

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
GRUPO DE ELETROQUÍMICA E CORROSÃO

**ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS**

ESTUDOS ELETROANALÍTICOS E MECANÍSTICOS DE  
CETOCONAZOL UTILIZANDO ELETRODO SÓLIDO DE  
AMÁLGAMA DE PRATA (p-AgSAE)

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade  
Federal do Ceará como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Química  
com área de concentração em  
Química Analítica.

**Orientadora: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia**

**FORTALEZA-CE  
JANEIRO - 2010**

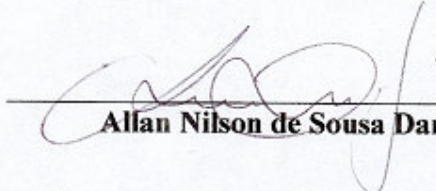
**ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS**

**ESTUDOS ELETROANALÍTICOS E MECANÍSTICOS DE**

**CETOCONAZOL UTILIZANDO ELETRODO SÓLIDO DE**

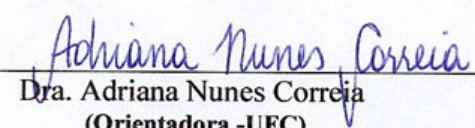
**AMÁLGAMA DE PRATA (p-AgSAE)**

Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Analítica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

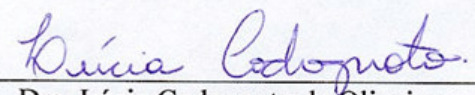


\_\_\_\_\_  
Allan Nilson de Sousa Dantas

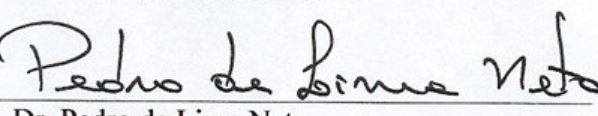
Dissertação aprovada em: **26/01/2010**



\_\_\_\_\_  
Dra. Adriana Nunes Correia  
(Orientadora -UFC)



\_\_\_\_\_  
Dra. Lúcia Codognoto de Oliveira  
(UNICASTELO)



\_\_\_\_\_  
Dr. Pedro de Lima Neto  
(UFC)



**Como forma de estímulo à preservação do meio ambiente, este  
trabalho foi impresso utilizando papel reciclado.**



**A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu  
tamanho original.**

**Albert Einstein**

## ***Agradecimentos***

*Agradeço primeiramente ao senhor meu Deus pela força concedida durante esta jornada.*

*Aos meus pais, Nilta e Dantas, pelo esforço, amor e carinho concedidos durante toda esta vida. Aos meus irmãos Anderson (in memorian), Karine e Rafaelle.*

*À Gisele, pelo companheirismo, pela primeira oportunidade na pesquisa, pelo carinho e afeto, pela paciência e todo o incentivo do dia a dia. Enfim, a você “Gi”, meu muito obrigado.*

*À Profa. Dra. Adriana Nunes Correia (minha orientadora) que sempre esteve presente, apoiando e cedendo seus conhecimentos, pela paciência e por todos os fios de cabelos brancos que tenha ganhado por minha conta.*

*À Djenaine de Souza, pelo auxílio e concessão do “bichão – p-AgSAE”, assim como a co-orientação durante todas as etapas do trabalho.*

*Ao Prof. Pedro de Lima Neto pelo apoio e atenção sempre que necessário.*

*À Profa. Dra. Janete Eliza Soares de Lima do Departamento de Farmácia da FFOE-UFC pela concessão do fármaco utilizado neste trabalho.*

*À Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro Sales e ao Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza, responsáveis pelo Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica – LIEC da UFSCar, onde parte deste trabalho foi desenvolvida.*

*Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira da UFSCar, que realizou as medidas de Ressonância Magnéticas Nuclear.*

*À Profa. Dra. Káthia Maria Honório da USP e aos meus amigos do GELCORR Leandro e Junior pelo auxílio nos estudos teóricos.*

*Ao GELCORR (“pense num povo bom”): Alexsander, Amanda, Andressa, Célia (legal quando ela se assusta), Cris, Gustavo (leitas), J. Junior (torcedor do ferrim), Leandro (do forrozão Garota Safada), Luanna (héhéhéhé), Naftali (pela 3º vez...), Nathalie (da santa*



*trindade), Othon (Piiii), Rafael (150 %), Roger (gobê), Sâmeque (isso tudo é ilusão), Sanderlir (San), Thisi, Vanessa (da mata), Wirley (chaique, olha o 9050).*

*A todos os meus amigos e aos companheiros do aguerrido FQFC – Físico-Química Futebol Clube, pelos momentos de alegria e pelos retornos para casa com a sacola cheia (de gols).*

*Ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade.*

*Aos membros da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química e a todo o corpo docente.*

*À FUNCAP, pela concessão da bolsa de estudos*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fármacos no organismo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Agentes antifúngicos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Atividade antifúngica dos azóis .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Cetoconazol e suas propriedades físico-químicas.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3 Farmacocinética do Cetoconazol .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.4 Metodologias empregadas na determinação de CTZ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Técnica utilizada: Voltametria de Onda Quadrada .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Eletrodo Sólido de Amálgama de Prata.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 Utilização de eletrodos sólidos de amálgama .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Teoria Químico-Quântica .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4.1 Energia dos orbitais de fronteira.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.2 Distribuição de cargas na molécula.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios-X... 23</b>	
<b>1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Equipamentos, programas e acessórios .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Reagentes e Soluções.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1 Eletrólitos de suporte .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2 Reagentes diversos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3 Solução de Cetoconazol.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.4 Solução de comprimido Cetoneo<sup>®</sup> .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.5 Soluções de creme e de xampu Cetoneo<sup>®</sup> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Eletrodos e sistema eletroquímico .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.1 Eletrodo de trabalho .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2 Eletrodo de referência.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.3 Eletrodo auxiliar .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.4 Sistema eletroquímico.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Caracterização da superfície eletródica.....</b>	<b>31</b>



<b>3.4 Estudos eletroanalíticos e eletroquímicos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2 Estudo do eletrólito suporte e pH .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3 Estabelecimento da metodologia eletroanalítica .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.4 Eletrólise com potencial controlado.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.6 Estudo Químico-Quântico .....</b>	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Ativação do eletrodo de trabalho .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Caracterização da superfície eletródica do p-AgSAE .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios-X</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Estudos analíticos para Cetoconazol sobre p-AgSAE .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.1 Estudo do eletrólito de suporte .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.2 Estudo do pH para o tampão BR.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.4 Componentes da Voltametria de Onda Quadrada .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.3 Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.3.1 Frequência de aplicação do pulso de potencial .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3.3.2 Amplitude de aplicação do pulso de potencial .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.3.3 Incremento de aplicação do pulso de potencial.....</b>	<b>53</b>
<b>4.3.4 Estudos da influência da pré-concentração.....</b>	<b>55</b>
<b>4.4 Validação da metodologia eletroanalítica .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.1 Estudo da região de linearidade e determinação da curva analítica .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.2 Cálculo dos limites de detecção e de quantificação .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4.3 Precisão da metodologia eletroanalítica .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4.5 Estudo de robustez da metodologia eletroanalítica.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.6 Estudos de exatidão da metodologia eletroanalítica .....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.5.1 Estudo da taxa de recuperação em amostra de comprimido .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4.5.2 Estudo de recuperação em amostras de xampu e creme .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4.4 Seletividade e especificidade da metodologia eletroanalítica.....</b>	<b>75</b>
<b>4.5 Cálculos Químico-Quânticos.....</b>	<b>76</b>
<b>4.6 Investigação dos produtos da eletrólise .....</b>	<b>83</b>
<b>4.6 Proposição Mecanística .....</b>	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>





## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Correlações entre absorção, distribuição, ligação, metabolismo e excreção nos locais de ação.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2. Estruturas presentes em fármacos dos grupos dos triazóis e imidazóis.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Sequência sintética da produção do ergosterol pelos fungos.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 4. Interação do anel imidazólico com o grupo HEME do complexo enzimático CYP-450.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 5. Estrutura molecular do Cetoconazol.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 6. A) Relação entre corrente faradaica (<math>I_f</math>) e corrente capacitiva (<math>I_c</math>) versus o tempo. B) Esquema da forma de excitação na voltametria de onda quadrada por meio do potencial de partida, 'a' a altura do pulso, <math>\Delta E_s</math> o incremento de potencial, <math>\tau</math> largura do pulso.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 7. Representação esquemática do sistema eletroquímico utilizado nos experimentos voltamétricos. ET: eletrodo de trabalho (p-AgSAE); CE: contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar (Pt); ER: eletrodo de referência (Ag/AgCl/Cl)......</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Voltamograma cíclico exibido após o pré-tratamento do p-AgSAE em solução de KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> de 0 a -2,2 V com velocidade de varredura de 500 mV s<sup>-1</sup>.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 9. Imagem da superfície do p-AgSAE antes da etapa de ativação da superfície eletródica.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10. Imagem da superfície do p-AgSAE após a etapa de ativação da superfície eletródica.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11. Mapeamento atômico da superfície do p-AgSAE antes da etapa de ativação, apresentando os pontos contendo possivelmente óxido de mercúrio.....</i>	<i>38</i>



<i>Figura 12. Mapeamento atômico da superfície eletródica após a etapa de ativação, onde observa-se a ausência da camada de óxido da superfície do eletrodo.....</i>	38
<i>Figura 13. Espectro de EDX para a superfície do p-AgSAE após ativação em KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> .....</i>	39
<i>Figura 14. Voltamogramas de Onda Quadrada para os diversos eletrólitos: NaClO<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> ; tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0 ; tampão fosfato pH 5,0, com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 50 \text{ mV}</math> e <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>.....</i>	41
<i>Figura 15. Voltamogramas de Onda Quadrada apresentando os perfis voltamétricos para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}</math> em meio de tampão BR a <math>100 \text{ mV s}^{-1}</math> em diferentes valores de pH.....</i>	42
<i>Figura 16. Relação entre largura do potencial de meia onda (<math>\Delta E_{p/2}</math>) e o pH.....</i>	43
<i>Figura 17. Componentes de corrente da Voltamograma de Onda Quadrada para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}</math> em tampão BR pH 12; <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>; <math>a = 25 \text{ mV}</math> e <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	45
<i>Figura 18. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação da frequência de aplicação do pulso de potencial para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}</math> em meio de tampão BR pH 12, <math>a = 50 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	47
<i>Figura 19. Relação entre <math>I_p</math> vs. <math>f</math>; para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}</math> tampão BR pH 12, <math>a = 50 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	48
<i>Figura 20. Relação entre <math>I_p</math> e <math>f^{1/2}</math> para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}</math> tampão BR pH 12, <math>a = 50 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	48
<i>Figura 21. Relação entre <math>E_p</math> e <math>\log f</math> para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}</math> tampão BR pH 12, <math>a = 50 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	49
<i>Figura 22. Relação entre <math>I_p/f</math> vs. <math>f</math> para a redução de CTZ <math>1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}</math> sobre p-AgSAE em tampão BR pH 12.....</i>	50



- Figura 23. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação da amplitude de aplicação do pulso de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE..... 52
- Figura 24. Relação entre corrente de pico e amplitude para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE..... 53
- Figura 25. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação do incremento do pulso de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE..... 54
- Figura 26. Relação entre a corrente de pico e o incremento de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE..... 54
- Figura 27. Voltamogramas de Onda Quadrada para otimização do tempo de deposição do CTZ sobre p-AgSAE.  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ..... 55
- Figura 28. Voltamogramas de Onda Quadrada para otimização do tempo de deposição do CTZ sobre p-AgSAE.  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ..... 56
- Figura 29. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a redução do mesmo sobre p-AgSAE, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em tampão BR pH 12 com  $R = 0,9943$ .. 58
- Figura 30. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE..... 59
- Figura 31. Relação entre [CTZ] e corrente de pico com  $R = 0,9973$  e  $I_p = 0,6495 + 8,5623 \times 10^6 [\text{CTZ}]$  para a redução sobre p-AgSAE, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em tampão BR pH 12..... 60
- Figura 32. Dependência das correntes de pico com a concentração de CTZ sobre p-AgSAE.  $R = 0,9993$  e  $I_p = -0,047449 + 8,9942 \times 10^6 [\text{CTZ}]$ ..... 61
- Figura 33. Variação do pH de trabalho em níveis positivos e negativos para avaliação da robustez da metodologia de trabalho para a redução de CTZ sobre p-AgSAE em meio



<i>de tampão BR com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>.....</i>	65
<i>Figura 34. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em eletrólito de suporte, em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	67
<i>Figura 35. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a recuperação no eletrólito, em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	68
<i>Figura 36. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em comprimido em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	70
<i>Figura 37. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a recuperação em amostra de comprimido em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	70
<i>Figura 38. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em amostra de xampu em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	72
<i>Figura 39. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a recuperação em amostra de xampu em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	72
<i>Figura 40. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em amostra de creme, em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	73
<i>Figura 41. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a recuperação em amostra de creme em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	74
<i>Figura 42. Estrutura de menor energia para a molécula de CTZ e identificação numérica dos átomos.....</i>	76



<i>Figura 43 A) Mapa de distribuição dos orbitais de fronteira HOMO e na molécula de CTZ. B) Mapa de distribuição dos orbitais de fronteira LUMO e na molécula de CTZ.....</i>	78
<i>Figura 44. (A) Estrutura da molécula de CTZ com os deslocamentos correspondentes ao espectro de RMN <math>^1\text{H}</math>. (B) Estrutura da molécula de CTZ com os deslocamentos correspondente ao espectro de RMN <math>^{13}\text{C}</math>.....</i>	80
<i>Figura 45. Figura 51. Espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> teórico para um suposto produto da reação de redução do CTZ sobre AgSAE.....</i>	81
<i>Figura 46. Estruturas dos componentes na mistura analisada e o espectro de RMN <math>^1\text{H}</math> teórico para a mesma.....</i>	82
<i>Figura 47. Espectros na região do UV-Vis para o acompanhamento da redução da banda de absorbância do CTZ em meio de tampão BR pH 12, sobre p-AgSAE.....</i>	84
<i>Figura 48. Ampliação do Espectro na região do UV-Vis para o acompanhamento da redução da banda de absorbância do CTZ em tampão BR.....</i>	85
<i>Figura 49. Suposição mecanística para a redução de CTZ em meio de tampão BR pH 12, sobre p-AgSAE.....</i>	86



## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Relações existentes entre <math>I_p</math>, <math>E_p</math> e frequência de aplicação de pulso de potencial em relação à reversibilidade do processo.....</i>	18
<i>Tabela 2. Relação entre pH e os respectivos potenciais de meia altura (<math>\Delta E_{p/2}</math>), para a redução de CTZ em tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>; <math>a = 50 \text{ mV}</math> e <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math> sobre p-AgSAE .....</i>	44
<i>Tabela 3. Figuras de mérito para a redução sobre p-AgSAE, com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math> em tampão BR pH 12.....</i>	62
<i>Tabela 4. Valores obtidos para a repetibilidade e reprodutibilidade para a redução de CTZ sobre p-AgSAE, com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>; <math>a = 25 \text{ mV}</math>; <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math> em meio de tampão BR.....</i>	63
<i>Tabela 5. Resumo dos dados obtidos para o estudo de exatidão da metodologia em meio de tampão BR pH 12 com <math>f = 100 \text{ s}^{-1}</math>, <math>a = 25 \text{ mV}</math>, <math>\Delta E_s = 2 \text{ mV}</math>, sobre p-AgSAE.....</i>	75

## Resumo

No presente trabalho foi investigado o comportamento eletroquímico do antifúngico Cetoconazol (CTZ) sobre o Eletrodo Sólido de Amálgama de Prata (p-AgSAE). A otimização das condições de redução foi obtida por voltametria de onda quadrada (VOQ), onde foram analisadas as condições mais adequadas para a realização dos experimentos. O meio de trabalho escolhido foi Tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>. Foi avaliada a influência do pH, onde o valor escolhido para estudar a redução do analito foi 12. Os parâmetros da VOQ otimizados foram frequência (100 s<sup>-1</sup>), amplitude (25 mV) e incremento de potencial (2 mV). De acordo com os resultados, foi observado que o CTZ sofre um processo de redução em -1,5 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>. A concentração de CTZ utilizada nos estudos de otimização foi de 1,0x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. Após estabelecimento dos parâmetros experimentais, foram estudadas as figuras de mérito especificadas pela ANVISA para validação de métodos analíticos na análise de fármacos. Assim, foram avaliados região de linearidade (4,97x10<sup>-7</sup> a 4,30x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> com R = 0,9993), limites de detecção (1,19x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> - 63,4 µg L<sup>-1</sup>) e de quantificação (3,98x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> - 211,5 µg L<sup>-1</sup>), precisão e robustez. Os estudos de exatidão da metodologia foram feitos em diferentes produtos comerciais: comprimido, creme e xampu. Para fins de comparação e avaliação de possível influência do meio eletroquímico na resposta, foi feito o estudo de exatidão utilizando curvas de recuperação para o eletrólito de suporte, onde o valor da taxa de exatidão foi de 100,1%. Assim, os valores das taxas de exatidão para as amostras foram de 91% para a amostra de comprimido, 104% para a amostra de creme e 103% para a amostra de xampu. Os valores de RSD para as amostras foram inferiores a 5%. Cálculos químico-quânticos também foram feitos com o objetivo de estudar as características eletrônicas da molécula, e prever qual região tem maior probabilidade de sofrer a redução. De fato, foram investigadas as distribuições de carga na molécula, bem como os orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), que são possíveis sítios de oxidação e redução, respectivamente. O LUMO foi localizado sobre o anel imidazólico. Na sequência da elucidação mecanística, foi feita uma eletrólise exaustiva (E = -1,8V durante seis horas) com acompanhamento por espectroscopia UV-Vis, sendo utilizada nos estudos de identificação do produto a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN H<sup>1</sup>. Com base neste estudo, foi constatado que o CTZ sofreu uma redução na dupla ligação entre C-N do anel imidazólico da molécula de CTZ.



