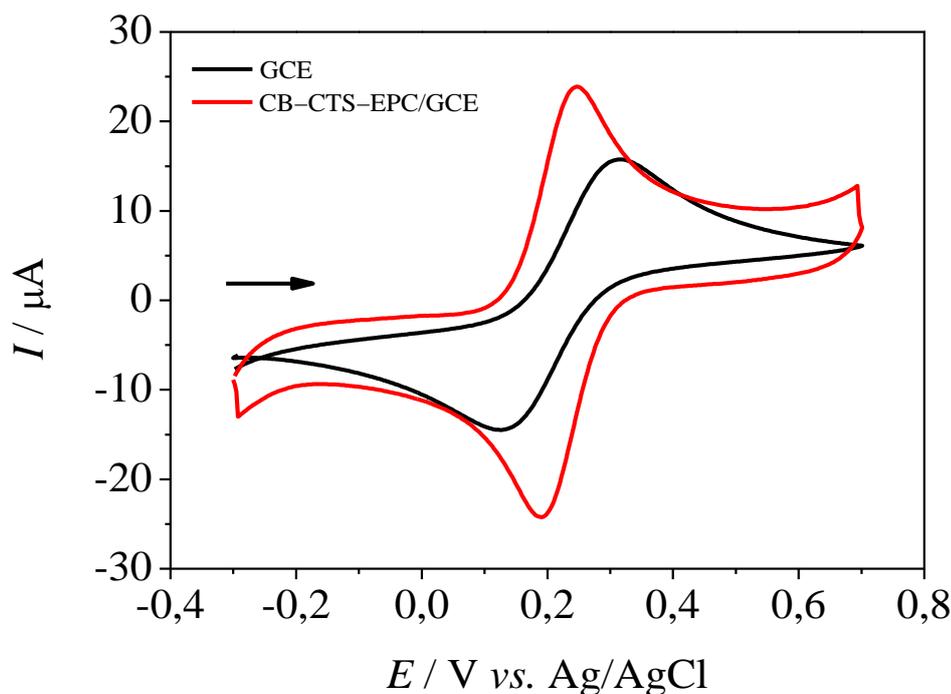


FIGURA 4.2 - Voltamogramas cíclicos para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o GCE (-) e CB-CTS-EPC/GCE (-);  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

O GCE e o CB-CTS-EPC/GCE foram caracterizados por EIS na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Na FIGURA 4.3 são apresentados os diagramas de Nyquist empregando-se o GCE e o CB-CTS-EPC/GCE. Analisando-se o espectro de impedância para GCE, observou-se um semicírculo bem definido em altas frequências, o que diminuiu substancialmente quando o CB-CTS-EPC/GCE foi utilizado. Este comportamento evidenciou que a resistência de transferência de carga diminuiu consideravelmente quando CB-CTS-EPC/GCE foi empregado, devido à melhoria na transferência de elétrons sobre a superfície do eletrodo modificado.

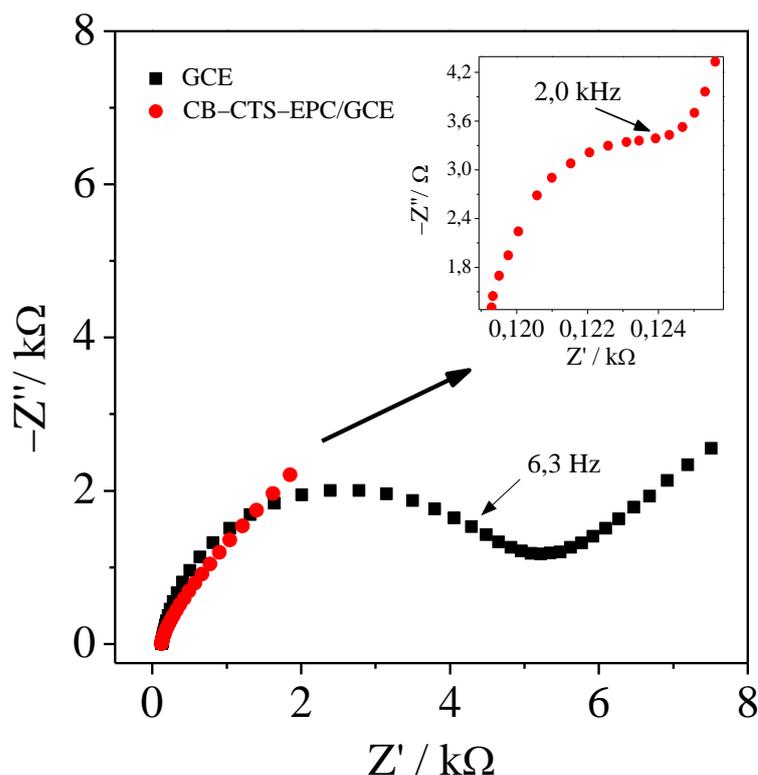


FIGURA 4.3 - Diagramas de Nyquist obtidos para CB-CTS-EPC/GCE (■) e GCE (●). As medidas foram realizadas em presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma faixa de frequência de 0,01 Hz a 100 kHz.

As propriedades catalíticas da interface eletrodo/solução são responsáveis pelos valores obtidos de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ). Utilizando os valores de  $R_{ct}$  obtidos foi calculado a constante de transferência heterogênea de elétrons ( $k^0$ ), utilizando-se a equação (1):

$$k^0 = \frac{RT}{F^2 R_{ct} A C} \quad (1)$$

onde R é a constante universal dos gases, T a temperatura termodinâmica, F a constante de Faraday,  $R_{ct}$  a resistência de transferência de carga, A a área geométrica do eletrodo e C a concentração das espécies.

Considerando-se,  $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $T = 298,15 \text{ K}$ ,  $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$ ,  $A = 0,0707 \text{ cm}^2$  e  $C = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ , calcularam-se os valores obtidos de  $R_{ct}$  e  $k^0$ , como apresentados na TABELA 4.1

TABELA 4.1 - Valores de resistência de transferência de carga e constante de transferência heterogênea de elétrons

<b>Eletrodo</b>	<b>Resistência de transferência de carga (<math>\Omega</math>)</b>	<b>Constante de transferência heterogênea de elétrons (<math>\text{cm s}^{-1}</math>)</b>
<b>GCE</b>	$4,31 \times 10^3$	$8,579 \times 10^{-4}$
<b>CB-CTS-EPC/GCE</b>	7,92	$4,76 \times 10^{-1}$

A excelente condutividade do CB-CTS-EPC/GCE diminuiu a resistência da interface eletrodo/solução<sup>103</sup>. A diminuição da resistência de transferência de carga pode ser relacionada a presença de grupos funcionais na superfície<sup>104</sup>.

Em seguida, foi feita a determinação da área eletroativa de cada eletrodo empregando-se a voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura de potenciais ( $10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$ ), utilizando a sonda redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em meio de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos registrados, bem como os gráficos de corrente de pico anódica ( $I_a$ ) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) encontram-se na FIGURA 4.4 (a, b e c). Verificou-se que com o aumento da velocidade de varredura, as correntes de pico anódica e catódica variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo foi totalmente controlado por difusão.

Foi realizado o cálculo da área eletroativa utilizando-se a Equação de Randles-Sevcik (equação 2):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

sendo  $I_p$  a corrente de pico anódica,  $n$  o número de elétrons envolvidos no processo redox,  $A$  a área eletroativa do eletrodo,  $D$  o coeficiente de difusão,  $C$  a concentração da espécie eletroativa e  $v^{1/2}$  a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Considerando-se  $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 1$  e  $C = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$ , o valor da área eletroativa foi calculado utilizando-se o valor do coeficiente angular obtido para as relações de corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura com o coeficiente angular da Equação de Randles-Sevcik (2).

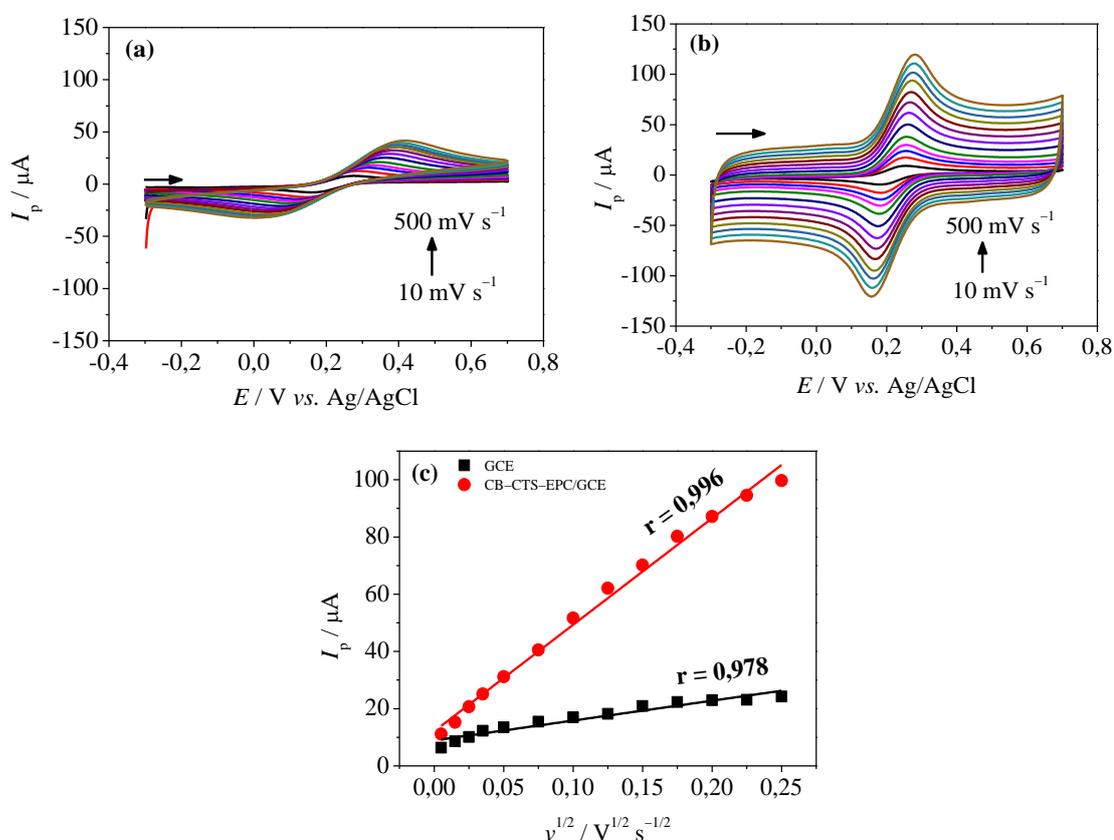


FIGURA 4.4 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 – 500  $\text{mV s}^{-1}$ ) para o GCE e (b) CB-CTS-EPC/GCE em solução  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . (c) Gráfico com o registro de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  para correntes de pico anódica ( $I_a$ ) para GCE e CB-CTS-EPC/GCE.

Os valores determinados de coeficiente angular e área eletroativa encontram-se na

TABELA 4.2. A área geométrica do eletrodo utilizado foi de 0,0707 cm<sup>2</sup>. A área eletroativa do eletrodo de CB-CTS-EPC/GCE foi igual a 0,502 cm<sup>2</sup> e a do GCE foi igual a 0,0936, ou seja, houve um aumento de aproximadamente 5 vezes quando o eletrodo de carbono vítreo modificado foi empregado, demonstrando assim, a potencialidade do material de carbono empregado para a modificação do eletrodo de carbono vítreo.

TABELA 4.2 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica em função de  $v^{1/2}$

<b>Eletrodo</b>	<b>Coeficiente angular (A V<sup>-1/2</sup> s<sup>1/2</sup>)</b>	<b>Área eletroativa (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>GCE</b>	$6,92 \times 10^{-5}$	0,0936
<b>CB-CTS-EPC/GCE</b>	$3,71 \times 10^{-4}$	0,502

#### **4.2 Determinação voltamétrica de losartana potássica empregando CB-CTS-EPC/GCE**

Após os estudos e resultados de caracterização eletroquímica e avaliação do desempenho eletroquímico demonstrado pelo eletrodo de CB-CTS-EPC/GCE, investigou-se em seguida a utilidade deste material de eletrodo como sensor eletroquímico para a determinação do anti-hipertensivo LOS. O primeiro procedimento eletroanalítico desenvolvido consistiu na determinação voltamétrica da losartana potássica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas, e os resultados obtidos são apresentados nas próximas seções.

### 4.2.1 Comportamento eletroquímico da molécula de losartana potássica

Inicialmente, avaliou-se o comportamento eletroquímico da LOS por CV em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0). Conforme os voltamogramas apresentados na FIGURA 4.5, um pico anódico em 1,28 V foi obtido para o CB-CTS-EPC/GCE na presença de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  no eletrólito suporte supramencionado. Além disso, não foi observado pico de redução, o que indica um processo de oxidação irreversível para a LOS na superfície deste eletrodo. Utilizando-se as mesmas condições experimentais, avaliou-se também a resposta eletroquímica da LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0) sobre o GCE não modificado. Entretanto, a LOS não apresentou um pico anódico sobre o GCE na mesma varredura de potencial, o que demonstra a potencialidade do eletrodo de CB-CTS-EPC/GCE para a determinação de LOS.

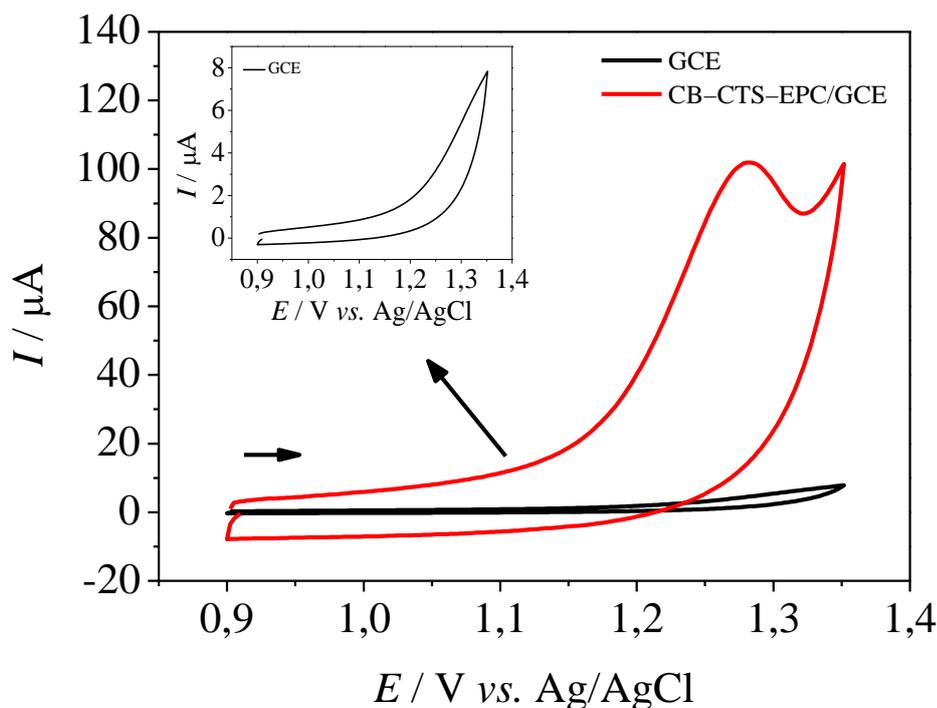
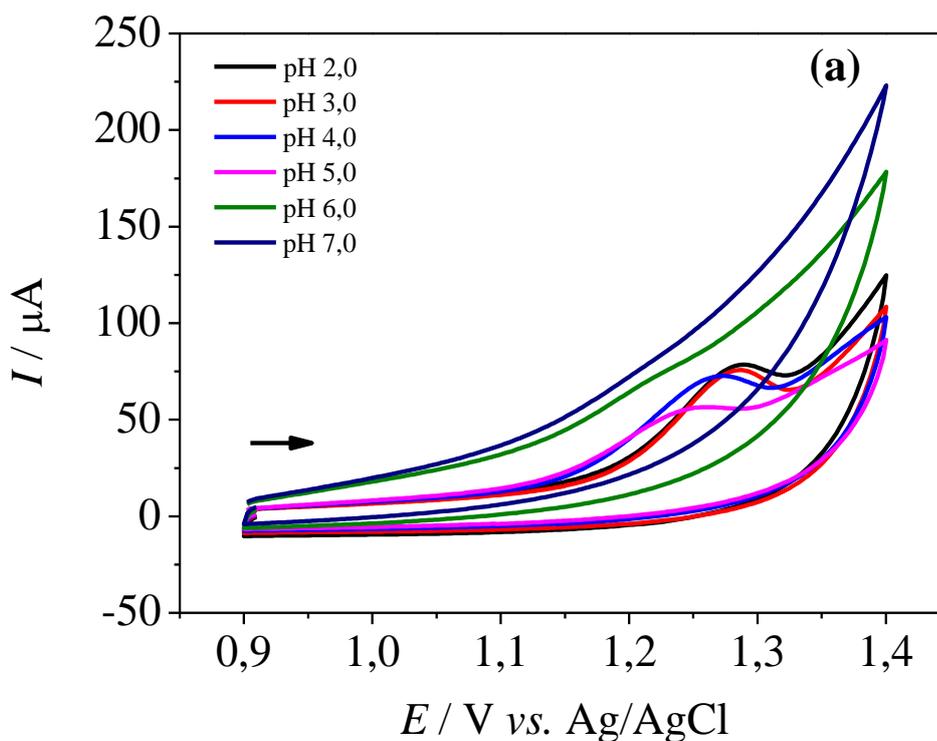


FIGURA 4.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0), empregando-se o GCE (-) e o CB-CTS-EPC/GCE (-).  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 4.2.2 Efeito do pH e do eletrólito suporte

Afim de avaliar o comportamento da LOS em diferentes valores de concentração hidrogeniônica, foram obtidos voltamogramas em diferentes pHs. Na FIGURA 4.6 (a) são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de LOS em tampão fosfato em diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0). A partir dos voltamogramas obtidos, é possível observar que houve um deslocamento do potencial de pico para a oxidação da LOS para potenciais menos positivos conforme o pH do tampão foi elevado. Entretanto, é possível observar que para valores de pH maiores, a intensidade de sinal analítico começou a diminuir drasticamente. Em seguida, foram construídos gráficos de corrente de pico ( $I_p$ ) vs. pH (FIGURA 4.6 (b)) e potencial de pico ( $E_p$ ) vs. pH (FIGURA 4.6 (c)). Levando-se em consideração a maior intensidade de corrente e definição de pico, o pH 2,0 foi selecionado para estudos posteriores.



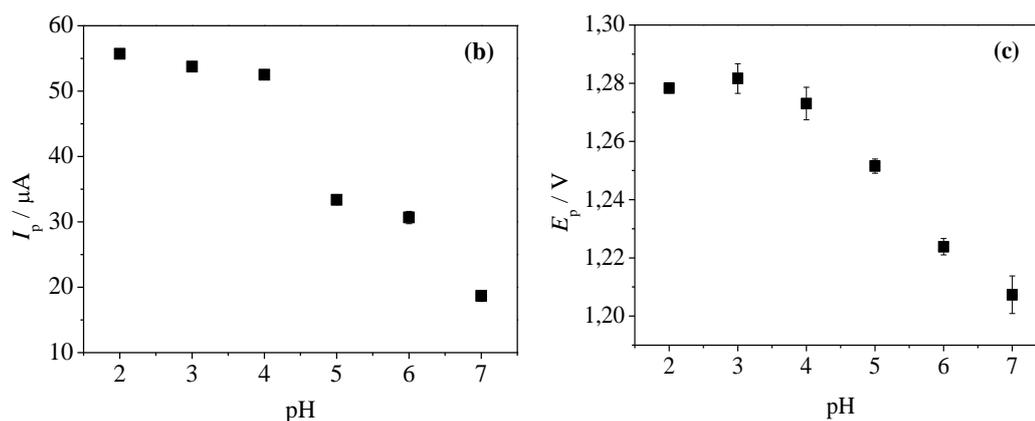


FIGURA 4.6 - Voltamogramas cíclicos para solução de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  nos diferentes pHs (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0), empregando-se o CB-CTS-EPC/GCE.  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  (a),  $I_p$  vs. pH (b) e  $E_p$  vs. pH (c).

Além disso, é possível observar também, que houve quebra da linearidade entre os valores de pH 3,0 e 4,0 e entre 5,0 e 6,0, o que está de acordo com os respectivos valores de  $pK_a$  da LOS (3,85 e 5,85).

Após a seleção do pH (ou da concentração hidrogeniônica), o estudo da composição do eletrólito suporte foi investigado (FIGURA 4.7) empregando-se diferentes soluções com pH próximos ao escolhido anteriormente: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) e tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). O potencial de oxidação da LOS menos positivo e melhor definição de pico foram observados empregando-se a solução de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0), sendo esta solução empregada nos experimentos posteriores.

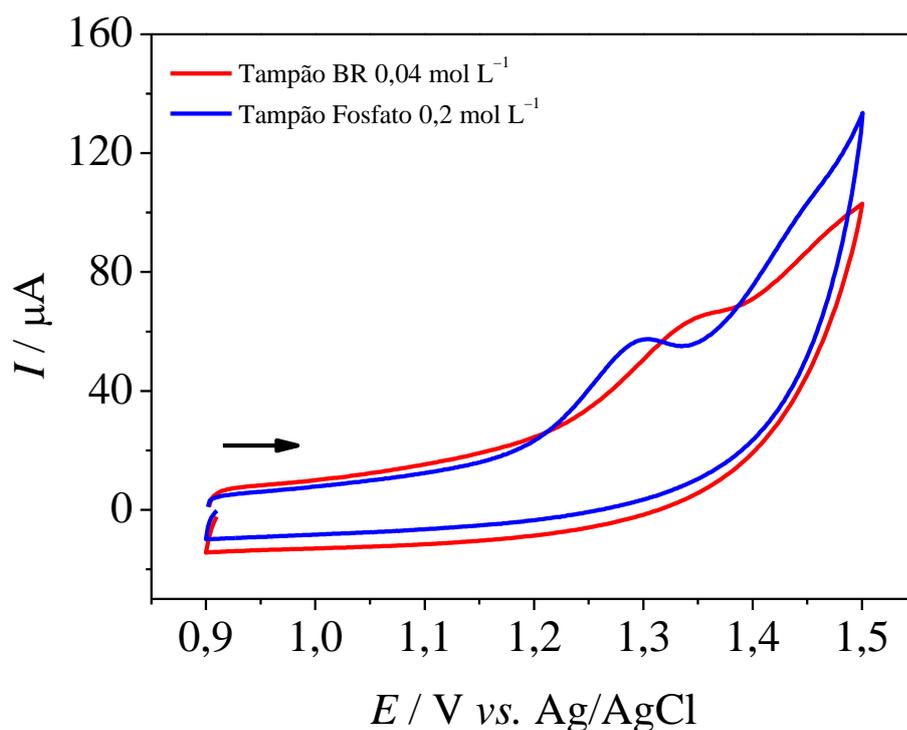


FIGURA 4.7 - Voltamogramas cíclicos para solução de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0 (-) e tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0 (-).  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 4.2.3 Efeito da velocidade de varredura de potencial

O efeito da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta eletroquímica da LOS empregando-se o CB-CTS-EPC/GCE foi realizado por CV em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). Para isso, as medidas de CV foram feitas em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 a  $200 \text{ mV s}^{-1}$ ) na presença de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , como apresentado na FIGURA 4.8.

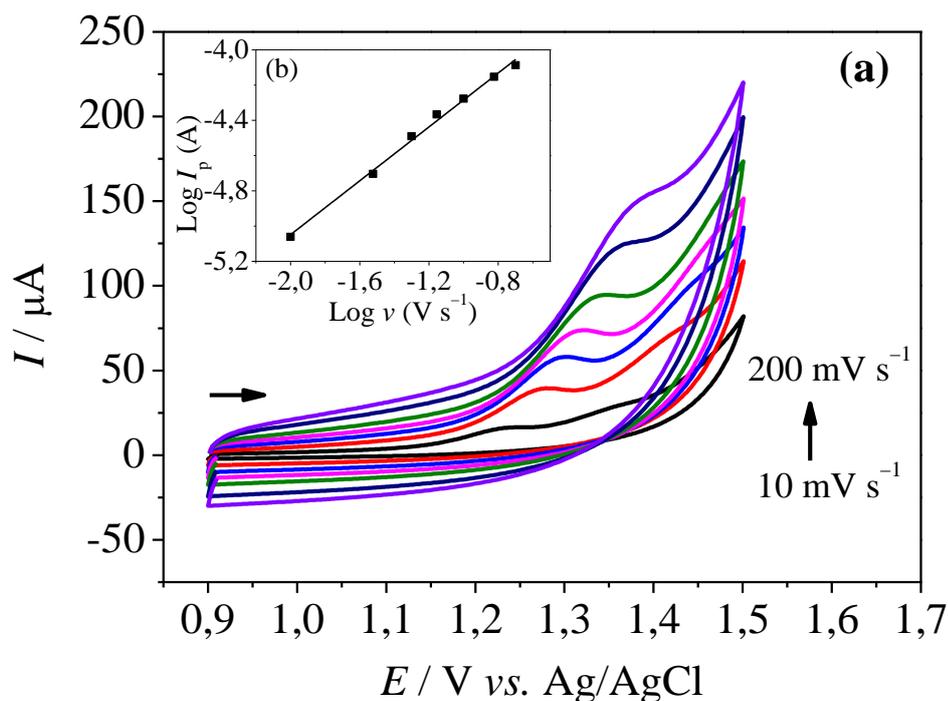


FIGURA 4.8 - Voltamogramas cíclicos para (a) LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 30, 50, 70, 100, 150 e 200  $\text{mV s}^{-1}$ ). Inserido: (b) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a LOS. Equação da reta:  $\log I_p = -3,52 + 0,764 \log v$  [LOS].

Com os dados obtidos neste estudo, construiu-se um gráfico do logaritmo da corrente de pico de oxidação ( $\log I_p$ ) versus o logaritmo da velocidade de varredura de potencial ( $\log v$ ) como apresentado na FIGURA 4.8 (b). Analisando-se o gráfico obtido, verifica-se que houve uma relação linear ( $r = 0,994$ ) entre  $\log I_p$  e  $\log v$ , com o coeficiente angular igual a 0,764. Este valor indica que o processo de oxidação da LOS sobre a superfície do CB-CTS-EPC/GCE deve ser controlado por uma mistura de processos de difusão e adsorção das espécies, uma vez que o valor obtido (0,76) está entre 0,50 (para processos controlados por difusão) e 1,0 (para processos controlados por adsorção)<sup>105,106</sup>. As relações entre corrente de pico anódica ( $I_p$ ) vs. velocidade de varredura ( $v$ ) e entre a corrente de pico anódica ( $I_p$ ) vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) foram avaliadas. Tanto para a relação de  $I_p$  vs.  $v$

quanto para  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  não foram verificadas relações lineares, indicando assim que o processo de oxidação de LOS na superfície do eletrodo proposto ocorreu, de fato, por uma mistura de processos (adsortivo e difusional).

Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Sartori *et al*<sup>63</sup> utilizando um eletrodo de BDD e por Srivastava *et al*<sup>74</sup> empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de carbono em que a LOS apresentou processo controlado por difusão.

Ainda utilizando-se os dados obtidos no experimento da variação da velocidade de varredura de potencial, obtiveram-se também as diferenças entre os valores de potencial de pico e potencial de pico de meia onda  $E_p - E_{p_{1/2}}$  (com valor de 57 mV referente à média dos valores para as diferentes velocidades de varredura de potencial) e aplicando-se a Equação 3<sup>105</sup>, obteve-se o valor de  $\alpha n$  (0,84). Considerando  $\alpha = 0,50$  (valor médio geralmente atribuído para moléculas orgânicas), o número de elétrons ( $n$ ) calculado foi igual a 1,68, um valor mais próximo de 2 elétrons.

$$|E_p - E_{p_{1/2}}| = \frac{48}{\alpha n} \quad (3)$$

O valor obtido esta em concordância com o número de elétrons relatado por Sartori *et al*<sup>63</sup> e Srivastava *et al*<sup>74</sup> para o mesmo analito. Considerando os resultados obtidos e estudos prévios da literatura, a reação de oxidação proposta para LOS é apresentado na FIGURA 4.9. Neste caso, ocorre a oxidação do grupo hidroxila do anel imidazol, resultando na formação do grupo aldeído envolvendo 2 elétrons e 2 prótons nesta reação.