### Abstract

*The aim of this work was to study the electrochemical behavior of antifungal ketoconazole on polished Silver Solid Amalgam Electrode (p-AgSAE). The study began with the evaluation of the best electrolyte for ketoconazole (KC) electrochemical reduction and the Britton–Robinson buffer solution at pH 12 was selected as the best support electrolyte. In the following, with a constant ketoconazole concentration ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) the square wave voltammetric parameters were optimized for the p-AgSAE. The best experimental responses were achieved with  $100 \text{ s}^{-1}$  frequency, 25 mV of amplitude and 2 mV of scan increment. The results showed that ketoconazole is reduced in a quasi-reversible process, with one reduction peak at -1.50 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> reference system. After optimized the SWV parameters, the analytical studies were developed in accord to ANVISA for validation the methodology. Linearity range, detection and quantification limits, precision, robustness and accuracy were evaluated. An analytical curve was constructed, that presented a linear region to  $4.97 \times 10^{-7}$  a  $4.30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  with a correlation coefficient to 0.9989. The detection limits for the concentration range were determined as  $63.4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  while the quantification limits were to  $211.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Studies of accuracy of the methodology were made in different formulations: tablet, cream and shampoo. The values obtained were to 100.8% for the electrolyte, 91% for the tablet, 104% for the cream and 103% for the shampoo. The Relative Standard Deviation (RSD) for the accuracy was less than 5.0%. Quantum chemical calculations were also made with the aim of studying the electronic characteristics of the molecule, and predicting which region of the molecule occurs a electrochemical reduction. It was investigated the distribution of charge on the molecule and the molecular orbital (HOMO and LUMO), which are possible sites of oxidation and reduction, respectively. The LUMO was located on the imidazole ring. In the sequence of the mechanistic elucidation, it was made an exhaustive electrolysis ( $E = -1,8\text{V}$  during six hours) with monitoring by UV-Vis, being used in the studies that identify the products, the technique of nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR  $H^1$ . In accord to the study, the reduction of KC occur between the C-N bond on the imidazole ring.*



# 1. INTRODUÇÃO

Com o surgimento de novos medicamentos a cada dia, gera-se uma necessidade crescente de novos métodos capazes de monitorar não somente estas novas substâncias, mas também os metabólitos gerados a partir de suas utilizações. As técnicas atualmente empregadas na análise de insumos farmacêuticos são normalmente métodos espectroscópicos ou de separação. Os métodos eletroanalíticos surgem como uma ferramenta importante na análise de compostos orgânicos e inorgânicos, apresentando parâmetros analíticos semelhantes aos das técnicas usuais.

## 1.1 Fármacos no organismo

Quando um fármaco entra no corpo, imediatamente o organismo inicia alguns processos, sendo eles a absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e eliminação. Esses processos são a origem a base da *farmacocinética*. Os mecanismos de ação dos fármacos são os processos estudados pela *farmacodinâmica*. O período de ação terapêutica do fármaco no organismo pode ser entendido por sua farmacocinética e farmacodinâmica<sup>1</sup>. A Figura 1 demonstra as diversas etapas envolvidas na administração de um fármaco no organismo.

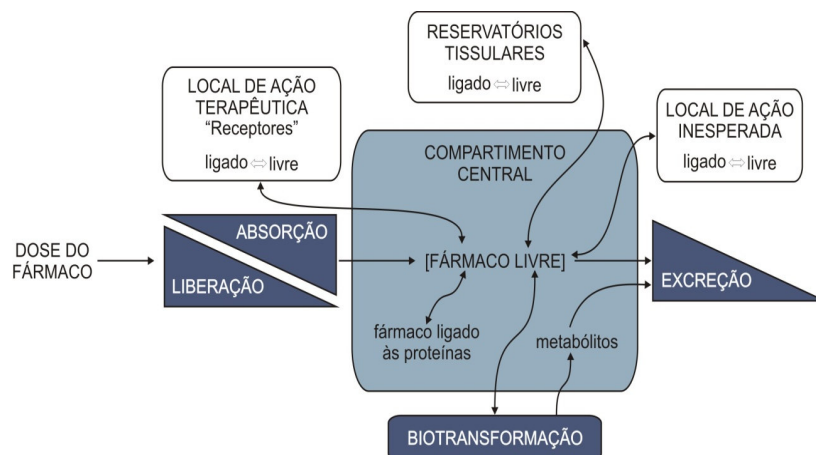


Figura 1. Correlações entre absorção, distribuição, ligação, metabolismo e excreção nos locais de ação<sup>2</sup>.



Para que um fármaco exerça sua função específica, é necessário que ocorra uma interação com um determinado receptor. Sob o ponto de vista quantitativo, as proteínas constituem o grupo mais importante de receptores farmacológicos, como por exemplo receptores dos hormônios e neurotransmissores <sup>2</sup>.

Alguns fármacos atuam, nesses receptores fisiológicos e, em geral, são particularmente seletivos porque estes são especializados em reconhecer e responder com grande seletividade às moléculas sinalizadoras específicas. Os fármacos que se ligam aos receptores fisiológicos e simulam os efeitos reguladores dos compostos sinalizadores endógenos são conhecidos como *agonistas*. Outros fármacos se ligam aos receptores que não produzem efeito regulador, mas sua ligação impede o acoplamento do agonismo ao endógeno. Esses compostos que não possuem efeitos úteis por meio da inibição da ação de um agonista (por competição pelos locais de ligação), são conhecidos como *antagonistas* <sup>3</sup>.

A ligação dos fármacos aos receptores pode envolver todos os tipos de interação conhecidas – iônica, ligação de hidrogênio, hidrofóbica, interação de van der Waals e ligação covalente. Se a ligação for covalente, a duração da ação do fármaco será prolongada, embora isto nem sempre ocorra. As interações não-covalentes de alta afinidade também podem ser praticamente irreversíveis <sup>4</sup>.

## 1.2 Agentes antifúngicos

A grande semelhança estrutural entre as células fúngicas com as dos mamíferos, bem como a resistência de suas paredes justificam o fato de haver poucos agentes antifúngicos disponíveis atualmente. Eles ainda são consideravelmente mais tóxicos se comparados aos agentes antibacterianos. Os agentes antifúngicos são divididos basicamente em azóis e poliênicos. Os antifúngicos azóis subdividem-se em duas

classes: triazóis e imidazóis <sup>5</sup>. As estruturas que definem a diferença entre triazóis e imidazóis são apresentadas na Figura 1.

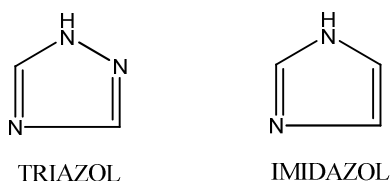


Figura 2. Estruturas presentes em fármacos dos grupos dos triazóis e imidazóis.

Os imidazóis são metabolizados mais rapidamente que os triazóis. Entre os vários fármacos atualmente comercializados são imidazólicos: Clotrimazol, Miconazol, Cetoconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol, Sertaconazol e Sulconazol. Já outros como Terconazol, Itraconazol, Fluconazol e Voriconazol são triazóis.

### 1.2.1 Atividade antifúngica dos azóis

Os azóis, como grupo, exibem atividade clinicamente útil contra diversos tipos de fungos, como por exemplo *Candida albicans* e *Candida tropicalis* que são causadores de infecção oral e vaginal em seres humanos. A ação farmacológica se dá após a estabilização da concentração nos tecidos e no sangue, de forma que o principal efeito causado, não só por imidazóis, mas também por triazóis, sobre os fungos consiste na inibição da 14- $\alpha$ -esterol-desmetilase, uma enzima microssômica do citocromo P450 (CYP) que faz parte da rota biossintética do ergosterol, como pode ser observado na Figura 3. A interação do grupo imidazólico se dá com o grupo HEME presente na CYP-450, como pode ser observado na Figura 4, que apresenta esta interação.

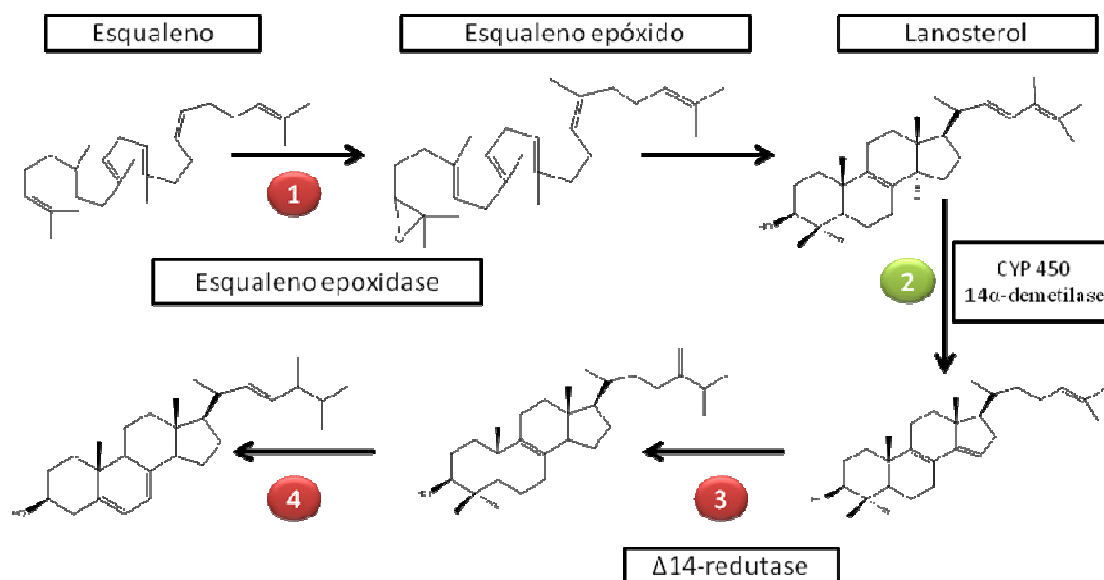


Figura 3. Sequência sintética da produção do ergosterol pelos fungos<sup>6</sup>.

Por conseguinte, a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática é comprometida, levando ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Estes metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acil dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como ATPase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento dos fungos<sup>7</sup>.

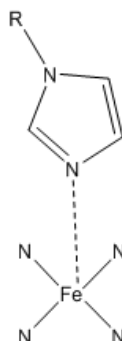


Figura 4. Interação do anel imidazólico com o grupo HEME do complexo enzimático CYP-450.

### 1.2.2 Cetoconazol e suas propriedades físico-químicas

Cetoconazol (CTZ) é um derivado imidazólico (Figura 5) comumente utilizado como uma formulação antifúngica no tratamento de micoses superficiais ou sistêmicas por apresentar ampla atividade antimicótica, ser absorvido por via oral, ser menos lipofílico e capaz de manter níveis sanguíneos mais elevados.

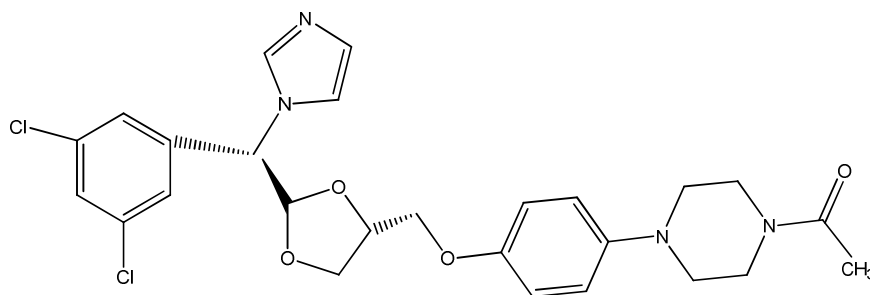


Figura 5. Estrutura molecular do Cetoconazol.

O nome químico do CTZ é *cis*-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxifenil]-piperazina, de fórmula e massa molecular  $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$  e  $531,44 \text{ g mol}^{-1}$ . O composto se apresenta sob a forma de um pó cristalino branco ou quase branco, com uma faixa de temperatura de fusão de 148 a  $152^\circ\text{C}$ . Em relação à solubilidade, é praticamente insolúvel em água com solubilidade intrínseca em água de  $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo solúvel em etanol (1:54), metanol (1:9) e clorofórmio (1:2).

### 1.2.3 Farmacocinética do Cetoconazol

CTZ é rapidamente absorvido por via oral. Após a administração oral das doses de 200, 400 e 800 mg, o pico de concentração plasmática é de aproximadamente 4, 8 e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, após um período de duas a três horas, variando a absorção com o estado de acidez gástrica, sendo maior em pH igual ou inferior a dois.

CTZ foi descoberto por pesquisadores da Indústria Janssen Farmacêutica, Bélgica, tendo recebido inicialmente o nome de código R 41.400 e sendo introduzido na



terapêutica em 1978. É um fármaco de amplo espectro de ação contra fungos, mostrando-se ativo contra os dermatófitos. Tem ação leishmanicida *in vitro*, porém sua ação terapêutica na leishmaniose tegumentar americana é lenta e inconstante. A concentração inibitória sobre os fungos sensíveis situa-se entre 0,01 e 11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . É solúvel em ácidos e absorvível por via oral, sendo eficaz na terapia de micoses superficiais e profundas. Não é administrado por via parenteral por ser pouco solúvel em água<sup>8</sup>.

Como os demais derivados imidazólicos antifúngicos, CTZ exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos sensíveis, que passam a perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo, por fim, o rompimento da membrana. Esta ação decorre de sua interferência na síntese de esteróis da membrana, inibindo a formação do ergosterol a partir do seu precursor, o lanosterol. Esta atividade resulta da ação inibitória do CTZ (e dos demais derivados azólicos) sobre a enzima citocromo P-450, a qual é responsável pela síntese e degradação dos ácidos graxos e esteróides endógenos nas células animais, vegetais e seres unicelulares. Esta ação sobre a membrana é variável de acordo com o fungo e a dose do medicamento, agindo não só sobre as células fúngicas, mas, também, inibindo a síntese de estrogênios e testosterona no homem. Além deste mecanismo de ação, o cetoconazol e demais derivados imidazólicos alteram a síntese de triglicerídeos e fosfolipídeos e, em alta concentração, provocam a morte celular por causarem acúmulo de água oxigenada ao bloquearem enzimas peroxidativas.

CTZ apresenta elevada eficácia após administração por via oral no tratamento da candidíase oral, esofagiana, cutânea e vulvovaginal, nas dermatofitoses e pitíriase versicolor. Sua eficácia na candidíase sistêmica no paciente imunocomprometido é irregular, mas o fármaco mostra-se útil na terapia da candidíase ocular e osteoarticular

em pacientes viciados em drogas injetáveis e na candidíase esofágica em pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

A dose adulta máxima recomendada para CTZ é de 400 mg/dia<sup>8</sup>. Em crianças 3,3-6,6 mg/Kg/dia<sup>2</sup>. Como já referido, a absorção oral é maior em meio ácido, recomendando-se sua ingestão junto com a alimentação e com sucos cítricos. O tratamento pode durar cinco dias para cândida vulvovaginal, duas semanas para candidíase oral e esofágica e seis a doze meses em micoses profundas. A lenta resposta da terapia faz o fármaco ser inadequado para pacientes com micose severa e progressiva.

O CTZ é habitualmente bem tolerado. Em alguns pacientes pode provocar náuseas, vômitos, desconforto abdominal, tonturas, cefaléia, alopecia, diminuição da libido, prurido e diarreia. Não é recomendado em gestantes e seu uso em nutrízes acompanha-se da excreção para o leite; por este motivo, é aconselhável à mulher não amamentar quando sob tratamento com CTZ<sup>8</sup>.

O composto é convertido em diversos metabólitos inativos, sendo que as principais vias metabólicas identificadas são a oxidação e degradação dos anéis imidazólico e piperazínico, o-dealquilação oxidativa e hidroxilação aromática. Apenas uma pequena fração (inferior a 1%) da dose administrada é excretada, sem mudanças, na urina após um período de seis horas. Desta forma, é importante desenvolver métodos capazes de quantificar tal espécie, basicamente por dois motivos: o primeiro para um controle de qualidade na indústria farmacêutica e um segundo, na análise de amostras de urina e de água. Vários métodos são reportados na literatura, como será visto a seguir.

#### 1.2.4 Metodologias empregadas na determinação de CTZ

Low e Wangbooskul <sup>9</sup> utilizaram Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para separação e quantificação de CTZ e quatro compostos de estrutura molecular semelhante, considerados impurezas. Estes compostos podem estar presente juntamente com o CTZ e muitas vezes podem não exercer a mesma função no organismo. Foi empregado detector UV-Vis operando em 232 nm e fase móvel composta de acetonitrila e tampão fosfato. O método de separação foi empregado em diferentes formulações comerciais, sendo elas: comprimido, creme e xampu. Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: faixa de linearidade, exatidão, precisão, seletividade e os limites de detecção e quantificação. A metodologia apresentou excelentes taxas de recuperação (em torno de 100%, para todas as amostras avaliadas) e boa seletividade na separação dos diferentes compostos. O tempo de retenção dos analitos na coluna, foi curto em relação a métodos cromatográficos, sendo de cinco minutos. Entretanto se comparado com medidas voltamétricas que duram não mais que alguns segundos, este é um tempo extremamente grande.

Khashaba *et al.*<sup>10</sup> analisaram diferentes agentes antifúngicos (Clotrimazol e Cetoconazol) por métodos espectrofotométricos. Os métodos se baseiam na reação dos compostos com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) em metanol ou com o ácido p-cloroanilínico (p-CA) em acetonitrila. Os solventes utilizados para preparação dos analitos foram os mesmos empregados na preparação dos compostos de reação. Os produtos formados obedeceram a lei de Beer com  $\lambda_{\text{max}}$  de 460 e 520 nm nas faixas de concentração de 22,5-200 e 7,9-280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o DDQ e p-CA, respectivamente. As amostras empregadas no estudo em questão consistiam de creme, solução, comprimido e pó para o Clotrimazol e creme e comprimido para o Cetoconazol, sendo que para este foram obtidas taxas de recuperação de 98,8% e 98,9%, respectivamente. A reação entre



os agentes antifúngicos e os reagentes DDQ e p-CA ocorrem por interação com o anel imidazólico mas os autores não informam a .

Bruijn *et al.*<sup>11</sup> desenvolveram um método de CLAE para determinação de CTZ em plasma humano. Uma extração quantitativa foi realizada utilizando uma mistura de acetonitrila e cloreto de n-butil (1:4, v/v). Clotrimazol foi utilizado como padrão interno. CTZ foi monitorado em cerca de 206 nm. A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de água – acetonitrila – THF – hidróxido de amônia – trietilamina (45:50,2:2,5:0,1:0,1 v/v). Foram avaliados precisão e exatidão, limites de detecção e de quantificação, taxa de recuperação (em plasma humano), seletividade e especificidade e ainda foi avaliada a estabilidade. A faixa de linearidade foi de 20 a 2000 ng mL<sup>-1</sup> (R = 0,9975), onde o limite de quantificação foi adotado como o primeiro ponto da curva analítica. A taxa de recuperação de CTZ foi de aproximadamente 94%. O tempo de retenção do padrão interno foi de aproximadamente 10 minutos e o tempo de retenção do Cetoconazol foi superior a 20 minutos. Embora a metodologia apresente bons parâmetros analíticos como baixos limites de detecção e seletividade para detectar o analito em uma amostra complexa como plasma sanguíneo, o tempo de retenção é alto, podendo dificultar a análise se houver um número elevado de amostras.

Proença *et al.*<sup>12</sup> desenvolveu e validou uma metodologia espectrofotométrica para determinação direta de CTZ em amostras de xampu. O princípio ativo foi extraído utilizando metanol, seguido de agitação por 30 minutos. A determinação do mesmo foi realizada em 267 nm, tendo faixa de linearidade de 3,0 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup> e taxas de recuperação variando de 95 a 109%. O limite de detecção foi de 1,2x10<sup>-3</sup> mg mL<sup>-1</sup>, sendo este método perfeitamente capaz de analisar CTZ em xampu. Embora outros trabalhos espectrofotométricos já estejam disponíveis na literatura, este ainda não é classificado como método padrão alternativo aos métodos cromatográficos. O preparo



da amostra requer etapas que envolvem, por exemplo, a filtração das amostras, tornando o método um tanto mais moroso.

Cirilli *et al.*<sup>13</sup> utilizaram a técnica de CLAE para a separação enantiomérica de derivados imidazólicos (Cetoconazol, Fluconazol e Miconazol) quirais dotados de atividade antimicótica. O objetivo do trabalho foi avaliar qual a influência da estereoquímica nos níveis biologicamente ativos dos componentes. Colunas enantiosseletivas contendo carbamato de celulose e amilose foram utilizadas. A influência da natureza e a quantidade de um modificador alcoólico (etanol ou 2-propanol) na fase móvel (n-hexano) foram estudadas. Os enantiômeros foram isolados e separados em colunas semipreparativas. Os comprimentos de onda escolhidos para o monitoramento dos compostos foram 260 e 310 nm. Após estas etapas, foram submetidos a testes biológicos com *Candida albicans*, de forma que seus efeitos permaneceram inalterados. Assim, o perfil dos compostos testados foi compatível com os fármacos de referência, não sendo observado aumento da atividade antimicótica no racemato.

Heyden *et al.*<sup>14</sup> determinaram CTZ e Formaldeído simultaneamente em amostras de xampu por CLAE. O Formaldeído é utilizado para preservar e evitar que haja contaminação do produto (xampu), sendo a faixa de concentração máxima permitida de 0,2 a 5,0%, dependendo do produto em que está sendo utilizado pois este componente pode causar dermatites. A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de Acetonitrila e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,025 mol L<sup>-1</sup> 45/55 (v/v), ajustado para pH 4,0 com ácido fosfórico. CTZ foi carregado mais rapidamente, podendo ser determinado em 250 nm após a injeção da amostra de xampu. O Formaldeído foi medido em 345 nm (após derivatização com uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina). Os excipientes contidos na amostra original não interferiram nas determinações. O método foi validado avaliando-

se seletividade, linearidade, repetibilidade e robustez (onde diversos parâmetros operacionais foram avaliados em três níveis: valor otimizado e valores acima e abaixo deste) mostrando-se eficiente na determinação de ambos na amostra estudada. Assim, as determinações de CTZ e Formaldeído foram feitas sem interferência mútua de ambos os componentes.

Abdel-Moety *et al.*<sup>15</sup> aplicaram CLAE na determinação de Cetoconazol, Clotrimazol e Fluconazol em diferentes formulações farmacêuticas. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura de acetonitrila e trihidroximetil aminometano em tampão fosfato pH 7,0. As amostras utilizadas foram de comprimido, creme e cápsula. Para Clotrimazol, foi investigada sua determinação na presença de seus produtos de degradação (2-clorofenil-difenil-metanol e imidazol) que foram obtidos após reação com HCl 5N, com boas taxas de recuperação, estando este valor em torno de 100%. Já o CTZ foi investigado em comprimido e creme, com taxas de recuperação também em torno de 100%. O tempo de retenção para o clotrimazol foi de cerca de 10 minutos. Entretanto, a separação dos produtos não foi muito eficiente.

Chem *et al.*<sup>16</sup> determinaram CTZ em plasma sanguíneo humano, utilizando CLAE duplamente acoplado com espectrômetro de massa. O método utilizou dietil-éter para extração de CTZ e um padrão interno. Como fase móvel foi utilizada uma mistura acetonitrila/água/ácido-fórmico (75:25:1, v/v/v). As razões massa-carga ( $m/z$ ) foram de  $531 \rightarrow 82,1$  para CTZ e  $733,5 \rightarrow 460,2$  para o padrão interno. A faixa de linearidade para o método foi de 20 a 10.000 ng mL<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de 0,998 e a recuperação obtida foi de 102%.

Vertzoni *et al.*<sup>17</sup> desenvolveram e validaram uma metodologia para determinação de CTZ em plasma sanguíneo de cães utilizando CLAE com detector UV-Vis. A solução padrão de CTZ foi preparada utilizando como solvente acetonitrila e o

mesmo foi monitorado em 240 nm. A fase móvel era composta de uma mistura de metanol/água/dietilamina (74:26:0,1 – v/v/v). A faixa de linearidade foi de 0,015 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com limites de detecção e quantificação de 5 e 15  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente. A taxa de recuperação foi superior a 95%. O tempo de retenção do analito na coluna foi relativamente rápido, sendo de aproximadamente 4 minutos.

Kovács *et al.*<sup>18</sup> estudaram o efeito de diversos solventes na solubilização de alguns compostos imidazólicos, dentre eles Cetoconazol, Itraconazol e Miconazol, com o objetivo de buscar novos excipientes. Foram testados como solventes soluções de acetato, fosfato e gluconato, em misturas com etanol, glicerol, macrogol 400, propileno glicol e surfactantes. O efeito das combinações binárias e ternárias foi investigado por CLAE. Todos os meios estudados apresentaram boas características de solubilidade. Combinações ternárias foram capazes de solubilizar 135  $\text{mg mL}^{-1}$  de CTZ. Os solventes permitem a utilização dos fármacos via parental, sem problemas.

Bajad *et al.*<sup>19</sup> desenvolveram metodologia para determinação cromatográfica de Cetoconazol e Piperina em plasma sanguíneo de ratos. Um arranjo de fotodiodos foi utilizado como detector, monitorando Piperina em 340 nm e Cetoconazol em 231 nm. A fase móvel utilizada foi composta por uma mistura de acetonitrila e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50:50 (v/v) tendo pH ajustado para 4,5 com ácido ortofosfórico. As recuperações foram superiores a 98%, com faixa de linearidade de 10 a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para ambos os analitos. Os limites de detecção obtidos foram de 2,0  $\text{ng mL}^{-1}$  para Piperina e 4,0  $\text{ng mL}^{-1}$  para Cetoconazol.

Farhadi *et al.*<sup>20</sup> estudaram a reação de Cetoconazol e Clotrimazol com o íon  $\text{I}_3^-$  e Vermelho de alizarina S. A interação permitiu o desenvolvimento de uma metodologia potenciométrica para determinação dos mesmos. A faixa de linearidade foi de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$   $\text{mol L}^{-1}$ . Empregou-se também metodologia espectrofotométrica, que consistiu na interação dos fármacos com o Vermelho de alizarina S (reagente cromogênico), sendo

obtida uma faixa de linearidade de 2,5 a 50 e 2,7 a 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Clotrimazol e Cetoconazol, respectivamente. As taxas de recuperação para as amostras de comprimido e creme mantiveram-se entre 99 e 102 %. Desta forma, a metodologia pode ser empregada na análise das diferentes formulações de ambos os fármacos sem interferências dos excipientes.

Arranz *et al.*<sup>21</sup> utilizaram separação por eletroforese capilar com detector na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) para determinar três diferentes derivados imidazólicos: Cetoconazol, Clotrimazol e Econazol. Diversos parâmetros eletroforéticos foram investigados: pH (5,18) e concentração do tampão (0,075 mol L<sup>-1</sup>), potencial aplicado (25 kV), temperatura (25 °C) e condições de injeção. O método foi otimizado, determinando-se simultaneamente os três derivados com valores de recuperações de 98,0%; 99,9% e 99,5%, respectivamente para Cetoconazol, Clotrimazol e Econazol.

Lichtig *et al.*<sup>22</sup> desenvolveram um método polarográfico de pulso diferencial para determinação de Secnidazol em amostras de comprimido e fluidos intestinais. O potencial de pico para a redução do composto foi de -0,57V *versus* Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>. A metodologia utilizou tampão borato 0,04 mol L<sup>-1</sup>, sendo observada uma onda de redução, na qual envolve a participação de quatro elétrons do grupo nitro para hidroxilamina. Em valores de pH mais ácidos, a forma protonada do grupo hidroxilamina é reduzida para amina. Em meio alcalino a redução envolve a participação de seis elétrons. A faixa de trabalho obtida foi de 0,6 a 114  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Shamsipur e Farhadi<sup>23</sup> estudaram o comportamento eletroquímico de CTZ utilizando eletrodo de disco rotatório, voltametria cíclica e coulometria, com eletrodos de trabalho de ouro, platina e carbono vítreo. Foram observadas duas ondas anódicas nos para os eletrodos empregados, de forma que os potenciais encontram-se na faixa de 1,0 a 1,8V – potenciais para as ondas de oxidação. Os estudos de voltametria cíclica

foram realizados utilizando concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de CTZ em meio de Perclorato de Tetrabutylamônio (TBAP). Com base nos resultados obtidos foi elaborada uma proposta mecanística para a oxidação de CTZ envolvendo um único elétron. Utilizando voltametria de pulso diferencial e eletrodo de platina, foi desenvolvido um método para quantificação do mesmo em amostras de comprimido e creme, assim como em fluidos biológicos. A faixa de trabalho obtida foi de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . As taxas de recuperação obtidas foram de 101,0; 97,5 e 102,3% para as amostras dos fármacos, urina e sangue, respectivamente.

Shamsipur e Farhadi<sup>24</sup> estudaram a oxidação de CTZ sobre eletrodo de pasta de carbono em meio de Tampão BR  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 12, o qual apresentou pico de oxidação no potencial de 0,48 V. Os resultados indicaram que o processo é irreversível e controlado por adsorção, o que possibilita uma etapa de acumulação do fármaco na superfície do eletrodo. As técnicas utilizadas foram Voltametria Cíclica, Voltametria de Varredura Linear (VVL) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), onde foi observada uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de CTZ entre  $2,4 \times 10^{-8}$  a  $4,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (VPD) e  $9,1 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (VVL). O método desenvolvido foi aplicado na determinação do analito em amostras de comprimido, creme e urina. A média da taxa de recuperação para as amostras de urina foram de 98,5%. Em relação ao preparo da amostra de CTZ, foi utilizado HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  na solubilização sendo feita uma filtração para separação dos excipientes. Entretanto, no trabalho de Abdel-Moety *et al.*<sup>15</sup> foi utilizado HCl para degradação do Clotrimazol. Desta forma, existe a possibilidade do mesmo ter ocorrido, de forma que possivelmente o pico de oxidação seja de um produto de degradação.

Pereira *et al.*<sup>25</sup> investigaram o comportamento de Clotrimazol sobre eletrodo de mercúrio em soluções de uso tópico de diferentes fabricantes. Clotrimazol é reduzido

sobre mercúrio em tampão fosfato com pH superior a 6 por meio de um processo reversível envolvendo um único elétron. O processo apresenta forte efeito de adsorção, o qual pode ser minimizado na presença de Triton X-10. As taxas de recuperação foram de cerca de 100 % para as soluções comerciais de Canesten e 113 % para as soluções de Dermobene.

Peng *et al.*<sup>26</sup> investigaram o comportamento adsorativo e eletroquímico de cetoconazol sobre eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 9,0. O método analítico desenvolvido obteve um limite de detecção de  $4,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ , com uma faixa de linearidade de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ . As taxas de recuperação obtidas variaram entre 99,46 e 102,11%.

Arranz *et al.*<sup>27</sup> estudaram o comportamento eletroquímico do Cetoconazol em tampão Brintton-Robinson. Observou-se um processo de redução em HMDE (do inglês *Hangging Mercury Drop Electrode*), formando um único pico em torno de -1,6 V, tendo uma faixa de pH de estudo variando de 4,7 a 9,6. Os resultados obtidos mostraram que a redução do Cetoconazol é um processo irreversível e a corrente é controlada por adsorção da espécie eletroativa. A dependência da corrente de pico com a concentração foi estudada por meio de diferentes técnicas polarográficas e voltamétricas. Utilizando Voltametria de Pulso Diferencial com Redissolução Catódica (AdS-DPV, do inglês *Adsorptive stripping Differential Pulse Voltammetry*), o limite de detecção (LD) encontrado foi de  $5,3 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ . O procedimento desenvolvido foi utilizado para determinação de Cetoconazol em formulações comerciais e em amostras de urina. Desta forma, os autores constataram que o processo de redução do CTZ nas condições de trabalho é irreversível e controlado por uma etapa de adsorção, de forma que os dois métodos eletroanalíticos testados mostraram-se capazes de determinar o analito com boas taxas de exatidão.

## 1.2 Técnica utilizada: Voltametria de Onda Quadrada

A Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) se caracteriza como uma técnica de pulso. Estas técnicas são baseadas na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. As características da medida estão relacionadas tanto com a largura do pulso quanto com o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico<sup>28</sup>. Nas técnicas de pulso, a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear com o tempo do experimento (Figura 6A), de forma que a aplicação do pulso de potencial segue uma sequência sistemática, cuja resposta de corrente obtida depende da forma com que estes pulsos são aplicados. É esta maneira de aplicação dos pulsos de potencial que define as características básicas de cada uma das técnicas de pulso<sup>29</sup>.

A VOQ foi desenvolvida em 1952 por Baker e Jenkins<sup>30</sup> e no decorrer dos anos apresentou algumas modificações instrumentais aliadas ao desenvolvimento de novas teorias que foram responsáveis pelo estabelecimento da técnica para a análise de traços e na obtenção de dados relacionados à cinética e ao mecanismo de reações químicas sob as mais variadas condições<sup>31</sup>. Dentre as vantagens desta técnica, pode-se citar a sua rapidez de aplicação frente a outras técnicas de pulso como a voltametria de pulso diferencial, excelente sensibilidade e redução das correntes residuais, menor consumo da espécie eletroativa e diminuição dos problemas associados ao bloqueio de superfície do eletrodo por produtos de reações<sup>32</sup>.

A forma de aplicação da altura de potencial (Amplitude,  $a$ ), como apresentado na Figura 6B, varia de acordo com uma escada de potencial com largura  $\Delta E_s$  (incremento de varredura) e duração  $2\tau$ . As correntes são medidas nos últimos



microssegundos de aplicação dos pulsos direto ( $I_f$ ) e reverso ( $I_b$ ) e a diferença entre os dois valores gera a corrente resultante ( $\Delta I = I_f - I_b$ )<sup>33</sup>.

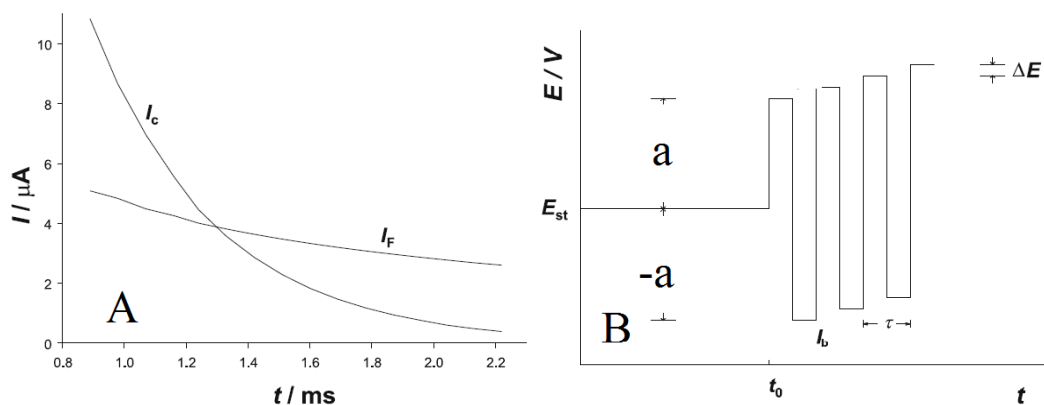


Figura 6. A) Relação entre corrente faradaica ( $I_f$ ) e corrente capacitiva ( $I_c$ ) versus o tempo. B) Esquema da forma de excitação na voltametria de onda quadrada por meio do potencial de partida, “a” a altura do pulso,  $\Delta E_s$  o incremento de potencial,  $\tau$  largura do pulso.<sup>30</sup>

Em VOQ, a separação das correntes é uma ferramenta muito utilizada para avaliar o grau de reversibilidade de um sistema eletroquímico. Para sistemas reversíveis, quanto maior for a contribuição da corrente reversa, maior será a corrente resultante, pois ela é a diferença entre as correntes direta e reversa. Já para sistemas irreversíveis, a corrente reversa é mínima e, conseqüentemente, a sua contribuição para a intensidade da corrente resultante é desprezível<sup>34</sup>.

Os parâmetros eletroquímicos potencial de pico ( $E_p$ ) e corrente de pico ( $I_p$ ) fornecem informações importantes quando relacionados com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial<sup>35</sup>. Para sistemas reversíveis,  $I_p$  varia linearmente com a raiz quadrada da frequência; por outro lado, varia linearmente com a frequência para sistemas irreversíveis. Para sistemas quase reversíveis, a variação entre  $I_p$  e a frequência não é linear. O coeficiente angular de um gráfico de  $E_p$  vs. logaritmo da frequência, para sistemas reversíveis sem adsorção de produtos, tem um valor de  $-29/n$  mV e com adsorção do produto e do reagente não há relação linear. Para sistemas irreversíveis, o

coeficiente angular tem um valor de  $-59/n\alpha$  mV<sup>36</sup>. Na Tabela 1 são resumidas as principais características dos sistemas eletroquímicos quanto ao grau de reversibilidade ao se relacionar  $I_p$  e  $E_p$  com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

*Tabela 1. Relações existentes entre  $I_p$ ,  $E_p$  e frequência de aplicação de pulso de potencial em relação à reversibilidade do processo.*

Sistema	Relação $I_p$ vs. $f$	Relação $E_p$ vs. $\log f$
Irreversível	$I_p = kf$	$\theta = -59/n\alpha$ mV
Reversível	$I_p = kf^{1/2}$	Sem adsorção do produto: $\theta = -29/n$ mV
		Com adsorção do produto e reagente: a relação não é linear
Quase Reversível	Não é linear	Relação não é linear

Os métodos de redissolução abrangem uma variedade de procedimentos eletroquímicos que incluem uma etapa de pré-concentração seguida por uma etapa voltamétrica<sup>37</sup>. Em todos esses procedimentos, primeiramente o analito é depositado sobre a superfície do eletrodo sob agitação. Após um tempo de deposição medido com exatidão, a eletrólise é descontinuada, a agitação é interrompida e o analito depositado é determinado através de técnicas voltamétricas. Durante essa segunda etapa da análise, o analito é redissolvido ou retirado do eletrodo<sup>38</sup>.