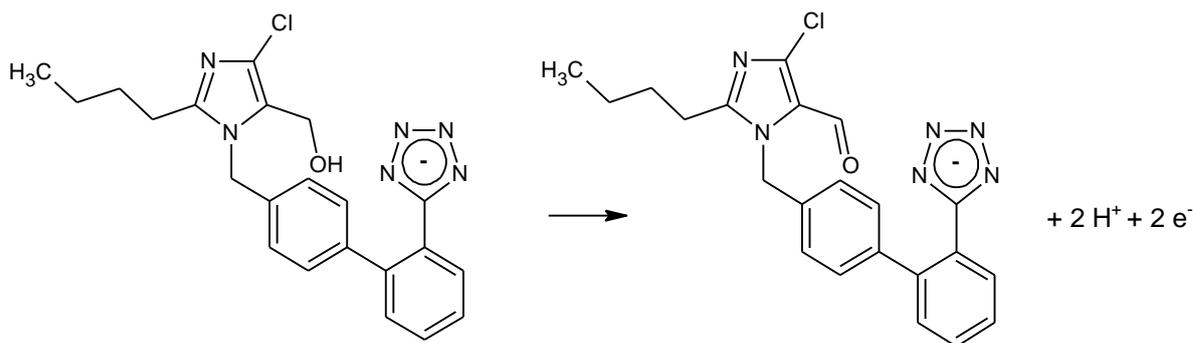


FIGURA 4.9 - Reação de oxidação da molécula de LOS.

#### 4.2.4 Otimização dos parâmetros e curva analítica

Os parâmetros da SWV, frequência ( $f$ ), amplitude de pulso ( $a$ ), e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) foram otimizados para solução de LOS  $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). Os intervalos estudados foram:  $10 \text{ Hz} \leq f \leq 70 \text{ Hz}$ ,  $10 \text{ mV} \leq a \leq 120 \text{ mV}$  e  $1,0 \text{ mV} \leq \Delta E_s \leq 10 \text{ mV}$ . Os valores foram selecionados ( $f = 10 \text{ Hz}$ ,  $a = 100 \text{ mV}$ , e  $\Delta E_s = 7,0 \text{ mV}$ ) considerando-se a repetibilidade, a estabilidade da linha base e a magnitude do sinal analítico para o CB-CTS-EPC/GCE na determinação de LOS.

Após a otimização dos parâmetros da SWV, a curva analítica foi construída pela adição, na célula eletroquímica, de alíquotas sucessivas da solução estoque de LOS de forma a obter concentrações de LOS variando de  $4,97 \times 10^{-6}$  a  $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas de SWV obtidos para as diferentes concentrações de LOS são apresentados na FIGURA 4.10. A curva analítica (FIGURA 4.10, inserida) foi linear na faixa de concentração mencionada, e obedeceu a seguinte equação de regressão linear:  $I_p (\mu\text{A}) = -6,04 \times 10^{-8} + 0,122 [\text{LOS}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ;  $r = 0,990$ . O limite de detecção obtido foi igual a  $4,79 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e foi obtido como descrito na seção experimental.

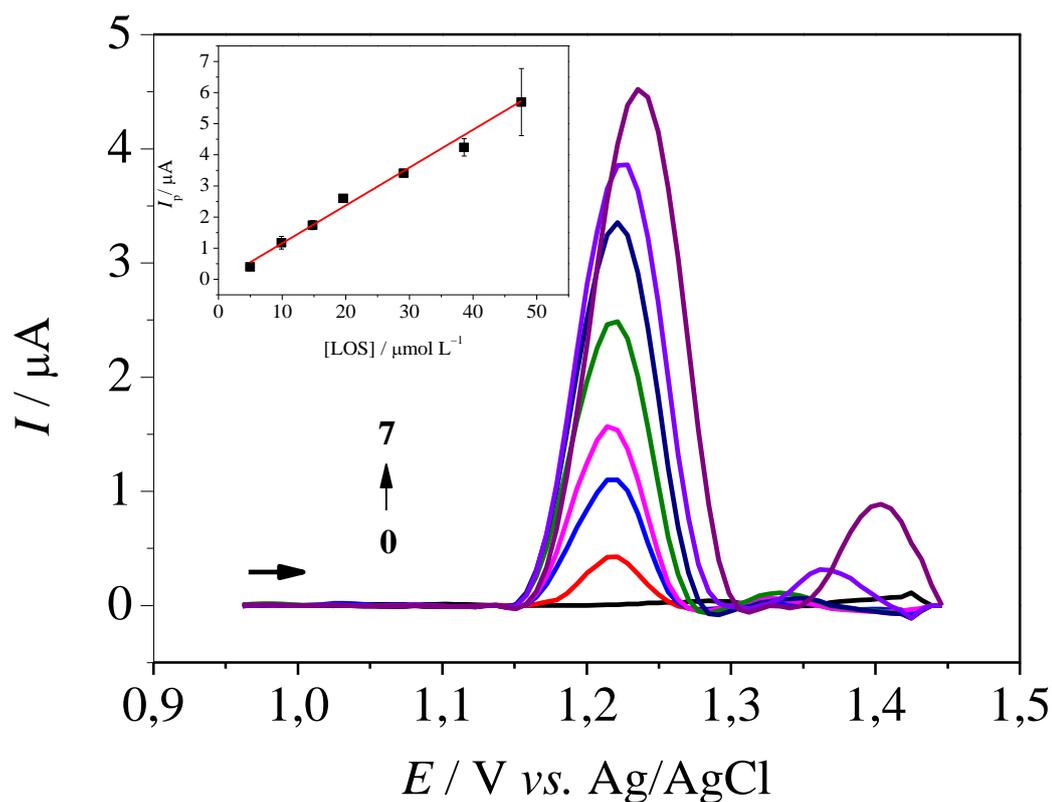


FIGURA 4.10 - Voltamogramas de SW obtidos usando o CB-CTS-EPC/GCE para diferentes concentrações de LOS em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0): (0) 0,0 (branco); (1) 4,97; (2) 9,99; (3) 14,8; (4) 19,6; (5) 29,1; (6) 38,6 e (7) 47,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da SWV:  $f = 10 \text{ Hz}$ ,  $a = 100 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$ . Inserido: Curva analítica ( $I_p$  vs.  $[\text{LOS}]$ ).

#### 4.2.5 Estudo de repetibilidade e possíveis interferentes

A fim de avaliar o método proposto quanto, a repetibilidade, foi realizado estudos de repetibilidade intra-dia com dez medidas seguidas no mesmo dia ( $n = 10$ ), utilizando-se duas concentrações distintas de LOS. Já para a repetibilidade inter-dias ( $n = 3$ ), foi utilizado os desvios da corrente de pico obtida da medida de três dias diferentes, com solução estoque preparada diariamente de LOS para duas concentrações distintas. Na TABELA 4.3 estão apresentados os valores de RSD calculados referente a cada concentração. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que apresentaram RSD abaixo de 11,2 %, indicando assim, que o método apresenta boa repetibilidade.

TABELA 4.3 - Estudo de repetibilidade intra e inter-dias para diferentes concentrações de LOS

[LOS] / mol L <sup>-1</sup>	RSD* (%)	
	Repetibilidade	Repetibilidade
	intra-dia (n = 10)	inter-dias (n = 3)
<b>9,90 × 10<sup>-6</sup></b>	11,2	6,04
<b>2,91 × 10<sup>-5</sup></b>	2,99	1,63

\*RSD = (desvio padrão / média)\*100

Também foi avaliado a seletividade do método proposto, investigando-se possíveis interferentes tipicamente presentes na composição de amostras farmacêuticas de LOS. Foram consideradas como interferentes em potencial os seguintes compostos: lactose monohidratada, celulose monocristalina, crospovidona e estearato de magnésio. Para avaliar o efeito destes compostos sobre a resposta voltamétrica, medidas foram realizadas para uma solução de LOS  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> na ausência e na presença dos possíveis interferentes. As razões entre as concentrações de analito/interferente estudadas foram de 1:1 e 1:10. Na TABELA 4.4 são apresentados os valores de RSD obtidos pela comparação das correntes de pico anódica obtidas na ausência e na presença de cada interferente estudado. Como pode ser observado, os possíveis interferentes considerados não apresentaram interferência significativa sobre a determinação voltamétrica de LOS, uma vez que os valores de RSD obtidos ficaram abaixo de + 5,9 %.

TABELA 4.4 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de LOS a um nível de concentração de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 

Possível interferente	Razão analito:interferente	Recuperação (%)*
<b>Lactose monohidratada</b>	1:1	- 0,58
	1:10	- 1,9
<b>Celulose monocristalina</b>	1:1	- 2,4
	1:10	- 4,8
<b>Crospovidona</b>	1:1	+ 4,5
	1:10	+ 5,9
<b>Estearato de Magnésio</b>	1:1	+ 4,3
	1:10	- 2,7

\*Recuperação =  $[(\text{Sinal LOS}_{\text{presença}} - \text{Sinal LOS}_{\text{ausência}}) / \text{Sinal LOS}_{\text{ausência}}] \times 100\%$ .

#### 4.2.6 Determinação de losartana potássica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas

Realizou-se a determinação de LOS em amostras farmacêuticas utilizando o método SWV proposto e o CB-CTS-EPC/GCE como sensor eletroquímico. A LOS também foi determinada empregando-se um método comparativo espectrofotométrico, e os resultados obtidos em triplicata usando-se os dois métodos são apresentados na TABELA 4.5. Os resultados obtidos empregando-se os dois métodos analíticos foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste-*t* pareado a um nível de confiança de 95%. O valor de  $t_{\text{exp}}$  (1,32) foi menor do que o valor de  $t_{\text{crítico}}$  (3,18), e, conseqüentemente, pode-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos. Além disso, os valores dos erros calculados variaram entre -1,0 % e

+5,6%, demonstrando a viabilidade de se empregar o método proposto para a determinação de LOS em produtos farmacêuticos.

TABELA 4.5 - Determinação de LOS em três amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n = 3)

Amostra	LOS (mg/comprimido)			Erro (%)*
	Valor rotulado	Método comparativo, C	Método proposto, P	
A	50,0	48,5 ± 0,8	48 ± 6	- 1,0
B	50,0	53,8 ± 0,2	56 ± 7	+ 4,1
C	100	90 ± 1	95 ± 7	+ 5,6

\*Erro (%) =  $[ C - P / C ] \times 100\%$ .

Por fim, foi realizada a determinação de LOS em amostras biológicas de urina e soro sintéticos. Foram preparadas soluções de duas concentrações de LOS  $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e estas foram analisadas em termos da porcentagem de recuperação da concentração da dopagem. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 4.6. Como pode ser observado, obteve-se porcentagens de recuperação satisfatórias na faixa de 98,3% a 105%, indicando assim, a potencialidade do procedimento proposto para a determinação de LOS em amostras biológicas de fluidos biológicos.

TABELA 4.6 - Determinação de LOS em amostra sintética de urina e soro humano

Amostra	LOS (mol L <sup>-1</sup> )		Recuperação* (%)
	Quantidade adicionada	Quantidade encontrada	
Urina	$9,90 \times 10^{-6}$	$(1,04 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	105
	$2,91 \times 10^{-5}$	$(2,90 \pm 0,20) \times 10^{-5}$	99,7
Soro humano	$9,90 \times 10^{-6}$	$(9,95 \pm 0,07) \times 10^{-5}$	101
	$2,91 \times 10^{-5}$	$(3,03 \pm 0,07) \times 10^{-5}$	104

\*Recuperação (%) =  $[\text{LOS}]_{\text{encontrado}}/[\text{LOS}]_{\text{adicionado}} \times 100$ .

### 4.3 Caracterização morfológica e eletroquímica do CB-CTS-AuNPs/GCE

Em continuação aos estudos dos sensores eletroquímicos propostos neste trabalho, foi desenvolvido um segundo procedimento voltamétrico utilizando o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE para a determinação de cetoconazol (CTO).

#### 4.3.1 Caracterização Morfológica

Inicialmente, foram obtidas as imagens de MEV para avaliar a morfologia do CB-CTS e CB-CTS-AuNPs sobre a superfície do GCE como apresentadas na FIGURA 4.11 (a-d). Pode-se observar na FIGURA 4.11 (a e b) referente ao CB-CTS, que houve a formação de um filme poroso. Já na FIGURA 4.11 (c e d) para o compósito CB-CTS-AuNPs, este também apresentou um filme poroso, entretanto não foi possível com estas imagens observar a presença das nanopartículas de ouro, uma vez que ao sintetizar o compósito, a CTS formou um filme polimérico englobando tanto o CB quanto as nanopartículas de ouro. Sendo

assim, foram realizados outros experimentos para verificar a presença das nanopartículas de ouro.

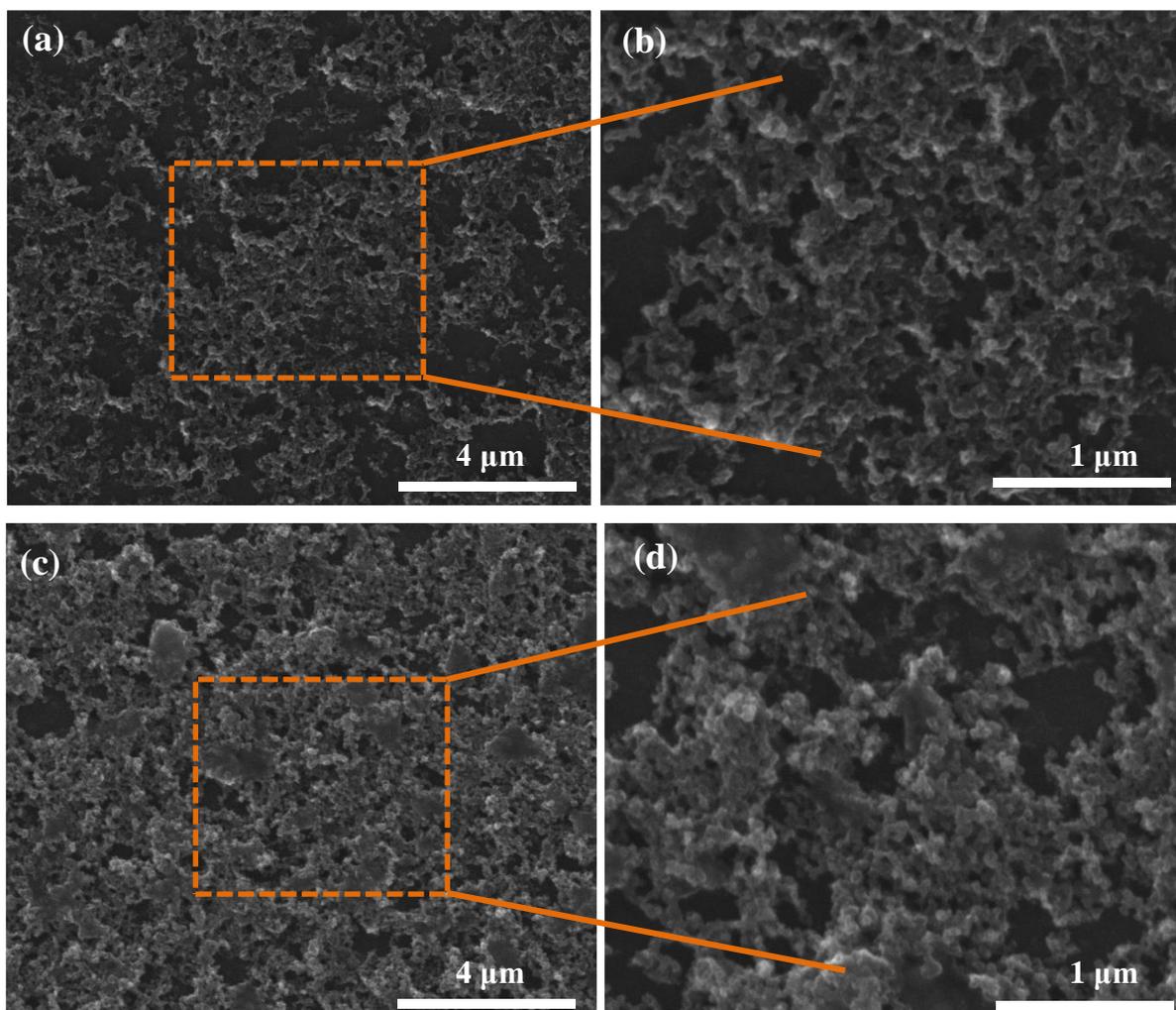


FIGURA 4.11 - Imagens obtidas por SEM do CB-CTS/GCE (a) e (b) e CB-CTS-AuNPs/GCE (c) e (d).

Também foi realizado o estudo de difração de raios-x (XRD, do inglês: *x-ray diffraction*) apresentado na FIGURA 4.12. As medidas cristalográficas foram comparadas com os valores de referência padrão cristalográficos do carbono amorfo e ouro, que apresentou picos de intensidade característicos para carbono (C) e ouro (111 e 220), segundo os valores de

referência cristalográfica (9008463) calculados utilizando o banco de dados do *Crystallography Open Database*.

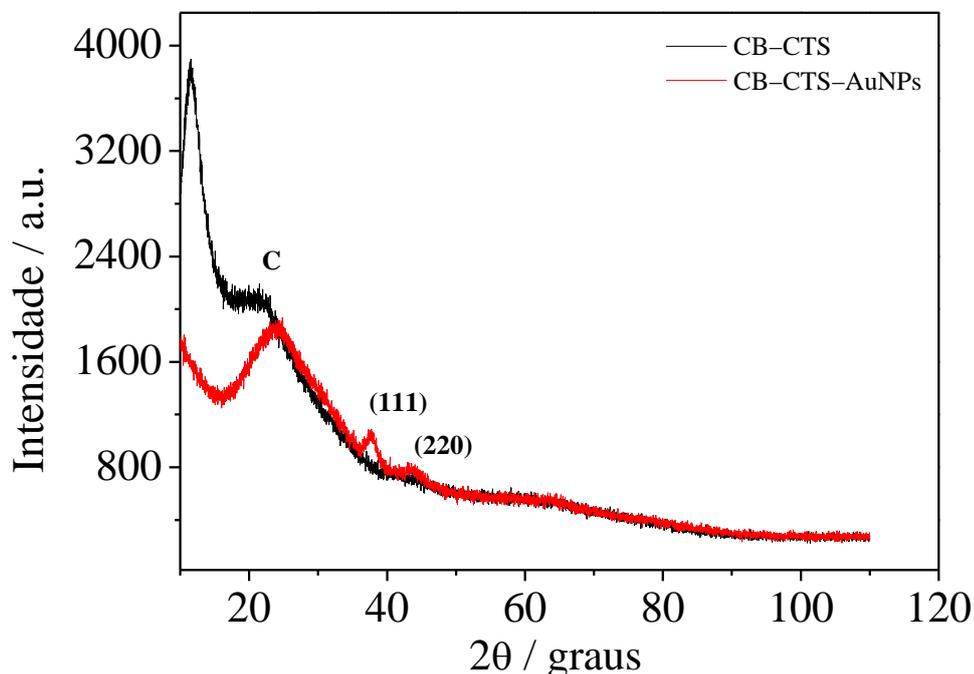


FIGURA 4.12 - Espectro de difração de raio-x para a amostra de CB-CTS (—) e CB-CTS-AuNPs (—).

### 4.3.2 Caracterização eletroquímica

Inicialmente foi estudado o perfil voltamétrico dos eletrodos CB-CTS-AuNPs/GCE, CB-CTS/GCE e GCE, em ácido sulfúrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>, para verificar a presença das nanopartículas de ouro. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na FIGURA 4.13. Como pode ser observado nesta figura, somente o eletrodo contendo AuNPs apresentou um pico anódico (P<sub>1</sub>) no potencial de + 1,3 V e um pico catódico (P<sub>2</sub>) no potencial de + 0,86 V em quando se ciclou o potencial de 0,6 a 1,6 V, o que comprova a presença das AuNPs no filme com CB e CTS. Nas equações de 4 a 6 estão apresentadas as reações das nanopartículas de ouro na superfície do eletrodo em meio de ácido sulfúrico<sup>107</sup>.

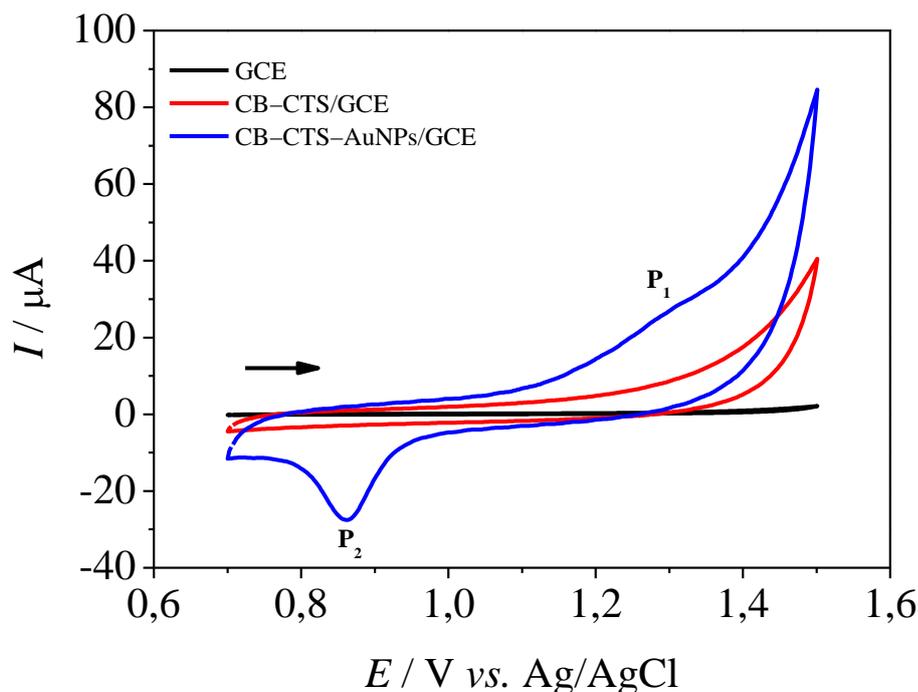
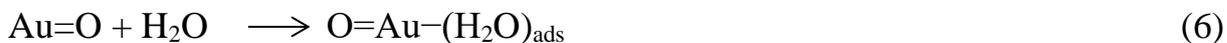


FIGURA 4.13 - Voltamogramas cíclicos para GCE (—), CB-CTS/GCE (—) e CB-CTS-AuNPs/GCE (—) em ácido sulfúrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Ainda utilizando a CV foi realizado o estudo de velocidade de varredura de potencial para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE, utilizando a sonda redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos, bem como os gráficos de corrente de pico anódica ( $I_a$ ) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) encontram-se registrados na FIGURA 4.14 (a, b, c e d). Verificou-se que com o aumento da velocidade de varredura, as correntes de pico anódica variaram

linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo de transporte de massa é controlado preferencialmente por difusão<sup>108</sup>.

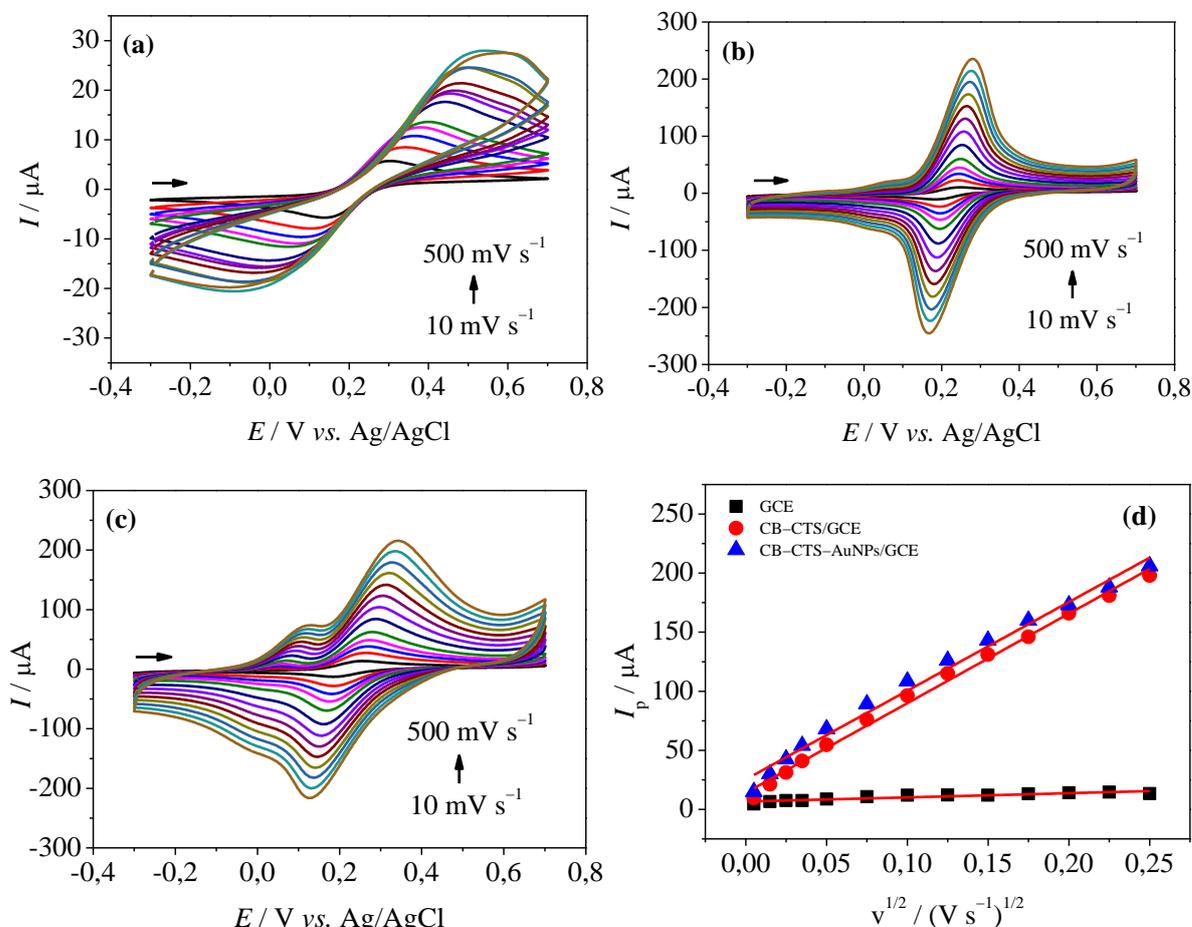


FIGURA 4.14 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 – 500  $mV s^{-1}$ ) para o eletrodo de GCE (b) CB-CTS/GCE e (c) CB-CTS-AuNPs/GCE em solução  $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$   $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$  em KCl 0,1  $mol L^{-1}$ . (d) Gráfico com o registro de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  para correntes de pico anódica ( $I_a$ ) para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE.

Em seguida, foi calculado a área eletroativa utilizando-se a equação de Randles-Sevcik (Eq. 2), apresentada anteriormente, sendo os resultados encontrados apresentados na

TABELA 4.7. Pode-se verificar, que não houve um aumento da área eletroativa tão significativo quando se preparou o eletrodo CB-CTS/GCE

contendo AuNPs para se obter o CB-CTS-AuNPs/GCE. Neste estudo foi empregado o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  na concentração supramencionada como sonda eletroquímica. Este comportamento já foi observado e relatado por Janegitz *et al*<sup>109</sup> e de Chikae *et al*<sup>110</sup> em que foram utilizados eletrodos modificados com AuNPs.

TABELA 4.7 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica em função de  $v^{1/2}$

<b>Eletrodo</b>	<b>Coeficiente angular (<math>\text{A V}^{-1/2} \text{s}^{1/2}</math>)</b>	<b>Área eletroativa (<math>\text{cm}^2</math>)</b>
<b>GCE</b>	$3,51 \times 10^{-5}$	0,0473
<b>CB-CTS/GCE</b>	$7,50 \times 10^{-4}$	1,01
<b>CB-CTS-AuNPs/GCE</b>	$7,80 \times 10^{-4}$	1,05

#### **4.4 Determinação voltamétrica de cetoconazol utilizando o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE**

Após realizar os estudos de caracterização eletroquímica e avaliação do desempenho eletroquímico empregando-se o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE, investigou-se em seguida a utilidade deste material eletrodo como sensor eletroquímico. O segundo procedimento eletroanalítico desenvolvido consistiu na determinação voltamétrica de CTO em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas, e os resultados obtidos são apresentados nas próximas seções.