### 1.3 Eletrodo Sólido de Amálgama de Prata

O desenvolvimento da polarografia, voltametria e de sensores potenciométricos representam a parte fundamental dos métodos eletroanalíticos e da instrumentação<sup>39,40</sup>. Eletrodos de mercúrio têm sido amplamente empregados em voltametria por várias



razões. Uma delas é a faixa de potencial negativo relativamente ampla, devido à alta sobrevoltagem da reação de desprendimento de hidrogênio. Além disto, uma nova superfície metálica é formada rapidamente, simplesmente pela produção de uma nova gota, deixando o comportamento do eletrodo independente do seu passado. A habilidade de se obter rapidamente uma superfície nova é importante porque as correntes medidas em voltametria são bastante sensíveis à limpeza e à ausência de irregularidades da superfície. Uma limitação do eletrodo de mercúrio é a facilidade com que este metal é oxidado. Esta propriedade limita severamente o uso do eletrodo como ânodo. Em potenciais maiores do que +0,4 V ocorre formação de mercúrio (I), originando uma onda polarográfica que mascara as respostas de outras espécies que podem sofrer oxidação. Assim, este metal é geralmente empregado em estudos dos processos de redução. Entretanto, quando comparado com eletrodos sólidos, possui uma estabilidade mecânica muito baixa, sendo esta uma de suas maiores desvantagens. Outra desvantagem é a toxicidade do mercúrio, pois o resíduo gerado contamina o meio ambiente causando diversos problemas<sup>41</sup>.

Recentemente o uso de eletrodos sólidos de amálgama de prata (AgSAE, do inglês *Silver Solide Amagam Electrode*) tem sido frequente em diversas aplicações voltamétricas<sup>42, 43</sup>. Eletrodos de amálgama de cobre<sup>44</sup> também podem ser utilizados na determinação eletroanalítica de alguns compostos como pesticidas<sup>45</sup>, por exemplo. Os problemas gerados pela falta de estabilidade mecânica e a toxicidade do mercúrio contribuem para a utilização de superfícies estáveis como a do AgSAE. A capacidade de sobrevoltagem a reações de desprendimento de hidrogênio sobre a superfície dos eletrodos de amálgama é extremamente semelhante à de mercúrio líquido, permitindo sua utilização em regiões de potenciais mais negativos. A renovação da superfície sólida é um problema que pode resultar em dificuldade na reprodutibilidade e sensibilidade

dos experimentos. Nesta perspectiva, eletrodos de amálgamas representam boa alternativa ao uso do HMDE, pois, como citado, abrange regiões negativas e possui superfície estável. Diferentes modificações no AgSAE são descritas na literatura<sup>46</sup>, desde meniscos de mercúrio (m-p-AgSAE) a polidos (p-AgSAE)<sup>47</sup>.

### 1.3.1 Utilização de eletrodos sólidos de amálgama

Ciszkowska *et al.*<sup>48</sup> prepararam um microeletrodo de mercúrio em forma de disco suportado sobre amálgama de prata. O eletrodo de disco de 20-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro foi obtido facilmente por deposição da quantidade apropriada de Hg em um microdisco de prata. O microdisco de amálgama de prata pode ser preparado pela deposição sucessiva de pequenas quantidades de mercúrio sobre um microdisco de prata.

Horasawa *et al.*<sup>49</sup> estudaram o comportamento eletroquímico em função do efeito da composição de amálgamas dentárias, incluindo reações ocorridas fora das condições orais (fisiológicas). Amálgamas contendo 47,5% de mercúrio foram preparadas usando cobre de baixa porcentagem (3,0% de peso de Cu) e cobre de alta porcentagem (40-80% de Ag, 12-30% de Cu) com ou sem Zn (1,5% em peso). Voltamogramas cíclicos foram obtidos entre -1,5 e +0,8 V (vs. Ag/AgCl (3,0 mol L<sup>-1</sup> KCl)). Durante as varreduras anódicas, AgCl e filmes de Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram formados sobre as amálgamas, com exceção da amálgama de 40% em peso de Ag. Em amálgama com maior teor de cobre, um pico de oxidação foi observado em -0,1 V, indicando a oxidação da amálgama. A presença de zinco afetou os processos de oxidação para as amálgamas formadas com os dois tipos de cobre. Assim, foi possível avaliar as amálgamas por voltametria cíclica, bem como o comportamento eletroquímico das mesmas, especialmente para obter informações na formação dos compostos (AgCl e Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e na sequência das reações eletroquímicas.



Yosypchuk *et al.*<sup>41</sup> utilizaram um sensor eletroquímico à base de amálgama de prata para medidas eletroanalíticas. Um arranjo de um sensor potenciométrico-voltamétrico com amálgama de prata, onde o eletrodo de trabalho foi posto em contato com uma solução “despolarizada” contendo 10 ppm de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão acetato e 2% ácido tartárico, foi construído. O eletrodo de trabalho foi produzido inserindo-se pó de prata em um tubo de vidro. Em seguida mercúrio líquido também foi inserido no tubo completando o processo de amalgamação natural por 12 horas. O sensor foi testado usando várias soluções de diferentes concentrações de  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ .

Novotny *et al.*<sup>50</sup> utilizaram eletrodos sólidos de amálgama para análise de ácido nucléico. Os eletrodos sofreram um processo de ativação da superfície utilizando-se uma solução de KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  durante cinco minutos e sem desaeração da solução. Voltametria de redissolução catódica com pulso diferencial foi aplicada entre 0,05 e -0,25 V em meio de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Além de um ótimo sensor, as superfícies se mostraram facilmente renováveis após polimento e novo tratamento eletroquímico.

Fadrná<sup>51</sup> testou eletrodos de amálgama de prata polidos (p-AgSAE) na determinação voltamétrica de cátions metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), nitratos e tiocinatos. Após a preparação dos eletrodos, estes foram caracterizados por Difração de Raios-X, que demonstrou a formação de uma estrutura cristalina, e por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura. Estas últimas comprovaram a ausência de mercúrio líquido e sem possibilidade de degradação da amálgama. Em relação à determinação das espécies, o eletrodo se mostrou extremamente aplicável para análise em amostras de água contendo os analitos.

#### 1.4 Teoria Químico-Quântica

Atualmente, os modelos moleculares são baseados na Mecânica Quântica, que por meio da interação com os conceitos químicos no estudo mecânico-quântico da

estrutura molecular, dá origem à Química Quântica. Aliada à Termodinâmica Estatística, a Química Quântica permite uma interpretação e racionalização das propriedades macroscópicas com fundamento em nível atômico-molecular<sup>52</sup>.

O aumento progressivo da utilização da Química Quântica na determinação de propriedades moleculares ampliou o conceito de experiência química<sup>53</sup>. Assim, pode-se dizer que os métodos computacionais fazem parte da ampla gama de técnicas experimentais à disposição do químico.

#### 1.4.1 Energia dos orbitais de fronteira

Os métodos que utilizam orbitais moleculares têm sido utilizados nos cálculos de diversos parâmetros de interesse químico e farmacológico e dentre estes parâmetros dois são muito utilizados em estudos das relações estrutura-atividade: energia do HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*, orbital molecular ocupado de mais alta energia) e energia do LUMO (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, orbital molecular desocupado de menor energia). Estas energias são muito utilizadas, pois medem a capacidade doadora e aceptora de elétrons apresentada pelos compostos. Quanto maior a energia do HOMO, maior será a capacidade doadora da molécula e, deste modo, a propensão do átomo ou da molécula em doar elétrons será maior e quanto menor a energia do LUMO, menor será a resistência em aceitar elétrons<sup>54</sup>.

#### 1.4.2 Distribuição de cargas na molécula

A densidade eletrônica é uma função que fornece informações sobre a distribuição eletrônica de cargas, contida na função de onda. Esta função pode ser medida experimentalmente por meio da técnica de difração de raios-X e também por



cálculos teóricos. Sua determinação é de grande importância, encontrando aplicações em estudos de reatividade química, interações intermoleculares, similaridade molecular, dentre outras<sup>55</sup>. Existem várias maneiras de representar a densidade de carga em uma molécula: por meio de diagramas de contorno de um determinado plano da molécula ou por meio de superfícies de isovalores. A análise desses diagramas fornece informações importantes em relação à estrutura eletrônica da molécula.

### **1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios-X**

O microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons ao invés de fótons (microscópio óptico convencional) para aumentar a resolução da imagem. A partir de uma voltagem alta, por exemplo, 50 kV, elétrons de comprimento de onda extremamente curto são produzidos. Por possuírem cargas, os elétrons podem ser focalizados em campos elétricos ou eletrostáticos e, assim, formar imagens.

A análise por Energia Dispersiva de Raios-X possui o mesmo princípio físico, mas fornece resultados diferentes. O feixe de elétrons é suficientemente energético para ionizar as camadas profundas dos átomos e produzir emissões de raios-X. Por meio da análise dos espectros obtidos é possível determinar os elementos presentes na amostra.

### **1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular, é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido e ocupa, igualmente, uma posição respeitável no campo da análise qualitativa e quantitativa.<sup>56</sup> Ela está baseada na medida da absorção de radiação



eletromagnética na região de radiofrequência de cerca de 4 a 900 MHz. Diferentemente das absorções no ultravioleta, visível e infravermelho, núcleos dos átomos, ao invés de elétrons externos, estão envolvidos no processo. Adicionalmente, para se fazer com que os núcleos desenvolvam os estados de energia necessários para que a absorção aconteça, é necessário submeter o analito a um campo magnético intenso<sup>57</sup>.

A base teórica da espectroscopia de RMN foi proposta por Pauli em 1924, sugerindo que certos núcleos atômicos deveriam ter as propriedades de spin e momento magnético e que, conseqüentemente, a exposição a um campo magnético deveria levar a um desdobramento de seus níveis de energia. Durante a década seguinte, esses postulados foram verificados experimentalmente. Nos primeiros cinco anos que se seguiram à descoberta da RMN, os químicos se conscientizaram de que o ambiente molecular influencia a absorção de radiação de radiofrequência (RF) por um núcleo em um campo magnético e que esse efeito pode ser correlacionado com a estrutura molecular. Sendo assim, a RMN é uma das ferramentas mais poderosas disponíveis para químicos e bioquímicos na elucidação da estrutura de espécies químicas, sendo também útil para a determinação quantitativa de espécies absorventes<sup>57</sup>.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia eletroanalítica utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata, p-AgSAE (70Hg:30Ag) na determinação do antifúngico Cetoconazol em meio de eletrólito puro e em formulações comerciais. No mercado, o fármaco encontrado nas formas de comprimido, creme e xampu, onde uma das marcas mais comercializadas é o Cetoneo<sup>®</sup>. Outro ponto a ser avaliado será uma tentativa de proposição mecanística com que ocorre a etapa redox da reação sobre o eletrodo sólido de amálgama de prata por meio de cálculos teóricos e avaliação dos produtos de eletrólise.

### 2.2 Objetivos específicos

De acordo com o objetivo geral, seguem abaixo os objetivos específicos:

1. Otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos, onde se obtém uma melhor resposta, tanto em intensidade de corrente de pico quanto em perfil voltamétrico, para o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação do fármaco em eletrólito puro;
2. Construção de curvas de trabalho e cálculos dos limites de detecção, de quantificação e de eficiência dos procedimentos;
3. Aplicação dos procedimentos otimizados em amostras de medicamentos amplamente comercializados;
4. Estudos do comportamento eletroquímico do CTZ por Voltametria Cíclica para a elucidação do tipo de processo envolvido, bem como calcular o número de elétrons envolvidos no mesmo;
5. Estudos teóricos envolvendo a determinação da estrutura mais estável, cálculo dos orbitais de fronteira e previsão dos espectros de RMN  $H^1$ ;



6. Estudos de eletrólise exaustiva com potencial controlado para obtenção dos produtos resultantes com acompanhamento por UV-VIS e posterior caracterização destes produtos por RMN  $H^1$ .

### **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Equipamentos, programas e acessórios**

Os ensaios voltamétricos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie, Utrecht, Holanda) conectado a um computador pelo programa GPES-4 para aquisição e tratamento dos dados experimentais obtidos. Nos trabalhos de química teórica foram utilizados os programas GAUSSIAN 03 e CHEMBIO3D ULTRA 11.0. No experimento de caracterização da superfície do eletrodo de trabalho foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (modelo Veja XMU, Tescan, EUA). Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se balança analítica Kern, modelo 410 com precisão de  $\pm 0,01$  mg. A água usada na preparação destas soluções e na lavagem das vidrarias era purificada pelo tratamento em um sistema Milli-Q (Milipore, Inc.), apresentando resistividade 18,2 M $\Omega$  cm. As medidas de pH foram feitas utilizando um pHmetro Micronal modelo B474.

#### **3.2 Reagentes e Soluções**

##### **3.2.1 Eletrólitos de suporte**

Todas as soluções de reagentes analíticos foram preparadas com água purificada em um sistema Milli-Q.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) foram utilizados no preparo da solução de tampão fosfato utilizado nos estudos. A mistura apropriada de soluções 0,066 mol L<sup>-1</sup> dos componentes proporciona soluções nos pHs requisitados<sup>58</sup>. Solução tampão Britton-Robinson (tampão BR) 0,04 mol L<sup>-1</sup> foi preparada com  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,04 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,04 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,04 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). O pH das soluções foi ajustado com adição de KOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

### 3.2.2 Reagentes diversos

Os solventes diversos utilizados neste trabalho foram Etanol (Vetec - 99,9%, Rio de Janeiro-RJ, Brasil), Metanol (Synth - 99,8%, São Paulo-SP, Brasil) e Diclorometano (Synth - 99,5%, São Paulo-SP, Brasil). A solução utilizada na etapa de ativação do p-AgSAE foi KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

### 3.2.3 Solução de Cetoconazol

Cetoconazol (Sigma-Aldrich) foi utilizado na preparação da solução estoque do fármaco (1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) em meio etanólico e em seguida foi estocada sob refrigeração a cerca de 4 °C. A massa utilizada para o preparo de 5,0 mL de solução foi de 0,00265±0,00001 g. A partir desta solução, foi preparada, por diluição, uma segunda solução estoque na concentração de 1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### 3.2.4 Solução de comprimido Cetoneo<sup>®</sup>

Foram pesados 5 (cinco) comprimidos e obtida a massa média de 0,4025 ± 1,32x10<sup>-3</sup> g. A concentração de CTZ nos comprimidos é de 200 mg/comprimido. Os comprimidos foram macerados, sendo a massa adequada pesada em papel manteiga e transferida para tubo de Falcon<sup>®</sup>, tendo o volume ajustado para 5,0 mL. O solvente utilizado para extração do princípio ativo foi etanol, sendo a composição levada para agitação ultrassônica durante cinco minutos<sup>59</sup>. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada para preparação do estoque diluído. As soluções foram armazenadas em geladeira à temperatura de, aproximadamente, 4 °C.

### **3.2.5 Soluções de creme e de xampu Cetoneo®**

As concentrações nominais das amostras de creme e xampu foram, respectivamente, de  $20 \text{ mg g}^{-1}$  e  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ . No preparo da solução estoque de creme, uma massa de 1,3852 g foi pesada em um béquer de vidro com capacidade de 25 mL, sendo solubilizada com mistura 1:1 de metanol/diclorometano e colocada sob agitação ultrassônica durante cinco minutos. A solução foi estocada sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ . Para a amostra de xampu, foi tomado um volume de 1,3 mL do mesmo, seguindo o mesmo modo de preparo utilizado para a amostra de creme.

## **3.3 Eletrodos e sistema eletroquímico**

### **3.3.1 Eletrodo de trabalho**

Nos experimentos foi utilizado como eletrodo de trabalho amálgama de prata sintetizado de acordo com o método descrito por Yospchuck e Novotný<sup>46</sup>, na proporção 30:70 (Ag:Hg) em massa, com área geométrica de disco igual a  $6,76 \text{ mm}^2$ . O eletrodo foi preparado por meio de amalgamação mecânica, utilizando um cadinho e um almofariz para desempenhar a tarefa. Após etapa de polimento em lixa 1200, o eletrodo de trabalho foi submetido a procedimento de ativação em  $\text{KCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$  que consistiu da aplicação de um potencial de  $-2,2 \text{ V}$  durante 600 s sob borbulhamento constante de nitrogênio seguido de repetidas varreduras de 0 a  $-2,2 \text{ V}$  com velocidade de  $500 \text{ mV s}^{-1}$  até a estabilização do potencial.

### **3.3.2 Eletrodo de referência**

O eletrodo de referência utilizado ns experimentos era constituído de um fio de prata anodizado imerso em solução saturada de  $\text{AgCl}$  e  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$  em meio aquoso

(Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>), cujo valor do potencial é de cerca de 0,222 V em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio<sup>60</sup>.

### 3.3.3 Eletrodo auxiliar

Como eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo foi utilizado um fio de platina (Heraeus Vectra – 99,5%, São Paulo-SP) de 0,5 cm de comprimento em espiral.

### 3.3.4 Sistema eletroquímico

Nos experimentos foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro Pyrex<sup>®</sup> com capacidade de 25,0 mL e tampa em Teflon<sup>®</sup> contendo orifícios para os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, e um quarto orifício para introdução de um capilar de vidro para desoxigenação da solução utilizando nitrogênio 4.6 (White Martins, Fortaleza - CE). A Figura 7 apresenta um esquema da célula utilizada nos experimentos.

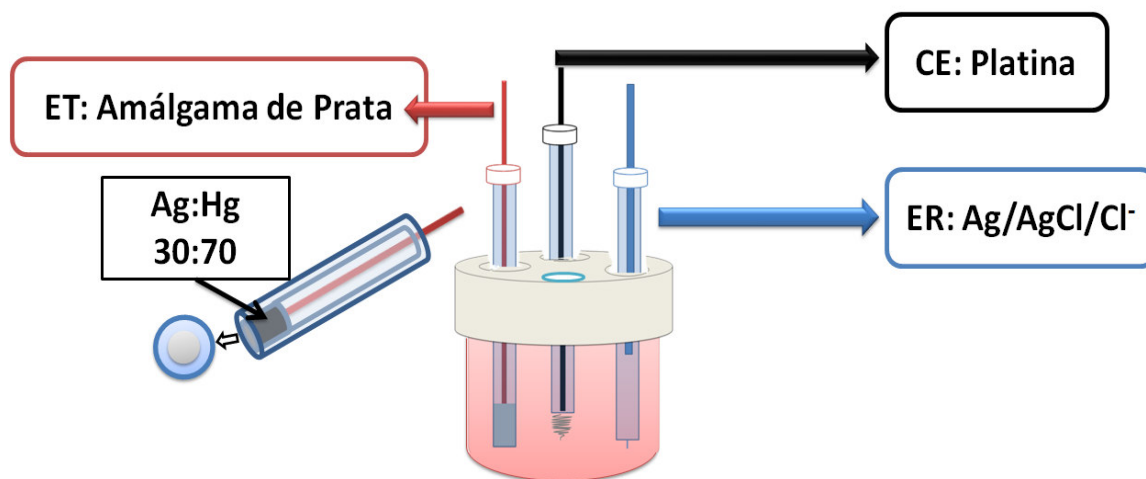


Figura 7. Representação esquemática do sistema eletroquímico utilizado nos experimentos voltamétricos. ET: eletrodo de trabalho (p-AgSAE); CE: contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar (Pt); ER: eletrodo de referência (Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>).