##### **4.4.1 Comportamento eletroquímico da molécula de cetoconazol**

Primeiramente, foi avaliado o comportamento eletroquímico da molécula de CTO sobre os eletrodos de GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE utilizando a técnica de voltametria cíclica. Os

voltamogramas cíclicos obtidos são apresentados na FIGURA 4.15, para uma solução de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando como eletrólito suporte a solução de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 10). Como pode ser observado analisando-se os voltamogramas obtidos, houve a ocorrência de um pico anódico em aproximadamente  $+0,65 \text{ V}$ , e após a inversão da direção de varredura de potenciais não houve nenhum pico catódico. Desta forma, a oxidação da molécula de CTO pode ser caracterizada como um processo redox irreversível sobre CB-CTS-AuNPs/GCE.

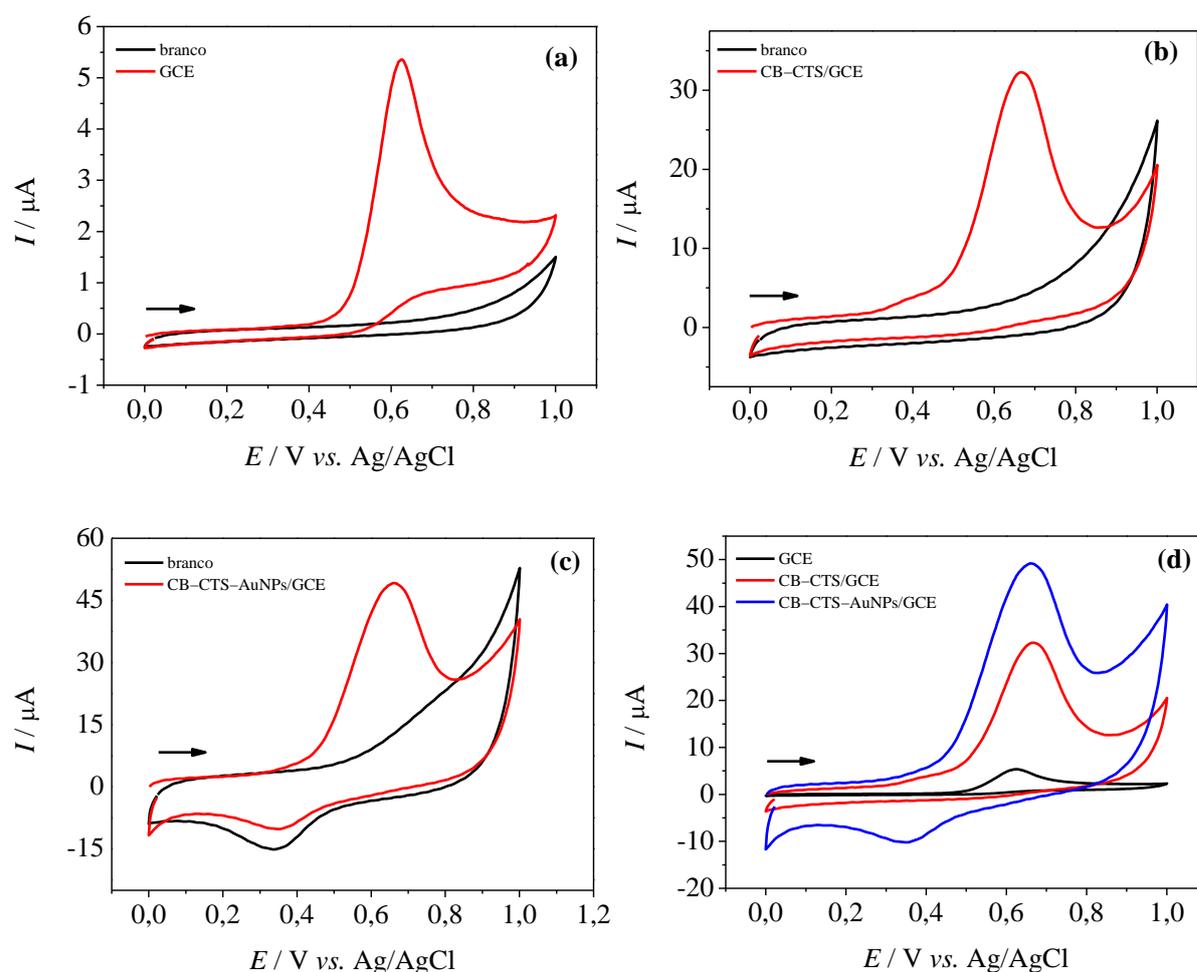


FIGURA 4.15 - Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 10) para o eletrodo de GCE (a), CB-CTS/GCE (b) e CB-CTS-AuNPs/GCE (c) na presença de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Comparação entre os três voltamogramas obtidos para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE (d).  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . “Branco” se refere ao voltamograma registrado para o tampão fosfato na ausência do composto CTO.

Assim, tem-se que o eletrodo CB-CTS-AuNPs/GCE demonstrou grande habilidade para a determinação do fármaco CTO. Além disso, proporcionou um aumento da intensidade de corrente de pico, sendo  $I_{pa} = + 4,41 \mu A$ ,  $I_{pa} = + 23,5 \mu A$  e  $I_{pa} = + 33,7 \mu A$  para GCE, CB-CTS/GCE e CB-CTS-AuNPs/GCE, respectivamente, ou seja, houve um aumento de aproximadamente 8 vezes quando comparado com a intensidade de corrente proporcionada pelo GCE.

#### 4.4.2 Efeito do pH e eletrólito suporte

Após avaliar o comportamento eletroquímico da molécula de CTO sobre diferentes eletrodos, foi estudada a influência do pH (concentração hidrogeniônica) sobre a resposta voltamétrica de CTO. Os voltamogramas cíclicos, apresentados na FIGURA 4.16, foram obtidos para a oxidação de CTO em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0) na presença de uma solução de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Pode-se observar a partir dos voltamogramas, que houve um deslocamento do potencial de oxidação para valores de potenciais menos positivos e também aumento da intensidade de corrente conforme o pH do tampão foi elevado. Foram construídos os gráficos de corrente de pico ( $I_p$ ) vs. pH (FIGURA 4.16 (b)) e potencial de pico ( $E_p$ ) vs. pH (FIGURA 4.16 (c)). Analisando os gráficos obtidos, observa-se que a intensidade de corrente foi mais pronunciada para a solução tampão de pH 9,0 e que houve uma quebra da linearidade entre os valores 6 e 7 (no gráfico de  $E_p$  vs. pH), o que está de acordo com o valor de  $pK_a$  do CTO (6,42). Levando-se em consideração a maior intensidade de corrente e melhor definição de pico, o pH 9,0 foi selecionado para a continuação dos estudos.

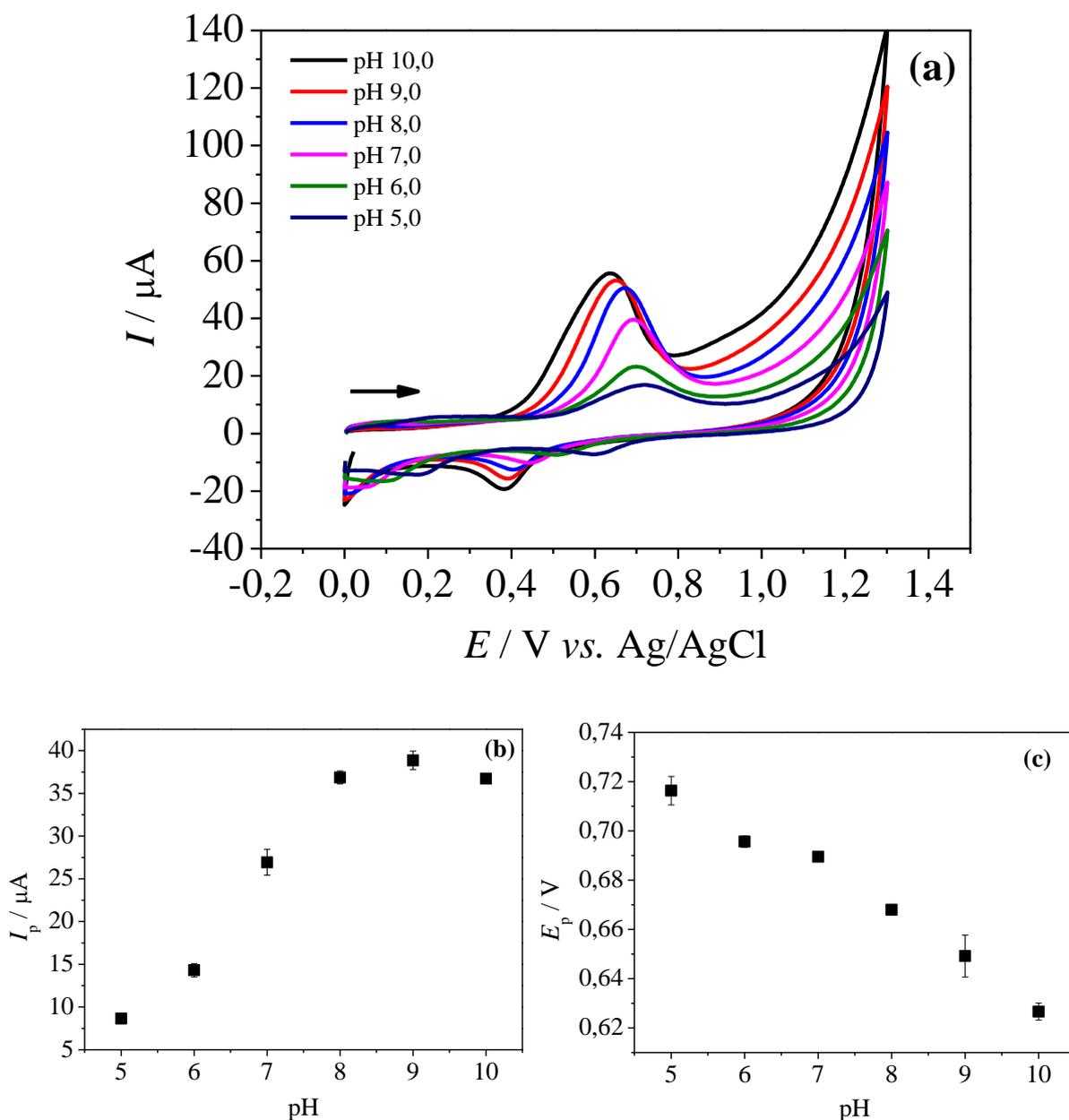


FIGURA 4.16 - Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para solução de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  nos diferentes valores de pHs (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0), empregando-se o CB-CTS-AuNPs/GCE.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  (a),  $I_p$  vs. pH (b) e  $E_p$  vs. pH (c).

Após a seleção do pH, foi estudado a influência da composição da solução do eletrólito suporte sobre a oxidação da molécula de CTO. Deste modo, foram realizadas medidas utilizando a voltametria cíclica para diferentes eletrólitos suporte contendo CTO com concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Os

eletrólitos suporte investigados foram os seguintes: tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 9,0); tampão Britton-Robinson (BR)  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 9,0) e cloreto de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ajustado com NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para pH 9,0. Os voltamogramas obtidos neste estudo estão apresentados na FIGURA 4.17. O potencial de pico foi praticamente o mesmo para o tampão fosfato e BR. Deste modo, foi selecionado como eletrólito suporte o tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para os estudos posteriores, uma vez que a composição deste eletrólito se aproxima da composição do meio biológico para a realização de análises em amostras biológicas.

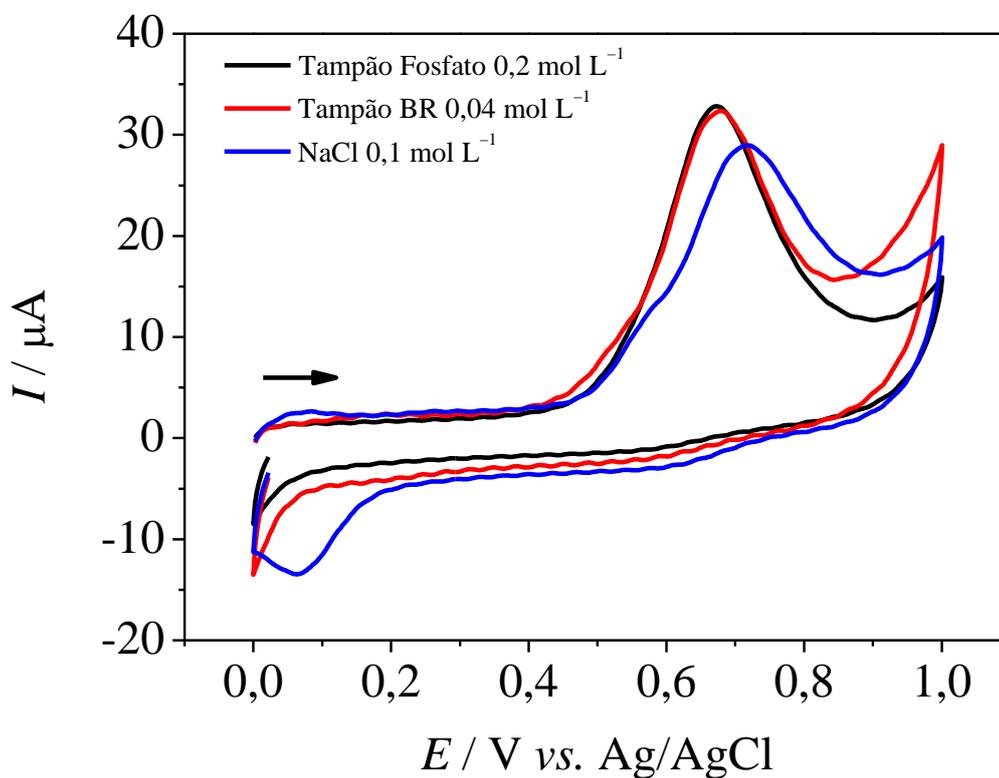


FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos para solução de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0) (—), tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 9,0 (—) e NaCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 9,0 (—).  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 4.4.3 Efeito da velocidade de varredura de potenciais

O efeito da velocidade de varredura de potenciais (10 a 200 mV s<sup>-1</sup>) sobre a resposta eletroquímica da CTO  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> foi estudado utilizando-se o CB-CTS-AuNPs/GCE empregando-se a CV em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0), como apresentado na FIGURA 4.18. A fim de avaliar se o processo de oxidação do CTO é controlado por difusão ou adsorção, foi contruído um gráfico do logaritmo da corrente de pico de oxidação ( $\log I_p$ ) *versus* o logaritmo da velocidade de varredura de potencial ( $\log v$ ) como apresentado na FIGURA 4.18 (b). Analisando-se os dados, pode-se verificar que houve uma relação linear ( $r = 0,991$ ) entre  $\log I_p$  e  $\log v$ , com o coeficiente angular da reta sendo igual a 0,521. Este valor indica que o processo de oxidação do CTO sobre a superfície do CB-CTS-AuNPs/GCE deve ser controlado preferencialmente pelo processo de difusão das espécies, uma vez que o valor obtido (0,52) está muito próximo de 0,50 que é o valor teórico obtido para moléculas com processos controlados por difusão<sup>108</sup>.