### **3.3 Caracterização da superfície eletródica**

A caracterização da superfície do eletrodo de trabalho foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) por meio de microscópio da marca PHILIPS modelo XL-30. As análises da composição química das amostras foram feitas por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX), utilizando um microanalisador de raios-X acoplado ao MEV. A análise foi realizada em uma área com ampliação de cerca de 200 vezes, para o eletrodo antes e após a etapa de ativação.

### **3.4 Estudos eletroanalíticos e eletroquímicos**

#### **3.4.2 Estudo do eletrólito suporte e pH**

Este estudo visa a escolha do meio adequado para a resposta eletroquímica do CTZ sobre o eletrodo de trabalho. Esta adequação se dá em função de um perfil voltamétrico bem definido e maior corrente de pico, bem como não apresentar processos naturais de interação com a superfície do eletrodo de trabalho. Testes de eletroatividade foram realizados utilizando a técnica de Voltametria Onda Quadrada, sendo testados os seguintes eletrólitos de suporte: tampão fosfato  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5, tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5, perclorato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e sulfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Após esta escolha, foi realizado um estudo do pH e a influência do mesmo no processo eletroquímico de redução do CTZ.

#### **3.4.3 Estabelecimento da metodologia eletroanalítica**

Após a escolha do eletrólito adequado e das condições de potencial hidrogeniônico, procedeu-se à otimização dos parâmetros da VOQ: frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ). Estes foram estudados para buscar uma melhor adequação da técnica de VOQ, para ampliar a sensibilidade em relação à redução de CTZ, bem como investigar o tipo de processo envolvido. Após o

estabelecimento dos parâmetros de VOQ, estudou-se a região de linearidade onde ocorre uma dependência entre  $I_{pc}$  e [CTZ]. Após esta etapa, foram obtidas curvas analíticas para o composto estudado. A partir dos resultados encontrados foram calculados os valores dos limites de detecção e de quantificação para a metodologia proposta, bem como foram avaliados os diversos parâmetros analíticos (estabilidade, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez) para validação da mesma.

#### **3.4.4 Eletrólise com potencial controlado**

Eletrólise com potencial controlado foi realizada utilizando a célula eletroquímica apresentada anteriormente na Figura 7, para a obtenção do(s) produto(s) formado(s) a partir da reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE, onde estes produtos seriam identificados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Para tal sequência de experimentos, foram preparados 25 mL de uma solução de CTZ  $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$ . A degradação do CTZ foi acompanhada por Espectroscopia na região do Ultravioleta e do Visível (UV-Vis) por meio de varredura entre 800 e 200 nm, para obtenção da banda de absorbância.

#### **3.4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

A amostra eletrolisada resultante foi liofilizada para evaporação do solvente, sendo o material resultante dissolvido em metanol como solvente e TMS (tetrametilsilano) como padrão interno de referência. O espectro de RMN  $H^1$  obtido foi utilizado para identificação dos possíveis produtos de redução do CTZ sobre p-AgSAE.





### 3.4.6 Estudo Químico-Quântico

Tanto a estrutura de menor energia como o mapa de energia dos orbitais de menor energia foram obtidos utilizando-se a teoria do funcional de densidade (DFT), com o funcional B3LYP e o conjunto de base DGDZVP, contidos no programa Gaussian03e no programa ChemOffice. Assim, foi realizado preliminarmente um estudo de otimização da estrutura do CTZ. Empregou-se cálculo teórico para geometrização da estrutura do CTZ. A partir da estrutura mais estável, foram calculadas as cargas sobre os átomos, assim como as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ativação do eletrodo de trabalho

A ativação da superfície do eletrodo de trabalho é uma etapa fundamental realizada preliminarmente, com o objetivo de habilitar a superfície do eletrodo às reações que envolvem transferência de carga. De acordo com a literatura, o meio eletroquímico mais adequado para tal fim, apresentou-se como sendo KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Embora não haja uma discussão esclarecendo as razões para esta característica, este foi o meio utilizado nos experimentos realizados feitos para ativação do eletrodo.

Durante a aplicação do potencial de -2,2 V, foi observado intenso desprendimento de H<sub>2</sub>, que é um indício de que a superfície não apresenta grandes dificuldades em transferência de carga. Após a aplicação deste potencial, sucessivos ciclos utilizando a técnica de Voltametria Cíclica foram obtidos, até a estabilização da corrente medida, que normalmente ocorre após o 30º ciclo de operação. A Figura 8 apresenta o perfil observado após a estabilização da corrente no eletrodo.

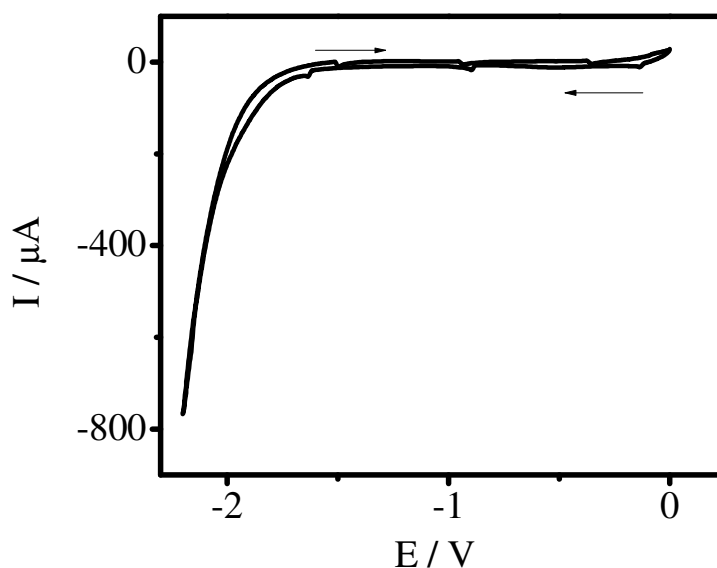
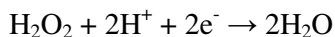
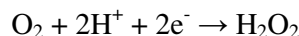


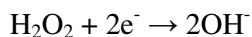
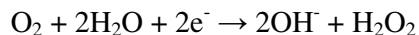
Figura 8. Voltamograma cíclico exibido após o pré-tratamento do p-AgSAE em solução de KCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> de 0 a -2,2 V com velocidade de varredura de 500 mV s<sup>-1</sup>.



Este perfil voltamétrico foi utilizado como referência. Cada ativação era comparada com o voltamograma padrão, tendo como objetivo alcançar repetibilidade nos diversos experimentos realizados. O gás nitrogênio aplicado durante a etapa de condicionamento tinha duas funções principais, sendo a primeira delas a desaeração da solução de KCl utilizada como eletrólito de suporte e a segunda, a remoção do hidrogênio formado na varredura direta, gerado a partir das reações de eletrólise da água. O oxigênio é reduzido em duas etapas consecutivas de dois elétrons ou em uma única etapa de quatro elétrons que variam entre -0,05 e -0,90 V vs. SCE, dependendo do pH e do material do eletrodo. Em solução ácida:



Caso a solução de trabalho possua um pH básico:



Como consequência, na região catódica e na presença de  $\text{O}_2$ , a corrente de fundo (corrente gerada por processos não faradaicos - capacitivos) será alta e poderá mascarar a corrente produzida pela espécie eletroativa, uma vez que o oxigênio, radicais como  $\text{HO}_2^\bullet$  e o peróxido de hidrogênio podem combinar-se com os reagentes e/ou produtos da reação eletroquímica em estudo. Por isso, é necessário remover o  $\text{O}_2$  dissolvido na solução antes das medidas serem efetuadas. O  $\text{N}_{2(\text{g})}$  é borbulhado na solução durante alguns minutos, removendo o  $\text{O}_2$ , e passando a ocupar seu lugar na solução. Assim, esta etapa é de grande importância, especialmente para estudos feitos

na região de potenciais negativos <sup>61</sup>. Outro papel para o gás de purga é a remoção do hidrogênio (H<sub>2</sub>) adsorvido na superfície do p-AgSAE, que é gerado na varredura direta.

Em relação à modificação sofrida pela superfície eletródica após o pré-tratamento, não há discussão na literatura e nem foi considerado como objeto de estudo deste trabalho.

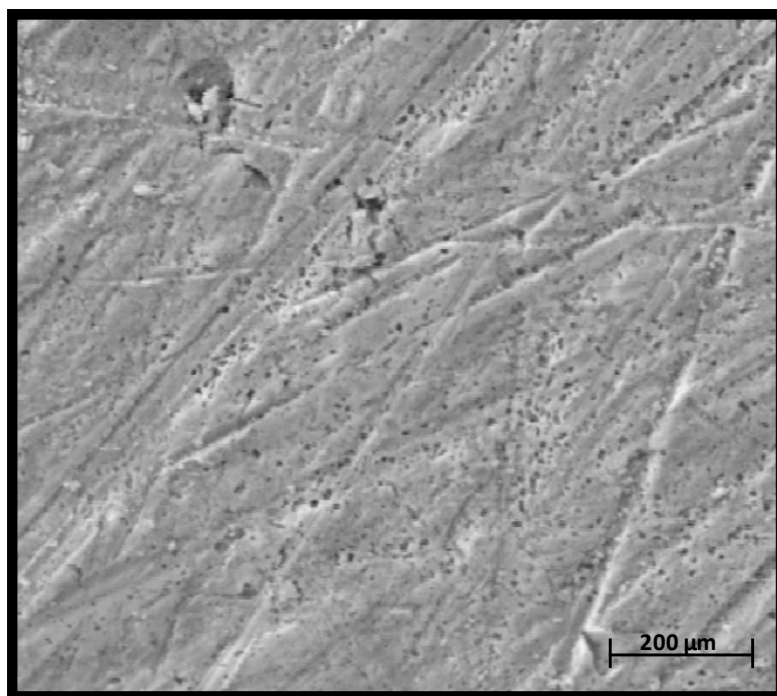
## **4.2 Caracterização da superfície eletródica do p-AgSAE**

O p-AgSAE possui características semelhantes ao HMDE, destacando-se a sua capacidade de sobrevoltagem em relação à reação de desprendimento de hidrogênio. Além disso, apresenta uma boa estabilidade mecânica com total ausência de mercúrio líquido. Experimentos de difração de Raios-X mostraram que a forma predominante na composição 30:70 (proporção Ag:Hg) é Ag<sub>2</sub>Hg<sub>3</sub>, encontrando-se ainda outras formas, tais como Ag<sub>3</sub>Hg<sub>2</sub>, AgHg e HgO<sup>51</sup>.

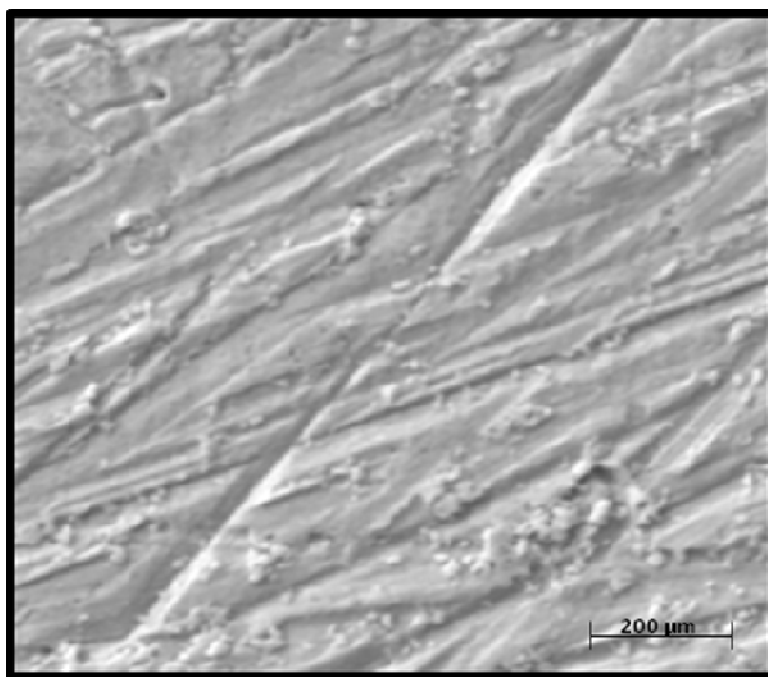
### **4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios-X**

Os experimentos de MEV e EDX foram realizados com o objetivo não só de avaliar e caracterizar a superfície eletródica, mas também de investigar quaisquer mudanças ocorridas na superfície do p-AgSAE, decorrentes da etapa de pré-tratamento.

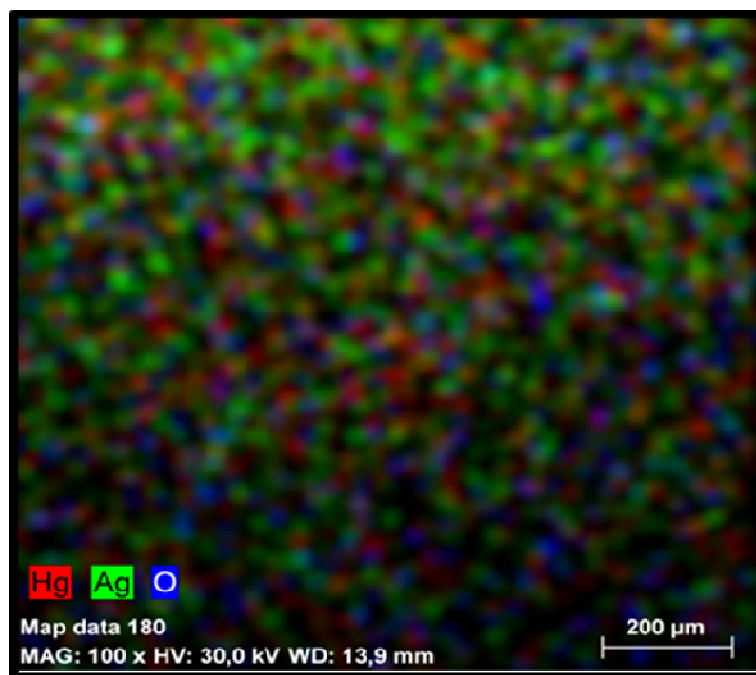
As Figuras 9 e 10 apresentam as imagens obtidas por MEV para os eletrodos antes e após a etapa de ativação. Na Figura 9, observa-se a presença da camada de óxido de mercúrio formada naturalmente sobre a superfície do p-AgSAE. Esta camada se caracteriza pelo pouco brilho e maior rugosidade da superfície do eletrodo de trabalho. Após o polimento e ativação da superfície, toda a camada de óxido foi removida, apresentando maior brilho, como pode ser observado na Figura 10. Também se observam as ranhuras produzidas pelo polimento realizado sobre a superfície. Já as Figuras 11 e 12 apresentam o mapeamento por EDX das superfícies eletródicas, antes e após a etapa de ativação.



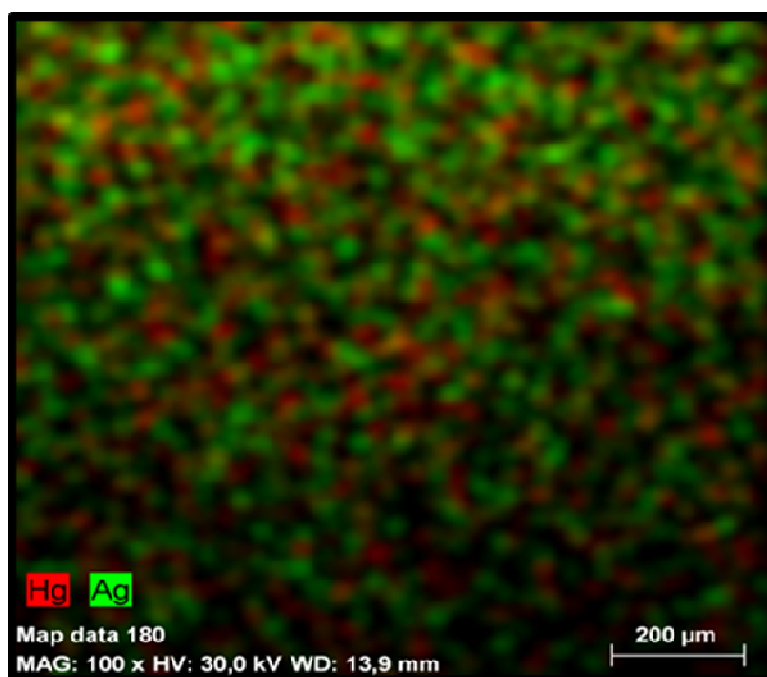
*Figura 9. Imagem da superfície do p-AgSAE antes da etapa de ativação da superfície eletródica.*



*Figura 10. Imagem da superfície do p-AgSAE após a etapa de ativação da superfície eletródica.*



*Figura 11. Mapeamento atômico da superfície do p-AgSAE antes da etapa de ativação, apresentando os pontos contendo possivelmente óxido de mercúrio.*



*Figura 12. Mapeamento atômico da superfície eletródica após a etapa de ativação, onde se observa a ausência da camada de óxido da superfície do eletrodo.*

Na Figura 11, que representa a distribuição para a superfície oxidada, observam-se pontos em azul (representando o oxigênio presente na superfície), que possivelmente indicam os locais onde se encontram óxidos de mercúrio formados. Já na Figura 12 não se observam pontos de oxigênio, caracterizando que toda a camada de óxido foi removida. A importância da retirada (limpeza) da camada de óxido da superfície se justifica em função da formação de um filme de passivação, que dificulta as transferências eletrônicas que ocorrem na superfície do eletrodo.

Outro ponto a ser citado é a distribuição dos átomos sobre a superfície. De acordo com a literatura<sup>51</sup>, a forma predominante é  $\text{Ag}_2\text{Hg}_3$ , mas na distribuição dos átomos a prata parece estar em maior quantidade sobre a superfície. Entretanto, esta distribuição é apenas um efeito visual da camada mais superficial do eletrodo, não abrangendo, de fato, o arranjo cristalino presente na superfície. Já a Figura 13 apresenta o espectro de EDX para p-AgSAE ativado, comprovando a presença dos metais Ag e Hg, além da ausência de impurezas metálicas presentes na amálgama. A proporção atômica encontrada para a razão Ag:Hg foi de 23,4:76,6 %.