Ademais, foram avaliadas as relações entre corrente de pico anódica ( $I_p$ ) *vs.* velocidade de varredura ( $v$ ) e entre a corrente de pico anódica ( $I_p$ ) *vs.* a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ). A relação de  $I_p$  *vs.*  $v$  não foi linear, enquanto para  $I_p$  *vs.*  $v^{1/2}$  obteve-se uma relação linear ( $r = 0,990$ ), indicando assim que o processo de oxidação de CTO na superfície do eletrodo é controlado por difusão, o que está de acordo com os dados reportados na literatura<sup>95,98,111,112</sup>.

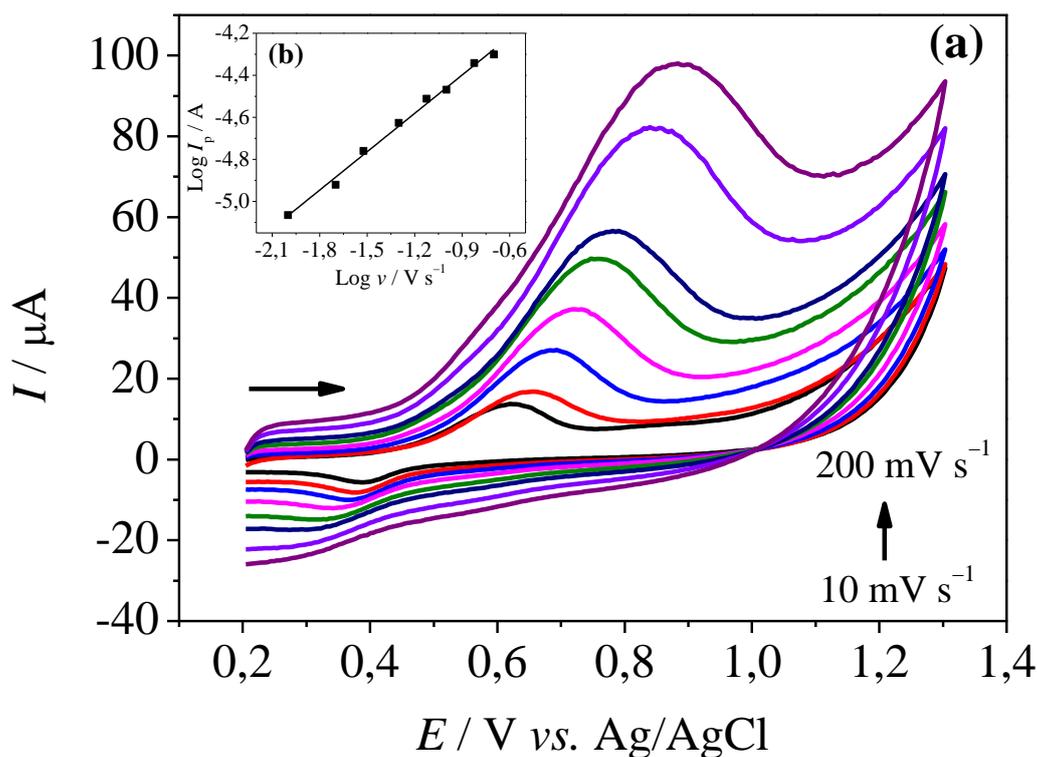


FIGURA 4.18 - Voltamogramas cíclicos para (a) CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0) para diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 e  $200 \text{ mV s}^{-1}$ ). Inserido: (b) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a CTO. Equação da reta:  $\log I_p = -3,90 + 0,521 \log \nu$  [CTO].

Ainda utilizando os dados obtidos do efeito da velocidade de varredura de potencial de potencial, foram obtidos os valores de  $E_p - E_{p1/2}$ , sendo a média foi calculada de 112 mV. Deste modo, empregando-se a Equação (3), descrita anteriormente, obteve-se o valor de  $an$  igual a 0,43. Em seguida, o número de elétrons foi calculado, utilizando-se  $\alpha = 0,50$  (valor atribuído para as moléculas orgânicas) resultou em um número de elétrons ( $n$ ) igual a em 0,86 ( $\approx 1$ ).

Na literatura<sup>113</sup> a reação de oxidação da molécula de CTO que envolve 1 elétron, forma um cátion radicalar que posteriormente decai de forma

gradual resultando em um produto estável. A perda deste elétron na reação pode ocorrer no anel imidazol ou no grupo metoxil da molécula de CTO.

#### 4.4.4 Otimização do parâmetros e curva analítica

Primeiramente foram estudados os parâmetros da SWV para o desenvolvimento do procedimento voltamétrico, empregando o o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE. Os parâmetros da técnica, como frequência ( $f$ ), amplitude de pulso ( $a$ ), e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) foram avaliados para solução de CTO  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0). Na TABELA 4.8 estão descritos os intervalos em que cada parâmetro foi estudado e os respectivos valores selecionados. Os valores selecionados foram avaliados levando-se em conta a estabilidade, repetibilidade, magnitude de corrente e menor contribuição de corrente de fundo.

TABELA 4.8 - Parâmetros experimentais estudados para a técnica de SWV e os respectivos valores selecionados para a determinação de CTO

Técnica	Parâmetro	Intervalo	Selecionado
SWV	Frequência (Hz)	10 a 50	10
	Amplitude (mV)	10 a 90	60
	Incremento (mV)	2 a 9	5

A curva analítica foi construída adicionando-se na célula eletroquímica, alíquotas sucessivas da solução estoque de CTO de forma a obter concentrações variando de  $1,00 \times 10^{-7}$  a  $2,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para as diferentes adições de concentrações de CTO são apresentados na FIGURA 4.19. A curva analítica (FIGURA 4.19, inserida) foi linear na faixa de concentração mencionada, e obedeceu a seguinte equação de regressão linear:  $I_p (\mu\text{A}) = - 1,8 \times 10^{-8} + 3,6 [\text{CTO}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ;  $r = 0,999$ . O

limite de detecção foi calculado como descrito na seção experimental, obtendo-se o valor de  $4,43 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> para a determinação de CTO com o sensor CB-CTS-AuNPs/GCE.

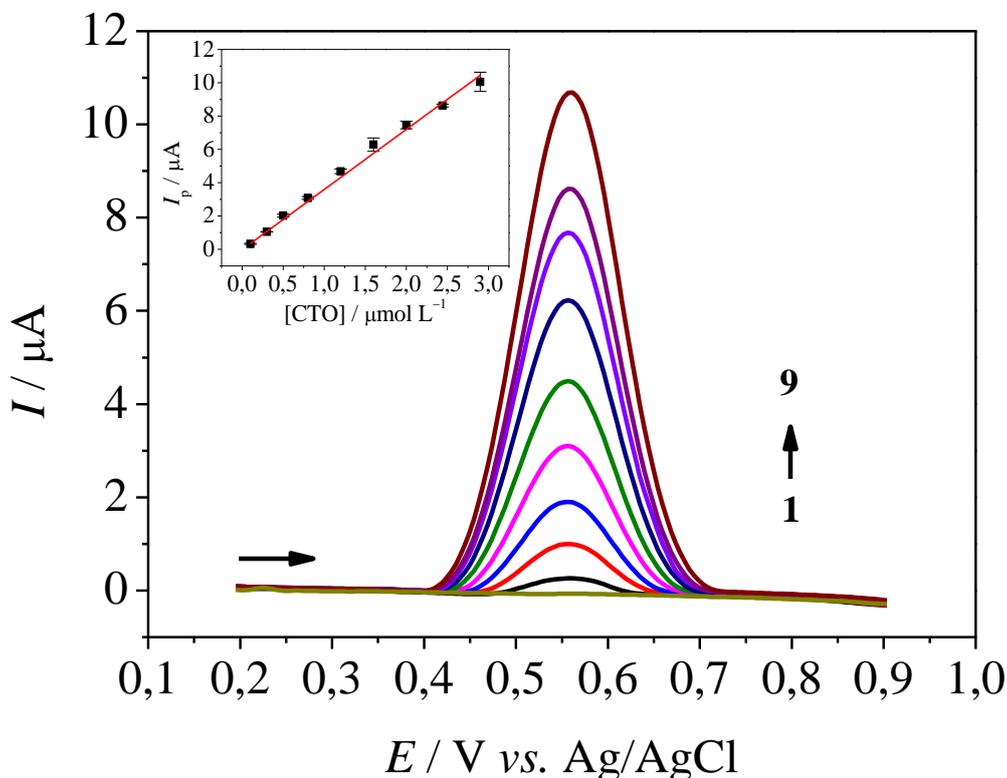


FIGURA 4.19 - Voltamogramas de SW obtidos usando o CB-CTS-AuNPs/GCE para diferentes concentrações de CTO em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0): (0) 0,0 (branco); (1) 0,100; (2) 0,299; (3) 0,497; (4) 0,794; (5) 1,19; (6) 1,57 e (7) 1,96; (8) 2,44 e (9) 2,91  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da SWV:  $f = 10 \text{ Hz}$ ,  $a = 60 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ . Inserido: Curva analítica ( $I_p$  vs. [CTO]).

Foi construída a TABELA 4.9 a fim de comparar os parâmetros analíticos obtidos do método proposto neste trabalho com alguns métodos já relatados na literatura para a determinação de CTO. Como pode ser observado, o procedimento empregando o CB-CTS-AuNPs/GCE como sensor eletroquímico e a SWV proporcionou uma faixa linear comparável com aquelas apresentadas em outros artigos empregando diferentes técnicas eletroanalíticas e outros tipos de

eletrodo. Além disso, obteve-se um limite de detecção inferior aos métodos comparados. Deste modo, com o eletrodo desenvolvido neste trabalho foi possível a obtenção de algumas vantagens como resposta rápida, facilidade na preparação do sensor e baixo custo de nanomaterial carbonáceo empregado.

TABELA 4.9 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura

<b>Eletrodo</b>	<b>Técnica</b>	<b>Faixa linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ref.</b>
Carbono	AdDPV	$2,4 \times 10^{-8}$ a $4,8 \times 10^{-7}$	$2,33 \times 10^{-8}$	81
BDD	SWV	$2,9 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-6}$	$8,29 \times 10^{-8}$	98
Pt	DPV	$5,7 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-6}$	113
AuNPs/GCE	CV	$2,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-6}$	95
GCE	SWV	$3,2 \times 10^{-7}$ a $9,6 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-6}$	112
MWCNTs/G CE	DPV	$1,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-5}$	$4,4 \times 10^{-7}$	84
p-AgSAE	SWV	$4,8 \times 10^{-7}$ a $4,3 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$	97
CB-CTS- AuNPs/GCE	SWV	$1,00 \times 10^{-7}$ a $2,90 \times 10^{-6}$	$4,43 \times 10^{-9}$	Este trabalho

BDD – Diamante dopado com boro (do inglês “Boron-Doped Diamond”); Pt – placa de platina; AuNPs/GCE – Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartícula de ouro; GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “Glassy Carbon Electrode”); MWCNTs/GCE – Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas; p-AgSAE - Eletrodo de amálgama sólido prateado polido; AdDPV – Voltametria de redissolução anódica adsortiva (do inglês “Adsorptive Stripping Voltammetry”); DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “Differential Pulse Voltammetry”); SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “Square Wave Voltammetry”); CV – Voltametria cíclica (do inglês “Cyclic Voltammetry”);

#### 4.4.5 Estudo de repetibilidade e interferentes

A fim de avaliar a precisão do procedimento voltamétrico proposto foram realizados estudos de repetibilidade intra e inter-dias. No estudo de repetibilidade intra-dia foram realizadas 10 medidas voltamétricas de SWV ( $n = 10$ ) sucessivas no mesmo dia, utilizando-se duas soluções de CTO ( $4,97 \times 10^{-7}$  e  $1,96 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) preparadas em etanol. Os valores de RSD obtidos para as correntes de pico anódica para as duas concentrações foram de 7,82 % e 9,04 %, respectivamente. No estudo de repetibilidade inter-dias foram comparadas as correntes de pico anódica das medidas voltamétricas realizadas em três dias diferentes ( $n = 3$ ), utilizando as mesmas concentrações de CTO utilizadas no estudo intra-dia. Os valores de RSD obtidos neste estudo foram de 3,59 % e 0,802%, respectivamente. Os resultados de RSD em ambos estudos demonstraram a boa estabilidade da resposta do eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE para a determinação de CTO.

Algumas das substâncias encontradas em amostras de formulações farmacêuticas de CTO foram avaliadas como sendo possíveis interferentes para a determinação voltamétrica de CTO. Deste modo, uma solução de CTO  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> foi analisada utilizando o eletrodo de CB-CTS-AuNPs/GCE na ausência e presença de cada uma das seguintes substâncias em proporções analito:interferente (1:1 e 1:10): celulose microcristalina, lactose monohidratada, estearato de magnésio e crospovidona. Os resultados em porcentagem de recuperação obtidos para a comparação dos sinais de corrente anódica registrados para as soluções de CTO na ausência e presença de cada um dos possíveis interferentes estão apresentados na TABELA 4.10. Pode-se verificar que a porcentagem de recuperação variou de -3,3 a +8,2%, não interferindo assim de forma significativa na determinação de CTO em amostras farmacêuticas.