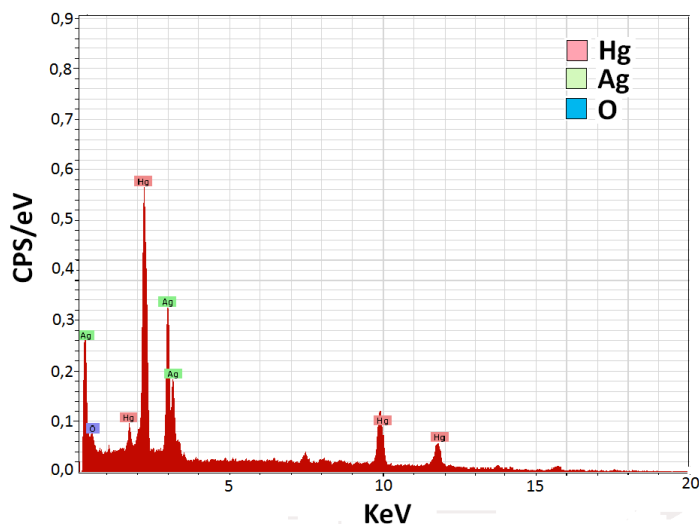


Figura 13. Espectro de EDX para a superfície do p-AgSAE após ativação em  $\text{KCl}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 4.3 Estudos analíticos para Cetoconazol sobre p-AgSAE

A primeira etapa a ser estudada é a busca pela melhor condição de obtenção do sinal analítico, sendo estudado o eletrólito de suporte e o pH do meio.

Para que a metodologia desenvolvida seja validada, faz-se necessário estabelecer os padrões de confiança do método. Assim, a validação de uma metodologia pode ser definida como o processo de estabelecer uma evidência documentada de que o método é capaz de medir o que ele tem como finalidade medir<sup>62</sup>. Os ensaios foram realizados de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>63</sup> para validação de métodos analíticos e bioanalíticos na determinação de fármacos em produtos farmacêuticos. De acordo com este guia, alguns parâmetros que devem ser avaliados são os seguintes: estabilidade, seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

#### 4.3.1 Estudo do eletrólito de suporte

Foram testados os eletrólitos Tampão Fosfato e Tampão BR<sup>64</sup>, assim como  $\text{NaClO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Os eletrólitos perclorato e sulfato possuem um pH de aproximadamente 5,0. Então, para fins de comparação foi realizado o ajuste do pH de trabalho dos tampões para o valor de 5,0. A Figura 14 apresenta os perfis voltamétricos para os eletrólitos citados acima. Perclorato e sulfato apresentam vários processos redox resultantes da interação com a superfície do p-AgSAE. Estes processos podem influenciar a resposta analítica, provocando redução no desempenho do método, pois as reações podem, por exemplo, bloquear os sítios ativos onde ocorrem as reações de redução sobre a superfície do eletrodo, gerando, assim, perda de sensibilidade.



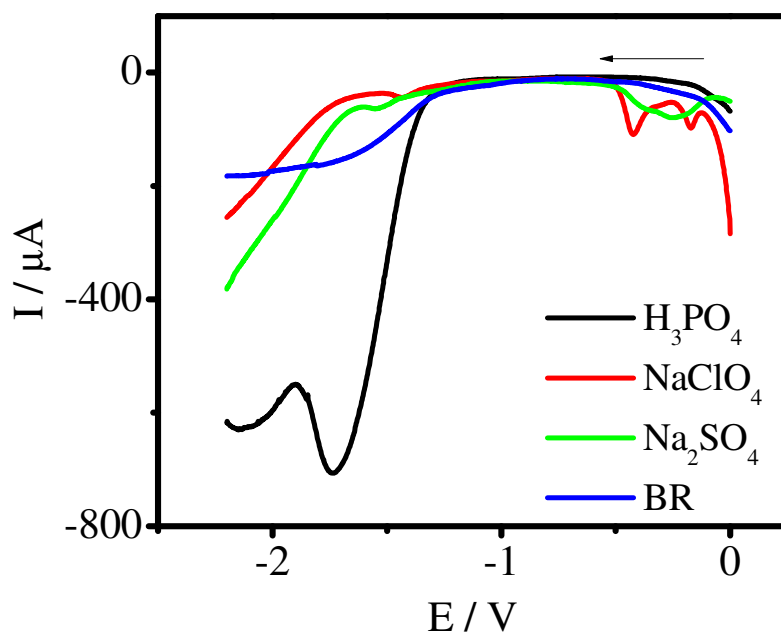


Figura 14. Voltamogramas de Onda Quadrada para os diversos eletrólitos:  $\text{NaClO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0; tampão fosfato pH 5,0, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Em relação ao fosfato, este apresentou um pico intenso em  $-1,8 \text{ V}$  como pode ser observado na Figura 14. Possivelmente, ocorre uma reação de redução do fosfato, presente em solução, a fosfito. Apesar do tampão BR possuir fosfato em sua composição, este foi selecionado por não apresentar processos eletródicos sobre p-AgSAE como mostrado anteriormente, caracterizando-se como eletrólito inerte. De acordo com os resultados observados, o eletrólito de suporte escolhido, tendo em vista suas características inertes, foi o Tampão BR.

#### 4.3.2 Estudo do pH para o tampão BR

Pode-se observar na Figura 15 os perfis voltamétricos obtidos nos diferentes valores de pH estudados, para a redução de CTZ sobre p-AgSAE em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>.

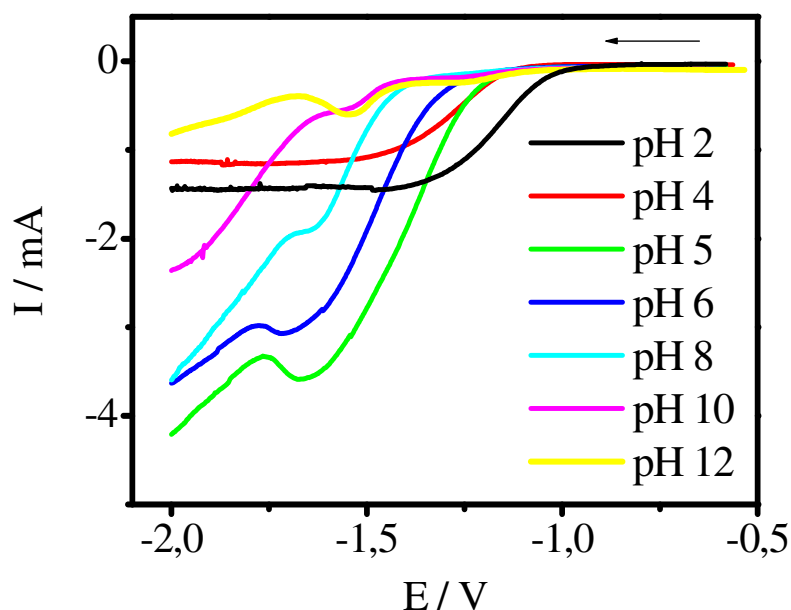


Figura 15. Voltamogramas de Onda Quadrada apresentando os perfis voltamétricos para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de tampão BR a 100 mV s<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH.

Para a escolha do melhor pH de trabalho, são normalmente considerados dois aspectos<sup>65</sup>: primeiramente, o perfil voltamétrico e em seguida a corrente de pico. Nos pHs 2 e 4 não foi observado pico referente a redução do CTZ, possivelmente por causa das reações de desprendimento de hidrogênio que são catalisadas em meios mais ácidos e podem estar mascarando o pico de redução. Observando os perfis voltamétricos, pode-se perceber que em pH 12 (linha em amarelo) o pico de redução do CTZ possui uma definição não observada nos demais pHs estudados, embora sua corrente de pico seja consideravelmente inferior. A seletividade (estreitamento do pico) pode ser utilizada para justificar a escolha do pH 12. Para tanto, é necessária a avaliação da largura de



meia altura  $\Delta E_{p/2}$ <sup>66</sup>. Largura de meia altura superior a 100 mV implica em redução na seletividade, pois vários processos podem estar ocorrendo em uma região de potencial abrangente. No caso específico do pH 5, o processo de redução se inicia em aproximadamente -1,15 V, finalizando-se em cerca de -1,75 V. Este é um processo extremamente largo, com uma onda voltamétrica com mais de 600 mV de largura. Esta característica diminui com a elevação do pH de trabalho, tornando-se um processo cada vez mais definido. A Figura 16 mostra  $\Delta E_{p/2}$  em função do pH, de forma que apenas o pH 12 possui este parâmetro inferior a 100 mV. Como em pH 12, o valor de  $I_p$  é superior ao obtido em pH 10, foi escolhido pH 12 como o mais adequado.

No trabalho desenvolvido por Shamsipur<sup>24</sup> os estudos de pH utilizando tampão BR como eletrólito suporte permitiram a obtenção exata do valor do pKa para o composto, sendo este de  $6,95 \pm 0,4$ . Foi observado que quando a molécula de CTZ está na forma protonada, faixa de pH de 4 – 8, a reação de oxidação é dificultada; por outro lado, em pHs mais alcalinos, faixa de pH de 8 – 12, o pico de oxidação apresenta valores crescentes de correntes, tendo um máximo no pH 12. Assim, apenas o critério de corrente de pico foi utilizado como parâmetro de definição do pH mais adequado, de forma que pH 12 foi escolhido para os estudos de quantificação do CTZ utilizando eletrodo de pasta de carbono.

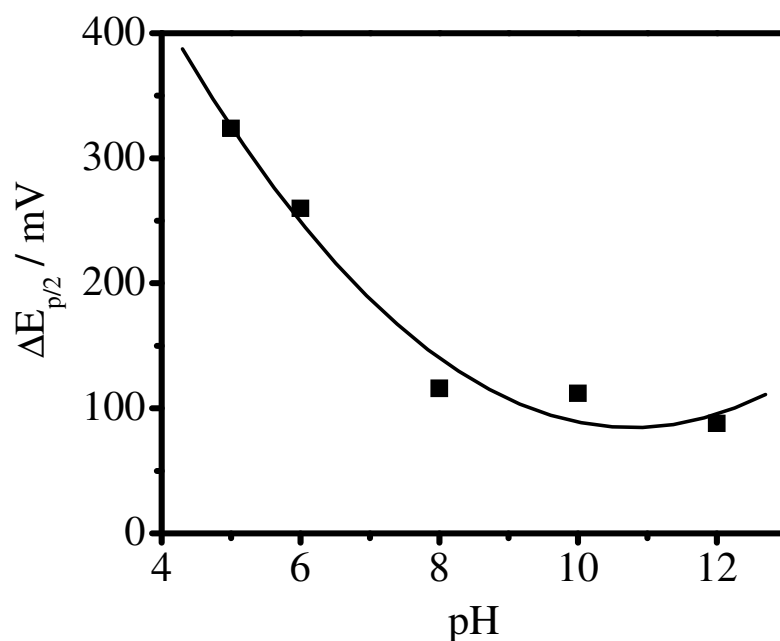


Figura 16. Relação entre largura do potencial de meia onda ( $\Delta E_{p/2}$ ) e o pH.

Os valores de  $\Delta E_{1/2}$  vs. pH encontram-se na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Relação entre pH e os respectivos potenciais de meia altura ( $\Delta E_{p/2}$ ), para a redução de CTZ em tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  sobre p-AgSAE.

pH	2	4	5	6	8	10	12
$\Delta E_{p/2}$ (mV)	-	-	323,8	259,9	115,9	111,7	87,9

Observando os dados da Tabela 2 acima, fica claro que apenas em pH 12 o valor da largura de meia onda está abaixo de 100 mV, sendo este, de fato, o pH mais adequado para realização dos estudos.

Embora haja redução significativa de corrente de pico, em análises de formulações farmacêuticas não é necessário um limite de detecção muito baixo, uma vez que as concentrações nos medicamentos são altas.

#### 4.3.4 Componentes da Voltametria de Onda Quadrada

Com relação às componentes de corrente (direta e reversa), pode-se observar que se utilizando a técnica de VOQ ocorre um ganho significativo de corrente, em função da soma realizada entre as correntes direta e reversa, como pode ser observado na Figura 17. Como descrito anteriormente, a corrente resultante é dada pelo somatório das correntes direta e reversa de aplicação dos pulsos de potencial  $I_p = I_d - I_r$ . Como a corrente reversa possui sinal algébrico negativo, tem-se o somatório das correntes direta e reversa (quando há reversibilidade), gerando um aumento no sinal observado e, consequentemente, ganho em sensibilidade.

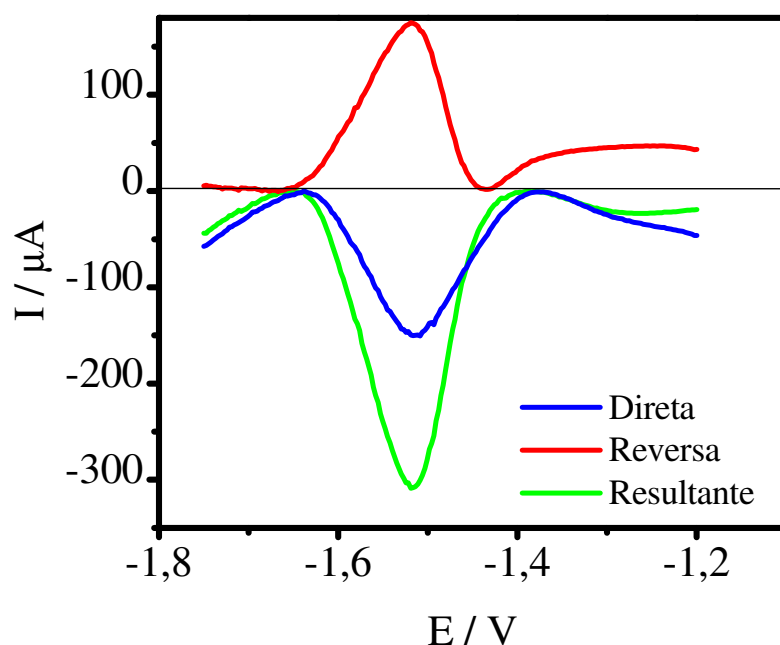


Figura 17. Componentes de corrente dos Voltamogramas de Onda Quadrada para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 12;  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

A separação e demonstração dessas correntes são utilizadas para se observar a existência de pico no sentido reverso da varredura, e assim, realizar uma avaliação prévia do tipo de reação redox que ocorre no sistema, sendo similar ao realizado quando

se utiliza a técnica de Voltametria Cíclica. A componente direta apresentou um potencial de pico em -1,51 V e a componente reversa um potencial em -1,51V. Isso expressa uma diferença de aproximadamente 5 mV. A razão ( $I_d/I_r$ ) das correntes de pico dessas componentes foi de 0,91, o que demonstra uma grande contribuição da componente reversa do sistema, promovendo um ganho de 100% em termos de valores de corrente de pico, com a utilização da componente resultante. Assim, pode-se observar a presença tanto de pico no sentido direto como reverso, o que mais uma vez reforça a característica de quase-reversibilidade do processo.

### 4.3.3 Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada

#### 4.3.3.1 Frequência de aplicação do pulso de potencial

Uma vez estabelecidas as condições de pH, foram feitos experimentos para otimização dos parâmetros da VOQ. A Figura 18 apresenta a variação da frequência (faixa de estudos de 10 a 300 s<sup>-1</sup>) de aplicação dos pulsos de potencial para a reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE.

Por meio das relações estabelecidas nas condições de contorno da VOQ<sup>31</sup>, a dependência entre  $I_p$  e frequência pode ser observada nas Figuras 19 e 20. Na Figura 19 não há dependência linear em todo o intervalo estudado. Em baixas frequências não se observa linearidade entre  $I_p$  e  $f$ , o que passa a ocorrer a partir de 40s<sup>-1</sup>. De acordo com as condições de contorno, para que um processo seja irreversível deve haver completa dependência entre as variáveis citadas. Assim, por esta relação não é possível afirmar que o processo seja irreversível. Avaliando-se a Figura 20, também não é observada uma dependência linear entre  $I_p$  e  $f^{1/2}$ , não sendo reversível o processo em questão. Para processos quase reversíveis, as relações entre  $I_p$  e frequência não são lineares, desta forma é possível que o processo seja quase reversível.

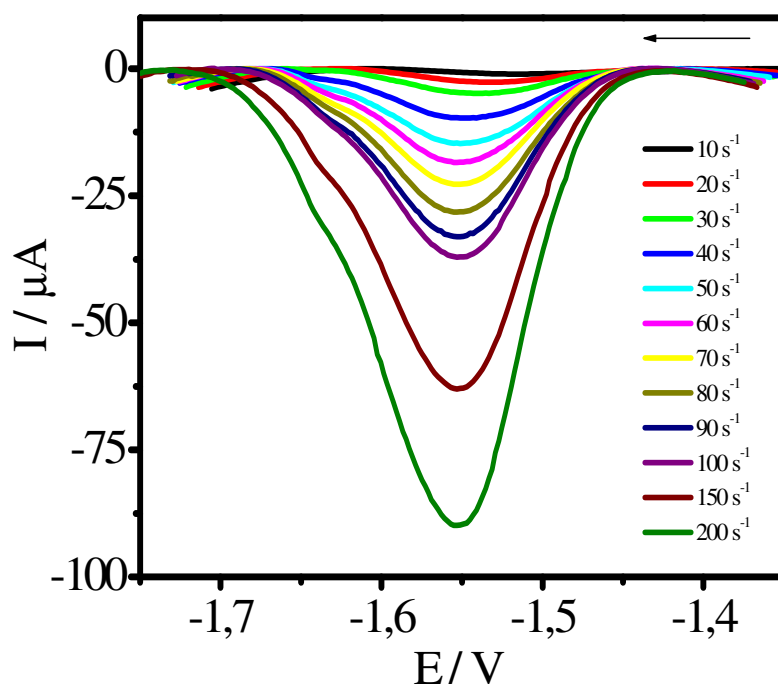


Figura 18. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação da frequência de aplicação do pulso de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $\alpha = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Mais uma relação pode ser estabelecida avaliando-se o comportamento existente entre  $E_p$  e  $\log f^{1/2}$  como pode ser observado na Figura 21. Processos reversíveis com adsorção de produto e processos quase reversíveis apresentam relações não lineares entre  $E_p$  e  $\log f^{1/2}$ . Como não houve deslocamento do potencial de pico com o aumento da frequência, conclui-se que as interações de adsorção são fracas<sup>67</sup>. Este é mais um indício da quase reversibilidade do processo.

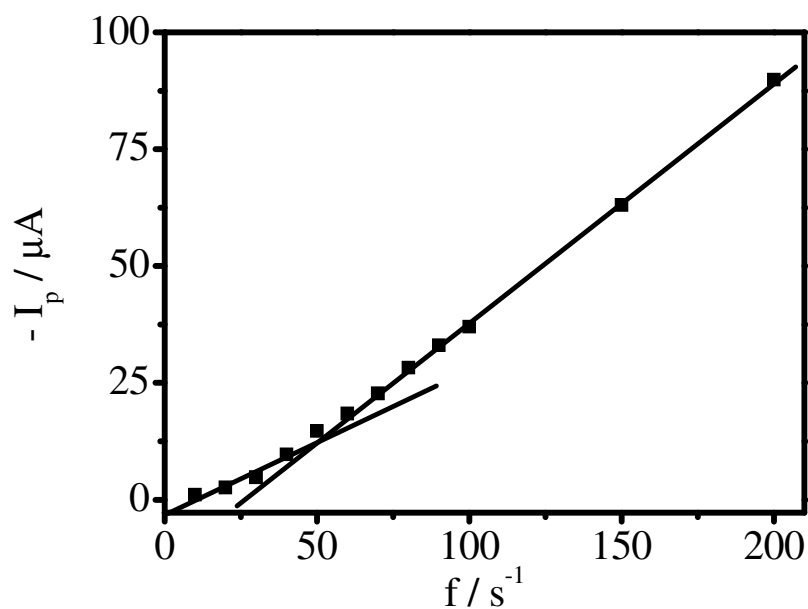


Figura 19. Relação entre  $I_p$  vs.  $f$  para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  tampão BR pH 12,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

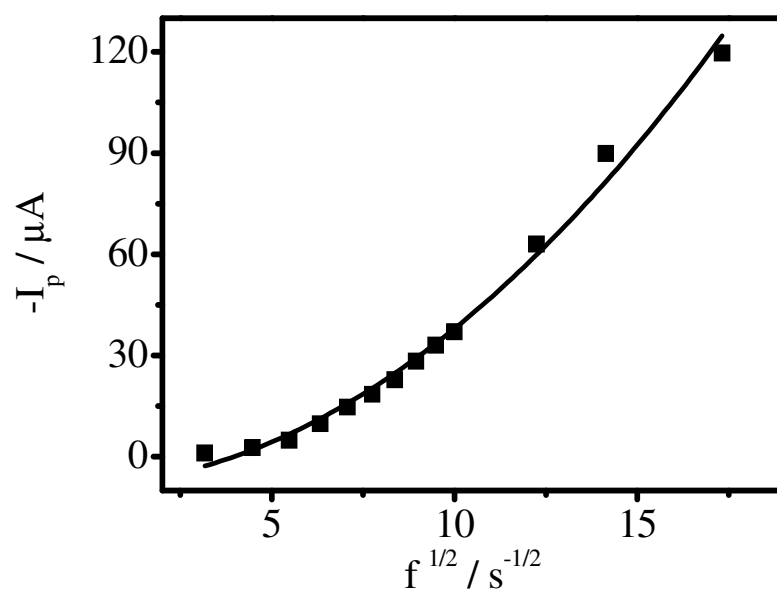


Figura 20. Relação entre  $I_p$  e  $f^{1/2}$  para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  tampão BR pH 12,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.



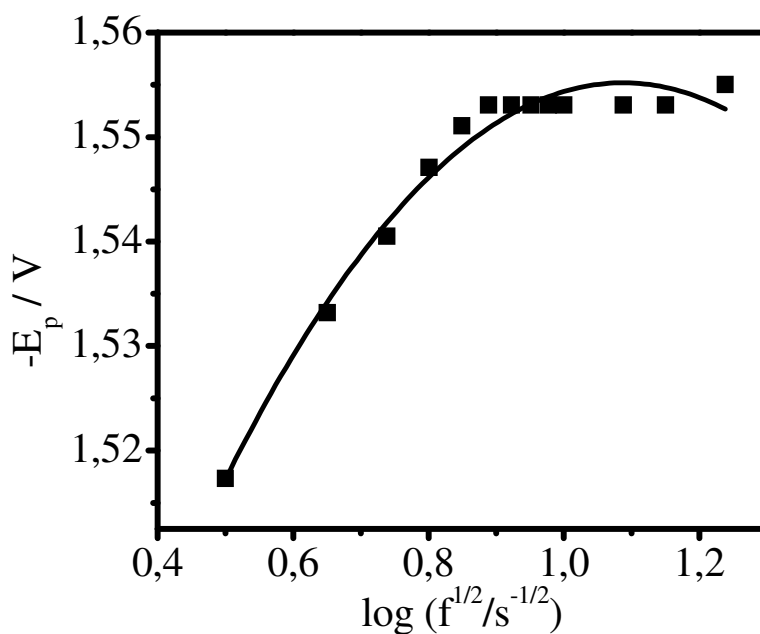


Figura 21. Relação entre  $E_p$  e  $\log f$  para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $\alpha = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Há ainda uma quarta relação que pode ser utilizada para definir se um processo é ou não quase-reversível: a caracterização de um “Máximo Quase Reversível”. Esta relação pode ser estabelecida entre  $I_p/f$  vs.  $f$ . O aparecimento de um máximo caracteriza o processo como quase reversível. A Figura 22 apresenta a relação entre  $I_p/f$  vs.  $f$ .

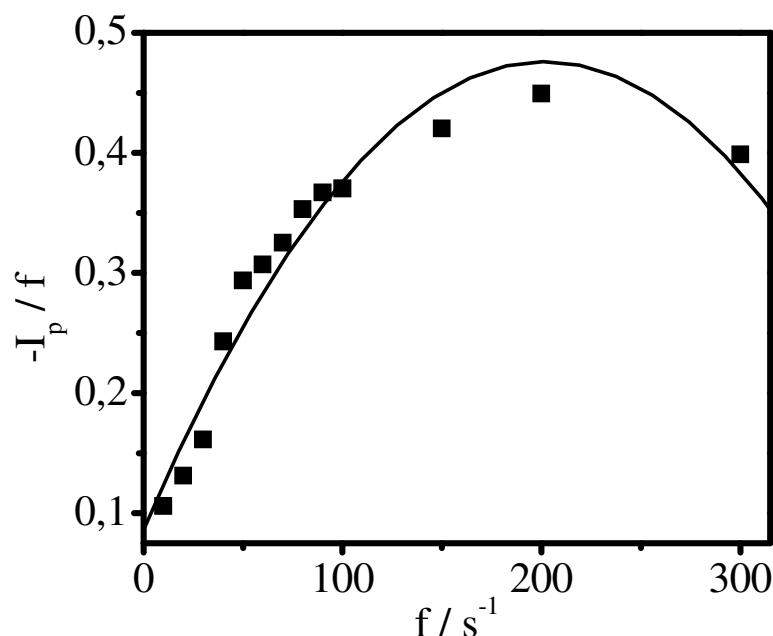


Figura 22. Relação entre  $I_p/f$  vs.  $f$  para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Todo o desenvolvimento teórico da VOQ foi realizado tomando-se processos completamente reversíveis ou irreversíveis. Assim, não existem equações que permitam calcular, por exemplo, o número de elétrons envolvido na etapa de redução da espécie de interesse. Entretanto, a literatura apresenta alguns trabalhos de reações redox quase reversíveis onde reagentes e produtos são fortemente adsorvidos<sup>68,69</sup>. Assim, a principal forma de caracterização deste tipo de processo de transferência de carga é o aparecimento de um máximo na relação apresentada no gráfico acima. Estes processos, normalmente possuem uma velocidade de transferência de carga mais lenta, em relação a processos reversíveis. Ainda assim, alguns processos quase reversíveis apresentam respostas (em termos de corrente) superiores a processos reversíveis<sup>70</sup>. Esta é uma consequência da forma de amostragem utilizada pelas técnicas de pulso atualmente. Durante cada pulso, a reação continua até o estabelecimento do equilíbrio de Nernst. Se



a reação é muito rápida, de modo que o equilíbrio seja estabelecido no início da aplicação do pulso de potencial, não haverá corrente a ser amostrada no final do pulso de potencial.

Para fins analíticos, a frequência escolhida como a mais adequada para o desenvolvimento da metodologia foi de  $100\text{ s}^{-1}$ . O motivo que leva à escolha deste valor é a razão entre sensibilidade/seletividade. Os valores de corrente de pico obtidos em  $100\text{ s}^{-1}$  garantem sensibilidade suficiente para quantificação do CTZ e ainda encontram-se dentro da faixa ideal de largura do potencial de meia onda, garantindo também a seletividade. Outro ponto é que este valor é utilizado nos desenvolvimentos teóricos da VOQ<sup>66</sup>. Desta maneira, a frequência de  $100\text{ s}^{-1}$  foi tomada como referência para os experimentos.

#### 4.3.3.2 Amplitude de aplicação do pulso de potencial

A variação da amplitude do pulso de potencial aplicado também pode ser utilizada para avaliar o tipo de processo redox envolvido. Por exemplo, para sistemas totalmente irreversíveis ocorre deslocamento do potencial de pico com o aumento da amplitude. Já para processos reversíveis ou quase reversíveis o potencial de pico praticamente não se desloca. Este último caso se aplica à redução de CTZ sobre p-AgSAE. Assim, a variação do potencial de pico em função da amplitude é mais um resultado que indica a quase reversibilidade do processo. Os resultados obtidos no intervalo de 5 a 50 mV estão apresentados na Figura 23, sendo o valor da corrente de pico significativamente aumentado.

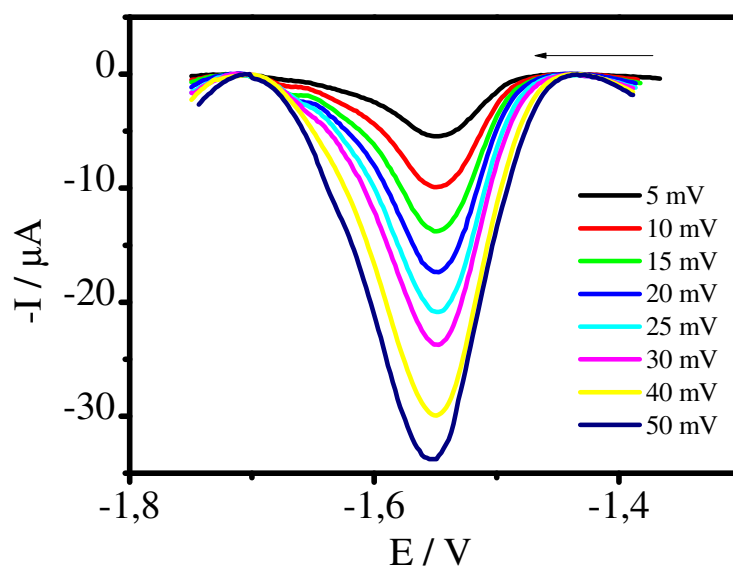


Figura 23. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação da amplitude de aplicação do pulso de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

As correntes de pico são dependentes da amplitude do pulso. Para reações reversíveis com leve adsorção de produto, a altura de pico aumenta proporcionalmente até valores de amplitude de  $60 \text{ mV}^{31}$ . Outro ponto importante é que o parâmetro amplitude está diretamente relacionado com a largura da onda voltamétrica. Altos valores de amplitude normalmente implicam em alargamento do pico, o que resulta em diminuição da seletividade para os experimentos analíticos. A Figura 24 apresenta a relação entre a corrente de pico e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial.

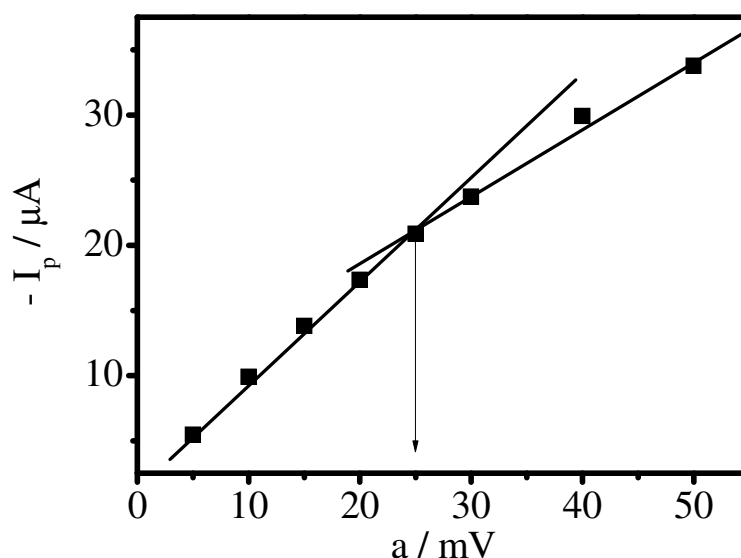


Figura 24. Relação entre corrente de pico e amplitude para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Observando-se a Figura 23, nota-se a presença de duas regiões de linearidade. A primeira delas até 25 mV, e a segunda a partir deste valor de amplitude de potencial. Usualmente, para fins analíticos, o valor de amplitude a ser escolhido deve ser último ponto onde ocorre a perda da linearidade.

#### 4.3.3.3 Incremento de aplicação do pulso de potencial

O incremento de potencial determina a largura de aplicação do salto de potencial. A faixa de estudo foi de 1 a 5 mV. Os resultados obtidos demonstram que não há variação significativa com o aumento do valor do incremento. Mesmo em velocidades mais elevadas não houve diferença significativa em relação aos voltamogramas, como pode ser observado na Figura 25. A variação da corrente de pico com o aumento do incremento de potencial pode ser observada na Figura 26.

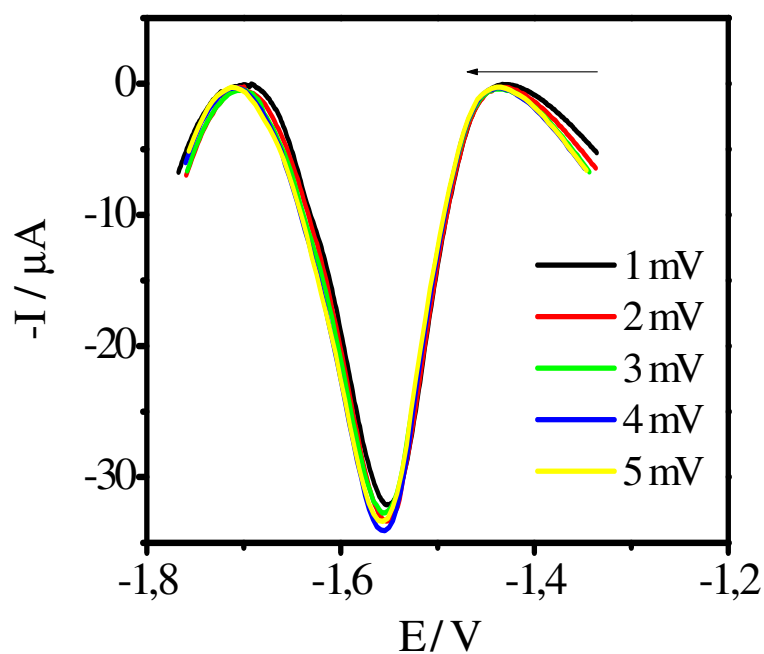


Figura 25. Voltamogramas de Onda Quadrada para a variação do incremento do pulso de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

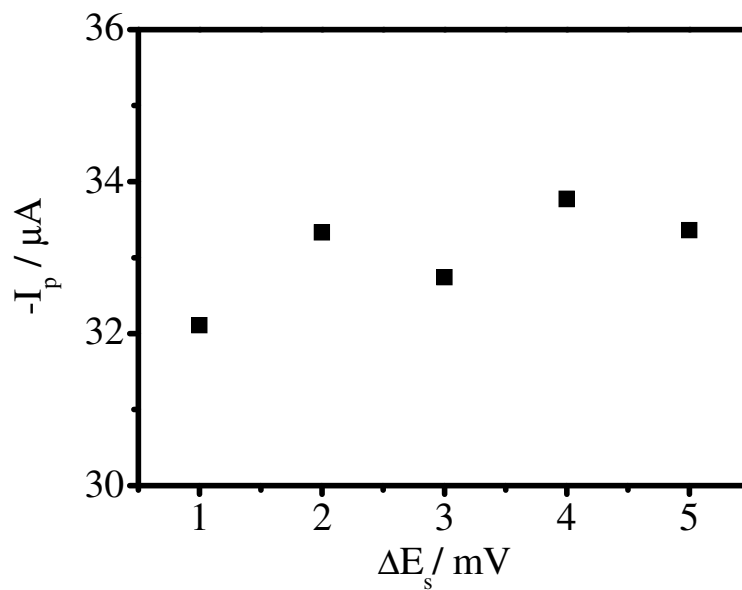


Figura 26. Relação entre a corrente de pico e o incremento de potencial para a redução de CTZ  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  em tampão BR pH 12,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Teoricamente, o aumento do incremento promove aumento significativo das correntes de pico. Entretanto, como isso não foi observado, optou-se por utilizar um valor de  $\Delta E_s = 2$  mV.

#### 4.3.4 Estudos da influência da pré-concentração

Uma etapa de acumulação pode ser útil quando a espécie de interesse tem propriedades adsorptivas. Este pode ser um fator que possibilita uma etapa de acumulação, determinando concentrações ainda menores e, consequentemente, melhorando os limites de detecção e de quantificação. Entretanto, para o caso da redução de CTZ sobre p-AgSAE, este procedimento não influenciou de maneira positiva a resposta analítica, como será visto a seguir. Inicialmente foi realizado um estudo com possíveis potências de pré-concentração da espécie, estes foram tomados no início, em regiões intermediárias, no potencial de pico ( $E_p$ ) e no final da onda voltamétrica. A Figura 27 apresenta os voltamogramas para o estudo do potencial de acumulação ( $E_{\text{acum}}$ ).

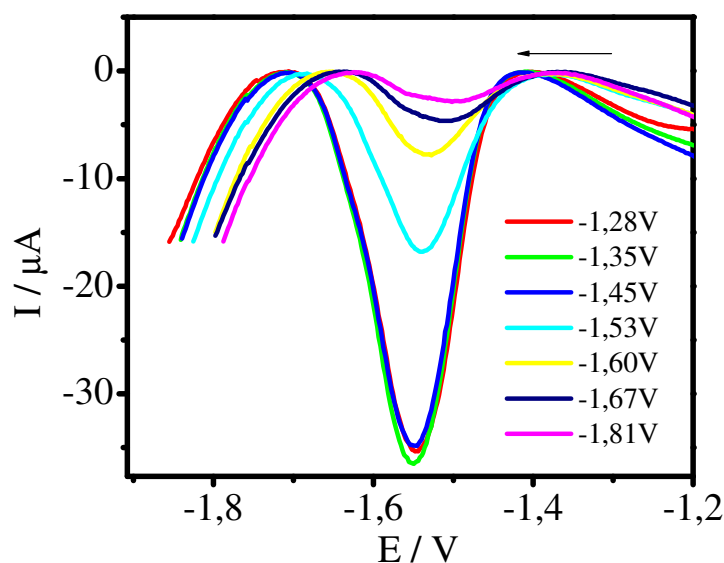


Figura 27. Voltamogramas de Onda Quadrada para otimização do tempo de acumulação do CTZ,  $f = 100$  s<sup>-1</sup>;  $a = 25$  mV e  $\Delta E_s = 2$  mV, sobre p-AgSAE.