TABELA 4.10 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de CTO a um nível de concentração de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 

Possível interferente	Razão analito:interferente	Recuperação (%)*
<b>Celulose monocristalina</b>	1:1	+7,5
	1:10	+6,8
<b>Lactose monohidratada</b>	1:1	+4,9
	1:10	-7,4
<b>Crospovidona</b>	1:1	-6,2
	1:10	+8,2
<b>Estearato de Magnésio</b>	1:1	-5,4
	1:10	-3,3

\*Recuperação =  $[(\text{Sinal CTO}_{\text{presença}} - \text{Sinal CTO}_{\text{ausência}}) / \text{Sinal CTO}_{\text{ausência}}] \times 100\%$ .

#### 4.4.6 Determinação de cetoconazol em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas

A aplicação do método voltamétrico proposto para a determinação de CTO foi empregada na análise de dois tipos diferentes de amostras farmacêuticas (comprimido e creme dermatológico) e fluidos biológicos sintéticos de urina e soro, utilizando-se o CB-CTS-AuNPs/GCE como sensor eletroquímico. Inicialmente, foram analisadas duas amostras farmacêuticas adquiridas no comércio local e contendo diferentes teores de CTO. Para fins de comparação, foi realizado a determinação destas amostras empregando-se o método de espectrofotometria UV-vis, os resultados obtidos em triplicata são apresentados na TABELA 4.11. Os valores de RSD obtidos estão dentro dos valores permitidos para a viabilização do método proposto para a determinação de CTO em amostras de produtos farmacêuticos.

TABELA 4.11 - Determinação de CTO em duas amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n = 3)

Amostra	CTO (mg)			RSD (%)*
	Valor rotulado	Método comparativo, C	Método proposto, P	
Comprimido	200	195 ± 1	215 ± 2	- 10
Creme dermatológico	20	21,1 ± 0,2	21,9 ± 0,2	- 3,8

\*RSD (%) =  $[C - P / C] \times 100\%$ .

Finalmente, foi realizada a determinação de CTO em amostras biológicas sintéticas de urina e soro humano. Foram preparadas soluções de duas concentrações diferentes de CTO  $4,97 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e estas foram analisadas em termos da porcentagem de recuperação da concentração de CTO. Os resultados obtidos estão descritos na TABELA 4.12. Analisando os resultados obtidos, pode-se verificar que as porcentagens de recuperação foram satisfatórias, indicando assim a potencialidade do método para a determinação de CTO em amostras biológicas.

TABELA 4.12 - Determinação de CTO em amostra sintética de urina e soro humano

Amostra	CTO ( $\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperação* (%)
	Quantidade adicionada	Quantidade encontrada	
Urina	$4,97 \times 10^{-7}$	$(5,3 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	107
	$1,96 \times 10^{-6}$	$(2,07 \pm 0,07) \times 10^{-6}$	106
Soro	$4,97 \times 10^{-7}$	$(5,44 \pm 0,06) \times 10^{-7}$	109
	$1,96 \times 10^{-6}$	$(2,1 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	106

\*Recuperação (%) =  $[CTO]_{\text{encontrado}}/[CTO]_{\text{adicionado}} \times 100$ .

## 5 CONCLUSÕES

Arquiteturas de sensores eletroquímicos foram propostos neste trabalho baseando-se em estudos prévios e demonstrando a eficiência do uso do CB como agente modificador.

Para o primeiro sensor proposto CB–CTS–EPC/GCE foi observado a estabilidade da dispersão ao formar um filme polimérico empregando a CTS reticulada com epicloridrina. Já para o segundo sensor CB–CTS–AuNPs/GCE foi sintetizado um compósito de forma rápida e simples, quando comparado com outros métodos dispostos na literatura, formando um compósito estável.

A SWV foi utilizada para o desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos propostos neste trabalho. Ambos os métodos desenvolvidos foram aplicados com sucesso na determinação de LOS e CTO em amostras comerciais de formulações farmacêuticas e fluidos biológicos sintéticos. Além disso, também foi avaliada e comprovada a estabilidade de resposta dos sensores desenvolvidos pelos estudos de repetibilidade intra e inter-dias.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram a potenciabilidade da aplicação do CB como agente modificador para a construção de novas arquiteturas de sensores eletroquímicos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZANONI, M.V.B.; BORGES, A.S.; BENEDETTI, A.V.; YAMANAKA, H.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; BESSEGATO, G.G.; STRADIOTTO, N.R.; ZANTA, C.L.D.P.E.S. & ANDRADE, A.R.D. "Panorama da eletroquímica e eletroanalítica no Brasil". *Quim. Nova*, **40**, 663, 2017.
2. GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. & NAMIEŚNIK, J. "The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices". *Trends Anal. Chem.*, **50**, 78, 2013.
3. SOUZA, M.F.B. "Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem". *Quim. Nova*, **20**, 191, 1997.
4. COX, J.A.; TESS, M.E. & CUMMINGS, T.E. "Electroanalytical methods based on modified electrodes: A review of recent advances". *Rev. Anal. Chem.*, **15**, 173, 1996.
5. LOWINSOHN, D. & BERTOTTI, M. "Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments". *Quim. Nova*, **29**, 1318, 2006.
6. STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H. & ZANONI, M.V.B. "Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **14**, 159, 2003.
7. ZARBIN, A.J.G. "(Nano) materials chemistry". *Quim. Nova*, **30**, 1469, 2007.
8. VICENTINI, F.C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; JANEGITZ, B.C.; MACHADO, S.A.S. & FATIBELLO-FILHO, O. "Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids". *Sens. Actuators, B*, **227**, 610, 2016.
9. DEROCO, P.B.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "An electrochemical sensor for the simultaneous determination of paracetamol and codeine using a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles and carbon black". *Electroanalysis*, **27**, 2214, 2015.
10. SARTORI, E.R.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Talanta*, **87**, 235, 2011.
11. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. & NIEMAN, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, 2002. 836 p.
12. SOUZA, D.D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V.A.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações". *Quim. Nova*, **27**, 790, 2004.
13. PEIXOTO, E.M.A. "Elemento Químico Carbono". *Quim. Nova Esc.*, 1997.

14. PIERSON, H.O., *Handbook of carbono, grafite, diamond and fullerenes: Properties, Processing and Applications*. 1993, Estados Unidos: Noyes Publications. 402 p.
15. LONG, C.M.; NASCARELLA, M.A. & VALBERG, P.A. "Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: Physical and chemical distinctions". *Environ. Pollut.*, **181**, 271, 2013.
16. SHREVE, R.N. & BRINK, J.A.J., *Indústrias de Processos Químicos*. 1980, Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 732 p.
17. JIANG, Z.H.; JIN, J.; XIAO, C.F. & LI, X. "Effect of surface modification of carbon black (CB) on the morphology and crystallization of poly(ethylene terephthalate)/CB masterbatch". *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **395**, 105, 2012.
18. VOLL, M. & KUHNER, G., *Manufacture of carbon black*. IN: *Carbon Black: Science and Technology*. 1993, New York: Marcell Dekker, Inc. 467 p.
19. SILVA, T.A.; MORAES, F.C.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review". *J. Nanomater.*, 2017.
20. ACCORSI, J. & YU, M., *Carbon Black: IN: Plastics Additives: An A-Z Reference*. 1998: Bristol, Chaoman and Hall.
21. CARMO, M.; DOS SANTOS, A.R.; POCO, J.G. & LINARDI, M. "Physical and electrochemical evaluation of commercial carbon black as electrocatalysts supports for DMFC applications". *J.Power Sources*, **173**, 860, 2007.
22. LÁZARO, M.; CALVILLO, L.; CELORRIO, V.; PARDO, J.; PERATHONER, S. & MOLINER, R. "Study and application of carbon black Vulcan XC-72R in polymeric electrolyte fuel cells". *Carbon Black: Production, Properties and Uses*: 41, 2011.
23. VULCAN® XC72 Conductive Carbon Black, <http://www.quintech.de/img/technische-informationen/MSDS-Datasheet/Katalysatoren/Datasheets/Datasheet-VULCAN-XC72.pdf>, accessed 08.02.2019.
24. VICENTINI, F.C.; RAVANINI, A.E.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.; INIESTA, J.; BANKS, C.E. & FATIBELLO-FILHO, O. "Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms". *Electrochim. Acta*, **157**, 125, 2015.
25. DEROCO, P.B.; MELO, I.G.; SILVA, L.S.R.; EGUILUZ, K.I.B.; SALAZAR-BANDA, G.R. & FATIBELLO-FILHO, O. "Carbon black supported Au-Pd core-shell nanoparticles within a dihexadecylphosphate film for the development of hydrazine electrochemical sensor". *Sens. Actuators, B*, **256**, 535, 2018.
26. DEROCO, P.B.; ROCHA, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "A new and simple method for the simultaneous determination of amoxicillin and

- nimesulide using carbon black within a dihexadecylphosphate film as electrochemical sensor". *Talanta*, **179**, 115, 2018.
27. VICENTINI, F.C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; JANEGITZ, B.C.; MACHADO, S.A.S. & FATIBELLO, O. "Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids". *Sens. Actuators, B*, **227**, 610, 2016.
  28. ARDUINI, F.; MAJORANI, C.; AMINE, A.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. "AACN Clinical Issues". *Electrochim. Acta*, **56**, 4209, 2011.
  29. SILVA, L.P.; VICENTINI, F.C.; LOURENCAO, B.C.; OLIVEIRA, G.G.; LANZA, M.R.V. & FATIBELLO-FILHO, O. "A new sensor architecture based on carbon Printex 6L to the electrochemical determination of ranitidine". *J. Solid State Electrochem.*, **20**, 2395, 2016.
  30. ARDUINI, F.; DI NARDO, F.; AMINE, A.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. & MOSCONE, D. "Carbon black-modified screen-printed electrodes as electroanalytical tools". *Electroanalysis*, **24**, 743, 2012.
  31. ARDUINI, F.; DI GIORGIO, F.; AMINE, A.; CATALDO, F.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. "Electroanalytical characterization of carbon black nanomaterial paste electrode: Development of highly sensitive tyrosinase biosensor for catechol detection". *Anal. Lett.*, **43**, 1688, 2010.
  32. POOLE, C.P.J., *Introduction to nanotechnology* 2003, Willey interscience. p.
  33. WANG, Y. & HERRON, N. "Chemical Effects on the optical-properties of semiconductor particles". *J. Phys. Chem.*, **91**, 5005, 1987.
  34. ALIVISATOS, A.P.; HARRIS, A.L.; LEVINOS, N.J.; STEIGERWALD, M.L. & BRUS, L.E. "Electronic states of semiconductor clusters - homogeneous and inhomogeneous broadening of optical-spectrum". *J. Chem. Phys.*, **89**, 4001, 1988.
  35. BRUS, L. "Electronic wave-functions in semiconductor clusters - experiment and theory". *J. Phys. Chem.*, **90**, 2555, 1986.
  36. BRUST, M. & KIELY, C.J. "Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review". *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **202**, 175, 2002.
  37. XIA, Y.N.; XIONG, Y.J.; LIM, B. & SKRABALAK, S.E. "Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?". *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 60, 2009.
  38. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C. & HILLIER, J. "A study of nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discuss. Faraday Soc.*, 55, 1951.
  39. BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D.J. & WHYMAN, R. "Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system". *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, 801, 1994.
  40. XIAO, L.; WILDGOOSE, G.G. & COMPTON, R.G. "Sensitive electrochemical detection of arsenic (III) using gold nanoparticle modified

- carbon nanotubes via anodic stripping voltammetry". *Anal. Chim. Acta*, **620**, 44, 2008.
41. BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G.G.; COMPTON, R.G.; SHAO, L.D. & GREEN, M.L.H. "Copper oxide nanoparticle impurities are responsible for the electroanalytical detection of glucose seen using multiwalled carbon nanotubes". *Sens. Actuators, B*, **132**, 356, 2008.
  42. COMPTON, R.G.; WILDGOOSE, G.G.; REES, N.V.; STREETER, I. & BARON, R. "Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays". *Chem. Phys. Lett.*, **459**, 1, 2008.
  43. CAMPBELL, F.W. & COMPTON, R.G. "The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review". *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 241, 2010.
  44. BARON, R.; CAMPBELL, F.W.; STREETER, I.; XIAO, L. & COMPTON, R.G. "Facile method for the construction of random nanoparticle arrays on a carbon support for the development of well-defined catalytic surfaces". *Int. J. Electrochem. Sci.*, **3**, 556, 2008.
  45. SANTOS, A.M.; WONG, A. & FATIBELLO, O. "Simultaneous determination of salbutamol and propranolol in biological fluid samples using an electrochemical sensor based on functionalized-graphene, ionic liquid and silver nanoparticles". *J. Electroanal. Chem.*, **824**, 1, 2018.
  46. ZHAO, Z.L.; LI, C.P. & WU, H.X. "Reduced graphene oxide nanosheets modified with plasmonic gold-based hybrid nanostructures and with magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for cyclic voltammetric determination of arsenic(III)". *Microchim. Acta*, **186**, 2019.
  47. PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.D. & KUBOTA, L.T. "Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications". *Quim. Nova*, **25**, 1012, 2002.
  48. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M.A. "Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors". *Electrochim. Acta*, **55**, 6239, 2010.
  49. JANEGITZ, B.C.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; DOS SANTOS, F.A.; OLIVEIRA, G.G.; MACHADO, S.A.S.; LANZA, M.R.V.; FATIBELLO-FILHO, O. & ZUCOLOTTO, V. "The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing". *Sens. Actuators, B*, **220**, 805, 2015.
  50. KONG, B.S.; YOO, H.W. & JUNG, H.T. "Electrical Conductivity of Graphene Films with a Poly(allylamine hydrochloride) Supporting Layer". *Langmuir*, **25**, 11008, 2009.
  51. GONSALVES, A.D.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F. & ABREU, F.C.D. "Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana". *Quim. Nova*, **34**, 1215, 2011.
  52. MIRZAIE, A.; HASANZADEH, M. & JOUYBAN, A. "Cross-linked chitosan/thiolated graphene quantum dots as a biocompatible

- polysaccharide towards aptamer immobilization". *Int J Biol Macromol*, **123**, 1091, 2019.
53. PATRI, S.B.; ADARAKATTI, P.S. & MALINGAPPA, P. "Silver Nanoparticles-Chitosan Composite Embedded Graphite Screen-Printed Electrodes as a Novel Electrochemical Platform in the Measurement of Trace Level Nitrite: Application to Milk Powder Samples". *Curr. Anal. Chem.*, **15**, 56, 2019.
54. RASSAS, I.; BRAIEK, M.; BONHOMME, A.; BESSUEILLE, F.; RAFIN, G.; MAJDOUB, H. & JAFFREZIC-RENAULT, N. "Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex". *Mater. Sci. Eng., C*, **95**, 152, 2019.
55. SANTOS, A.M.; WONG, A.; CINCOTTO, F.H.; MORAES, F.C. & FATIBELLO, O. "Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of norfloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black and CdTe quantum dots in a chitosan film". *Microchim. Acta*, **186**, 2019.
56. SONG, J.J.; ZHAO, L.; WANG, Y.S.; XUE, Y.; DENG, Y.J.; ZHAO, X.H. & LI, Q. "Carbon Quantum Dots Prepared with Chitosan for Synthesis of CQDs/AuNPs for Iodine Ions Detection". *Nanomaterials*, **8**, 2018.
57. WONG, A.; RAZZINO, C.A.; SILVA, T.A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film". *Sens. Actuators, B*, **231**, 183, 2016.
58. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M.A. "Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite-Epoxy Composite Electrode". *Anal. Chem.*, **81**, 5364, 2009.
59. SAHIN, M.; KOCAK, N.; ARSLAN, G. & UCAN, H.I. "Synthesis of Crosslinked Chitosan with Epichlorohydrin Possessing Two Novel Polymeric Ligands and Its Use in Metal Removal". *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, **21**, 69, 2011.
60. Ministério da saúde: Cadernos de Atenção Básica - nº 15. 2006.
61. Ministério da Saúde: Hipertensão (pressão alta): causas, sintomas, diagnóstico, tratamento e prevenção. 2019.
62. KOHLMANN JR, O.; GUS, M.; RIBEIRO, A.B.; VIANNA, D.; COELHO, E.B.; BARBOSA, E.; ALMEIDA, F.A.; FEITOSA, G.; MORENO, H.; GUIMARÃES, J.I.; RIBEIRO, J.P.; RAMIREZ, J.A.F.; MARTINS, J.F.V. & SANTOS, R.A.S.D. "Tratamento medicamentoso". *Braz. J. Nephrol.*, **32**, 29, 2010.
63. GARDENAL, M.C.S.; TEIXEIRA, C.R.T.; DALL'ANTONIA, L.H. & SARTORI, E.R. "Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and

- losartan in pharmaceutical formulations". *Sens. Actuators, B*, **188**, 263, 2013.
64. *Anvisa: Losartana Potássica*. 1999.
65. AYAD, M.M.; ABDELLATEF, H.E.; HOSNY, M.M. & KABIL, N.A.S. "High Performance Liquid Chromatographic estimation of pioglitazone hydrochloride and losartan potassium". *Main Group Chem.*, **17**, 247, 2018.
66. BABARAHIMI, V.; TALEBPOUR, Z.; HAGHIGHI, F.; ADIB, N. & VAHIDI, F. "Validated determination of losartan and valsartan in human plasma by stir bar sorptive extraction based on acrylate monolithic polymer, liquid chromatographic analysis and experimental design methodology". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **153**, 204, 2018.
67. HASHEM, H.; IBRAHIM, A.E. & ELHENAWEE, M. "Simultaneous determination of the antihypertensives hydrochlorothiazide, losartan potassium, irbesartan and valsartan in bulk powders and pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography". *Main Group Chem.*, **15** (4): 335, 2016.
68. LI, L.X.; LAI, C.Y.; XUAN, X.Y.; GAO, C.K. & LI, N. "Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Losartan Potassium in Osmotic Pump Tablets by Microemulsion Liquid Chromatography". *J. Chromatogr. Sci.*, **54**, 1415, 2016.
69. PEBDANI, A.A.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A.M.H.; KHODADOUST, S. & HAGHGOO, S. "Application of modified stir bar with nickel:zinc sulphide nanoparticles loaded on activated carbon as a sorbent for preconcentration of losartan and valsartan and their determination by high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1437**, 15, 2016.
70. TSVETKOVA, D.D. & IVANOVA, S.A. "Application of uv-spectrophotometric method for determination of losartan potassium in tablets". *Indo Am. J. Pharm. Sci.*, **5**, 8393, 2018.
71. TAHER, M.A.; ASADOLLAHZADEH, H. & FAZELIRAD, H. "A Simple Spectrofluorimetric Method for the Determination of Losartan in Some Tablet Dosage Forms". *J. Appl. Spectrosc.*, **82**, 842, 2015.
72. DEMIRKAYA-MILOGLU, F.; POLATDEMIR, E.; SENOL, O. & KADIOGLU, Y. "Design and Optimization of a Novel Spectrophotometric Method using Response Surface Methodology for the Determination of Losartan Potassium in Pharmaceuticals". *Curr. Pharm. Anal.*, **13**, 552, 2017.
73. BAGHERI, H.; SHIRZADMEHR, A. & REZAEI, M. "Designing and fabrication of new molecularly imprinted polymer-based potentiometric nano-graphene/ionic liquid/carbon paste electrode for the determination of losartan". *J. Mol. Liq.*, **212**, 96, 2015.
74. RAJPUROHIT, A.S.; BORA, D.K. & SRIVASTAVA, A.K. "Simultaneous determination of amlodipine and losartan using an iron metal-organic framework/mesoporous carbon nanocomposite-modified glassy carbon

- electrode by differential pulse voltammetry". *Anal. Methods*, **10**, 5423, 2018.
75. SANTOS, M.C.G.; TARLEY, C.R.T.; DALL'ANTONIA, L.H. & SARTORI, E.R. "Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations". *Sens. Actuators, B*, **188**, 263, 2013.
76. ZAREH, M.M.; ELGENDY, K.; WASSEL, A.A.; FATHY, A. & ABD ALKAREM, Y.M. "Plastic Sensor for Losartan Potassium Determination based on Ferrocene and Ionic Liquid". *Int. J. Electrochem. Sci.*, **13**, 1260, 2018.
77. ENSAFI, A.A. & HAJIAN, R. "Determination of Losartan and Triamterene in Pharmaceutical Compounds and Urine Using Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry". *Anal. Sci.*, **24**, 1449, 2008.
78. ROTTA, I.; OTUKI, M.F.; SANCHES, A.C.C. & CORRER, C.J. "Eficácia de antifúngicos tópicos em diferentes dermatomicoses: uma revisão sistemática com metanálise". *Rev. Assoc. Med. Bras.*, **58**, 308, 2012.
79. BERGOLD, A.M. & GEORGIADIS, S. "Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão". *Visão Acadêmica*, **5**, 159, 2004.
80. GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M.A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C. & ASSOC, L.P. "The burden of serious human fungal infections in Brazil". *Mycoses*, **59**, 145, 2016.
81. SHAMSIPUR, M. & FARHADI, K. "Adsorptive stripping voltammetric determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations and urine using carbon paste electrodes". *Analyst*, **125**, 1639, 2000.
82. *Pharmanostra: Cetoconazol antifúngico*. 2015.
83. *Anvisa: Cetoconazol*. 2013.
84. BOROWIEC, J.; WEI, L.L.; ZHU, L.H. & ZHANG, J.D. "Multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for sensitive determination of ketoconazole". *Anal. Methods*, **4**, 444, 2012.
85. AL-SHALALFEH, M.M.; ONAWOLE, A.T.; SALEH, T.A. & AL-SAAD, A.A. "Spherical silver nanoparticles as substrates in surface-enhanced Raman spectroscopy for enhanced characterization of ketoconazole". *Mater. Sci. Eng., C*, **76**, 356, 2017.
86. FRAIHAT, S.M. "A sequential injection system for spectrophotometric determination of ketoconazole". *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, **8**, 232, 2014.
87. FRAIHAT, S.M. & BAHGAT, K.M. "Spectrophotometric Methods for the Determination of Ketoconazole in Pharmaceutical Dosage Forms". *Trop. J. Pharm. Res.*, **13**, 1511, 2014.
88. AGUILAR-CARRASCO, J.C.; CARRASCO-PORTUGAL, M.C.; FLORES-MURRIETA, F.J.; LOPEZ-CANALES, J.S. & LOZANO-CUENCA, J. "Determination of Ketoconazole in Micro-Samples of Human Plasma by

- HPLC with Fluorescence Detection. Application in a Pharmacokinetic Study". *Lat. Am. J. Pharm.*, **35**, 2254, 2016.
89. HAMDY, D.A. & BROCKS, D.R. "High performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of midazolam and ketoconazole in plasma". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **53**, 617, 2010.
90. KIM, S.H.; SHRESTHA, A.; HOANG, N.H.; HUONG, N.L. & PARK, J.W. "Ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of ketoconazole in anti-dandruff shampoo". *Anal. Lett.*, **47**, 1465, 2014.
91. POPOVSKA, O.; KAVRAKOVSKI, Z. & RAFAJLOVSKA, V. "A RP-HPLC Method for the Determination of Ketoconazole in Pharmaceutical Dosage Forms". *Curr. Pharm. Anal.*, **13**, 505, 2017.
92. SAINT MARTIN, E.E.; SARATSIAN, A.K.; FRINO, R.M.; GOMEZ, M.E.; SPINETTO, M.E.; NUNEZ, M. & FERNICOLA, M. "Analytical HPLC Method for Ketoconazole Assay in Tablets: Development, Validation and Application for Drug Product Analysis". *Lat. Am. J. Pharm.*, **35**, 1163, 2016.
93. SAYSIN, S.; LIAWRUANGRATH, B. & LIAWRUANGRATH, S. "High-performance thin-layer chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations". *J. Cosmet. Sci.*, **61**, 367, 2010.
94. XIA, Y.T.; ZHI, X.R.; WANG, X.H.; CHEN, M. & CHENG, J. "Ultrasound-enhanced surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for determination of ketoconazole and econazole nitrate in human blood". *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 1241, 2012.
95. ALSHALALFEH, M.M.; SOHAIL, M.; SALEH, T.A. & AZIZ, M.A. "Electrochemical Investigation of Gold Nanoparticle-Modified Glassy Carbon Electrode and its Application in Ketoconazole Determination". *Aust. J. Chem.*, **69**, 1314, 2016.
96. ARRANZ, P.; ARRANZ, A.; MOREDA, J.M.; CID, A. & ARRANZ, J.F. "Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 589, 2003.
97. DANTAS, A.N.D.; DE SOUZA, D.; DE LIMA, J.E.S.; DE LIMA-NETO, P. & CORREIA, A.N. "Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode". *Electrochim. Acta*, **55**, 9083, 2010.
98. MIELECH-LUKASIEWICZ, K. & ROGINSKA, K. "Voltammetric determination of antifungal agents in pharmaceuticals and cosmetics using boron-doped diamond electrodes". *Anal. Methods*, **6**, 7912, 2014.
99. THOMAS, A.B.; CHAUDHARI, A.A.; NANDA, R.K.; KOTHAPALLI, L.P.; CHAVAN, U.B. & DESHPANDE, A.D. "Simultaneous

- Determination of Enalapril and Losartan in Pharmaceutical Preparations by UV Spectrophotometry and LC". *Chromatographia*, **69**, 1485, 2009.
100. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A. "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth*, **233**, 367, 2001.
  101. PARHAM, H.; ZARGAR, B. & KHOSHNAM, F. "Ultrasonic-assisted solid-phase extraction pre-concentration and determination of nicotinamide and nicotinic acid by high-performance liquid chromatography using anthracite". *Food Anal. Methods*, **8**, 2235, 2015.
  102. BARD, A.J. & L.R., F., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2001, John Wiley & Sons: New York.
  103. LIU, E. & ZHANG, X. "Electrochemical sensor for endocrine disruptor bisphenol A based on a glassy carbon electrode modified with silica and nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles". *Anal. Methods*, **6**, 8604, 2014.
  104. ASSUMPÇÃO, M.H.M.T.; DE SOUZA, R.F.B.; RASCIO, D.C.; SILVA, J.C.M.; CALEGARO, M.L.; GAUBEUR, I.; PAIXÃO, T.R.L.C.; HAMMER, P.; LANZA, M.R.V. & SANTOS, M.C. "A comparative study of the electrogeneration of hydrogen peroxide using Vulcan and Printex carbon supports". *Carbon*, **49**, 2842, 2011.
  105. GOSSER, D.K., *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993, Wiley-VCH: New York. 154 p.
  106. KISSINGER, P.T. & HEINEMAN, W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. 1996, Marcel Dekker, Inc.: New York.
  107. WANG, Y.; LABORDA, E.; CROSSLEY, A. & COMPTON, R.G. "Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behaviour of 'macro' gold". *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 3133, 2013.
  108. BRETT, C.M.A. & BRETT, A.M.O., *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. 1993, Oxford Science Publications: Oxford.
  109. JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA, R.C. & FATIBELLO, O. "Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode". *Diamond Relat. Mater.*, **25**, 128, 2012.
  110. CHIKAE, M.; IDEGAMI, K.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; ISHIKAWA, M.; TAKAMURA, Y. & TAMIYA, E. "Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode". *Electrochem. Commun.*, **8**, 1375, 2006.
  111. EMAMI, M.; SHAMSIPUR, M. & SABER, R. "Design of poly-l-methionine-gold nanocomposit/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for determination of amlodipine in human biological fluids". *J. Solid State Electrochem.*, **18**, 985, 2014.

112. MIELECH-LUKASIEWICZ, K.; PUZANOWSKA-TARASIEWICZ, H. & NIEDZIELKO, A. "Electrooxidation of Some Antifungal Agents and Their Square-Wave Voltammetric Determination in Cosmetics and Pharmaceutics". *Anal. Lett.*, **44**, 955, 2011.
113. SHAMSIPUR, M. & FARHADI, K. "Electrochemical behavior and determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations". *Electroanalysis*, **12**, 429, 2000.