Pode-se observar que houve uma redução significativa nos valores das correntes de pico a medida que o potencial de pré-concentração aplicado foi deslocado para valores menos positivos. O tempo de aplicação dos potenciais de acumulação foi de 60 s. O potencial de -1,35 V apresentou um valor de corrente um pouco superior aos potenciais de -1,28 V e -1,42 V, sendo escolhido como  $E_{\text{acum}}$ . Por fim, foi realizado um estudo com a variação do tempo de acumulação ( $t_{\text{acum}}$ ), como pode ser observado na Figura 28. Assim, o tempo de 10 s apresentou a maior intensidade de corrente. A diferença entre o tempo de 10 s e a não aplicação de potencial de acumulação, em termos de corrente, é de cerca de 10  $\mu\text{A}$ , o que equivale a um ganho de corrente de apenas 13%, o que não justificaria a utilização de uma etapa de pré-concentração como forma de melhorar a sensibilidade da metodologia analítica em estudo. Dessa forma, os estudos foram continuados sem etapas de acumulação.

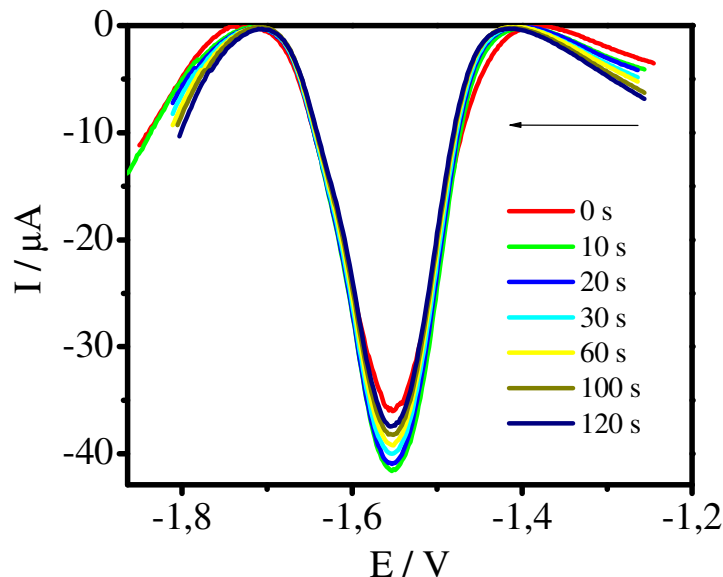


Figura 28. Voltamogramas de Onda Quadrada para otimização do tempo de deposição do CTZ em meio de tampão BR pH 12.  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 25 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  sobre p-AgSAE.



#### 4.4 Validação da metodologia eletroanalítica

A validação de um método analítico é um processo no qual são estabelecidas, por meio de estudos laboratoriais, as características necessárias que este venha a ter uma aplicação analítica. Os elementos utilizados para a validação de uma metodologia são: faixa de linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, seletividade e robustez. Para validação desta metodologia, optou-se por seguir os critérios estabelecidos pela ANVISA, agência nacional que regulamenta as metodologias empregadas na análise de diversos produtos, dentre eles formulações farmacêuticas.

##### 4.4.1 Estudo da região de linearidade e determinação da curva analítica

Após o estabelecimento das melhores condições de determinação do pico de redução do CTZ em tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 12, frequência de onda quadrada de 100 s<sup>-1</sup>, amplitude de 25 mV e incremento de potencial de 2 mV, foi realizado o estudo de determinação da região de linearidade, onde há dependência entre a concentração analítica de CTZ e a  $I_{pc}$ . Os estudos foram iniciados com [CTZ] = 9,0x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>, seguindo-se de sucessivas adições de padrão na concentração de 1,0x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> até a observação do aparecimento do pico de redução. Sucessivas tentativas foram feitas para tentar reduzir esta concentração, de forma que o menor valor adicionado, ao qual foi diferenciado do branco analítico, foi estabelecido como o primeiro ponto da curva de adição de padrão calibração, sendo de [CTZ] = 4,97x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. O estudo foi realizado em triplicata. A Figura 29 apresenta a relação entre concentração de CTZ e corrente de pico para sua redução sobre p-AgSAE.

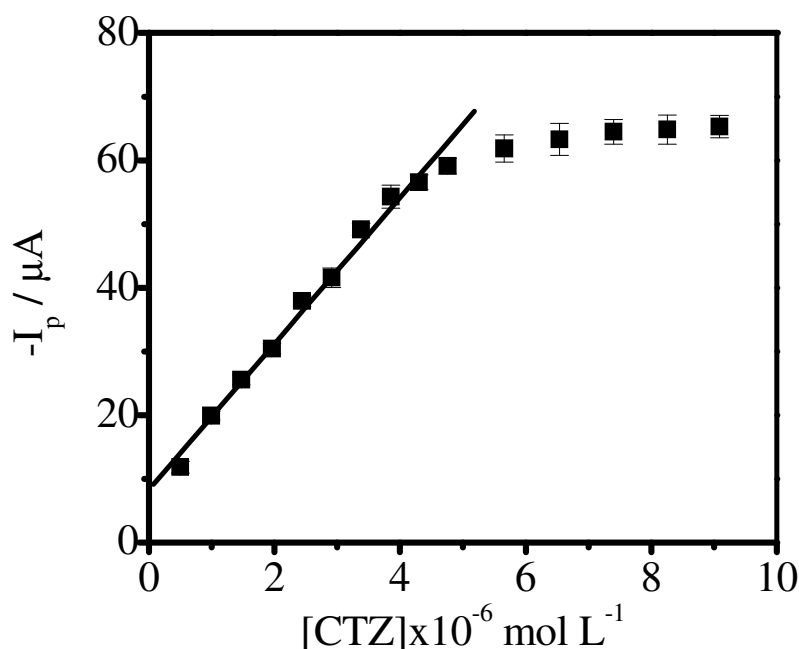


Figura 29. Relação entre  $[CTZ]$  e corrente de pico para a redução do mesmo sobre p-AgSAE, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em tampão BR pH 12 com  $R = 0,9943$ .

Após a identificação deste ponto, novas adições foram efetuadas até a observação da perda de linearidade, que ocorreu quando a concentração de CTZ atingiu valores em torno de  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , como pode ser observado acima, com um coeficiente de correlação, até este ponto, de 0,9943. O coeficiente de correlação pode ser obtido utilizando-se a equação (1), onde x e y representam os valores de  $[CTZ]$  e de  $I_p$ , respectivamente.

$$R = \frac{n \sum x_1 y_1 \sum x_1 y_1}{\sqrt{[n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2][n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2]}} \quad (1)$$

A perda de linearidade pode ser justificada pelo limite proporcionado entre a concentração na região de dupla camada elétrica e a frequência de aplicação do pulso de potencial. Isto ocorre, pois, ao se aplicar o pulso de potencial, o número de moléculas

que conseguem chegar até a superfície do eletrodo não é proporcional à concentração do mesmo no seio da solução, o que limita a quantidade de espécies sofrendo redução. Outro fator que pode proporcionar a perda de linearidade é a saturação da superfície eletródica com o analito. Estabelecida a região de linearidade, foram levantadas curvas analíticas dentro da região estabelecida ( $4,97 \times 10^{-7}$  a  $4,3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). A Figura 30 apresenta o VOQ para a variação da concentração de CTZ, dentro da faixa de linearidade estabelecida anteriormente.

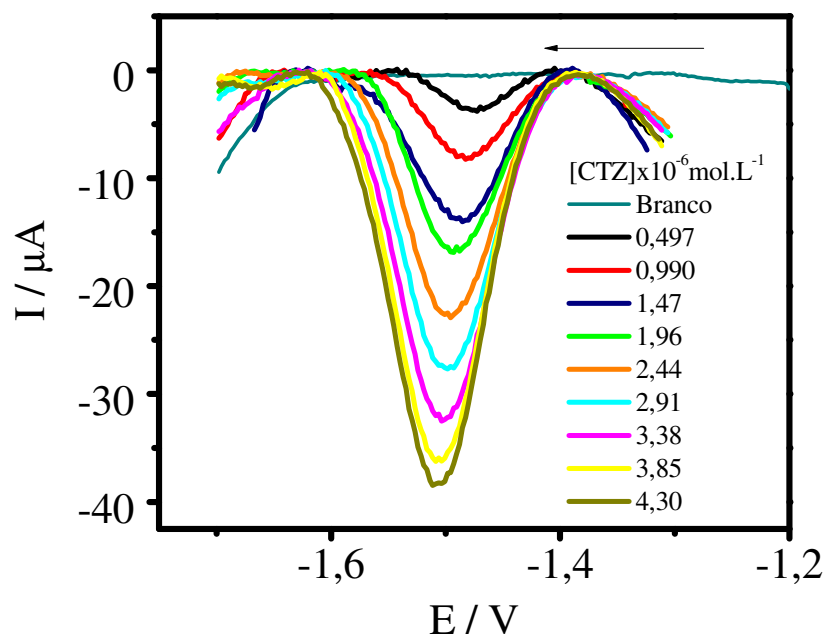


Figura 30. Voltamograma de Onda Quadrada para diferentes concentrações de CTZ em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Assim, a metodologia possui uma região onde há uma dependência linear entre  $I_p$  vs. [CTZ] como pode ser observado na Figura 31.

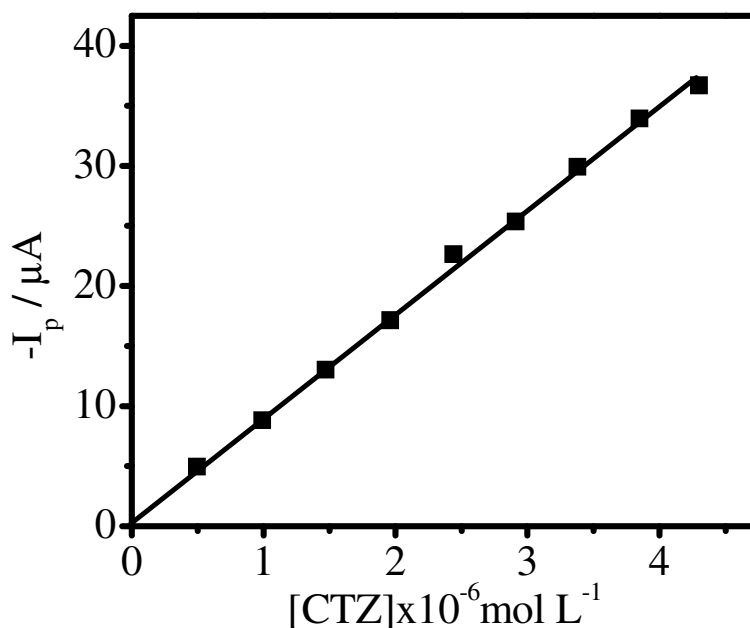


Figura 31. Relação entre  $[CTZ]$  e corrente de pico com  $R = 0,9973$  e  $I_p = 0,02495\mu A + 8,5623 \times 10^6 \mu A mol^{-1} L [CTZ]$  para a redução sobre  $p-AgSAE$ , com  $f = 100 s^{-1}$ ,  $a = 25 mV$ ,  $\Delta E_s = 2 mV$  em tampão BR pH 12.

A curva foi determinada utilizando-se o método dos mínimos quadrados, para se estimar qual a melhor reta passa pelos pontos. O coeficiente angular, que representa a inclinação da curva e remete a sensibilidade da metodologia, foi determinado utilizando-se a equação (2) apresentada a seguir:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (2)$$

Já o coeficiente linear, que representa o intercepto com o eixo da ordenada, foi obtido pela substituição na própria equação da reta ( $a = y_m - bx_m$ ), onde  $x_m$  e  $y_m$  representam a média de todos os valores.

A Figura 32 apresenta a curva obtida, sendo a regressão média entre três curvas de calibração. A barra de erro, que também é uma estimativa do erro relativo de cada ponto da curva, também pode ser utilizada para indicar a precisão entre as medidas

realizadas, uma vez que cada curva foi determinada sob condições diferentes (nova solução e nova ativação do eletrodo).

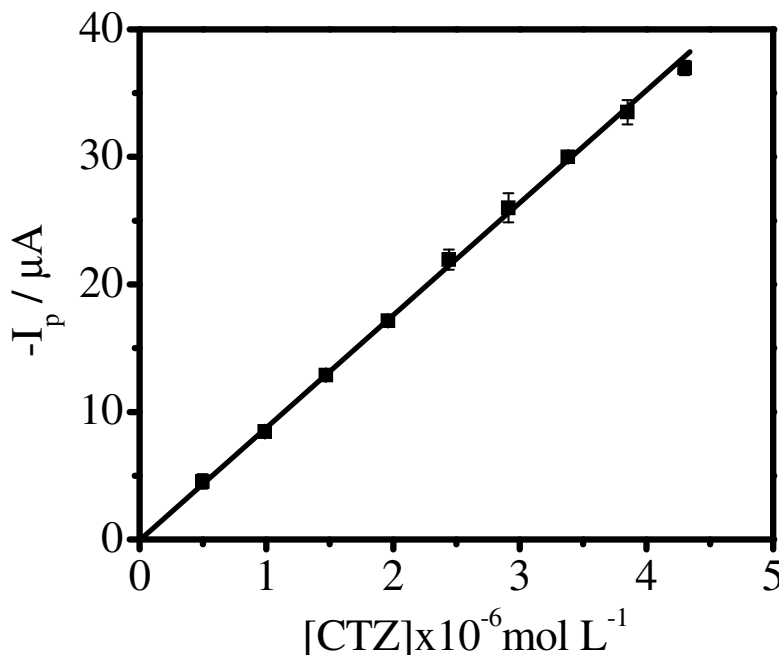


Figura 32. Dependência das correntes de pico com a concentração de CTZ sobre p-AgSAE.  $R = 0,9989$  e  $I_p = 0,04249 \mu A \pm 0,02516 + 8,9942 \times 10^6 \mu A \text{ mol}^{-1} L \pm 0,1868 \times 10^6 [CTZ]$ .

A ANVISA recomenda que o coeficiente de correlação de curvas analíticas seja superior a 0,99, sendo o obtido pela metodologia em questão um coeficiente de 0,9989, ou seja, valor superior ao estabelecido pela ANVISA.

#### 4.4.2 Cálculo dos limites de detecção e de quantificação

Esta etapa de validação da metodologia visa avaliar a menor quantidade da espécie de interesse que produza uma resposta detectável acima do ruído do sistema, bem como possa ser medida com nível aceitável de incerteza<sup>71</sup>.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações 3 e 4, onde  $DP$  é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com

as três curvas de adição de padrão e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas, como pode ser verificado segundo a RE 899/2003 (ANVISA)<sup>63</sup>.

$$LD = DP \left( \frac{3}{IC} \right) \quad (3)$$

$$LQ = DP \left( \frac{10}{IC} \right) \quad (4)$$

Os valores obtidos para os parâmetros limites de detecção e quantificação, bem como os valores da faixa de trabalho estão listados na Tabela 3.

*Tabela 3. Figuras de mérito para a redução de CTZ sobre p-AgSAE, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em tampão BR pH 12.*

Parâmetros	Valor
Linearidade ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$4,97 \times 10^{-7}$ a $4,30 \times 10^{-6}$
R	0,9989
DP	0,3457
IC	$8,6828 \times 10^6$
LD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$1,19 \times 10^{-7}$ ( $63,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ )
LQ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$3,98 \times 10^{-7}$ ( $211,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ )

Os limites de detecção e de quantificação, além de parâmetros exigidos para a validação do método em estudo, também podem ser utilizados como forma de comparação de diferentes técnicas ou metodologias posteriormente publicadas. No trabalho de Arranz *et al.*<sup>27</sup>, onde foi realizada a determinação de CTZ utilizando HMDE como eletrodo de trabalho, a faixa de linearidade obtida foi de 1 a  $20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , enquanto a faixa de linearidade obtida no presente trabalho foi de 4,9 a  $43,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , superando a faixa de linearidade obtida em cerca de duas vezes. Comparando-se os limites de detecção, os resultados obtidos neste trabalho encontram-se semelhantes aos obtidos por Arranz *et al.*<sup>27</sup>, em seu trabalho foi obtido LD de  $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ,

enquanto o valor obtido com p-AgSAE foi de  $6,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Para esta última comparação, o valor teve de ser calculado de acordo com o recomendado pela IUPAC<sup>71</sup>. Estes valores podem ser utilizados como demonstração da possibilidade de utilização do p-AgSAE frente ao HMDE, uma vez que além de apresentar um valor de LD próximo ao obtido pelo HMDE, superou a região de linearidade alcançada.

#### 4.4.3 Precisão da metodologia eletroanalítica

A precisão de uma metodologia analítica pode ser expressa pelo grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, sendo descrita em termos do desvio padrão ou do desvio padrão relativo (RSD do inglês, *Relative Standard Deviation*). Desta forma, para avaliação da precisão foram realizadas medidas de repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade (precisão inter-ensaio), sendo os valores apresentados na Tabela 4.

*Tabela 4. Valores obtidos para a repetibilidade e a reprodutibilidade para a redução de CTZ sobre p-AgSAE em meio de tampão BR pH 12, com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .*

Parâmetro	Desvio Padrão ( $\mu\text{A}$ )	RSD (%)
Repetibilidade (n = 10)	0,095	2,08
Reprodutibilidade (n = 5)	0,240	4,85

Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária foram avaliadas na concentração de  $1,47 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , concentração referente ao terceiro ponto da curva analítica. Para avaliação da repetibilidade foram feitas dez medidas sucessivas, na mesma solução e no mesmo dia. De acordo com a equação de Horwitz<sup>72</sup> o RSD aumenta com a redução da concentração da amostra analisada. A equação (5) apresenta a relação entre concentração (C) e RSD:

$$RSD(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (5)$$

Como os estudos em questão avaliam quantidades de amostras da ordem de partes por bilhão (ppb ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), são aceitáveis variações de até 20%. Entretanto, a precisão buscada para a metodologia foi a máxima possível. O valor médio de  $I_p$  para as medidas de repetibilidade foi de  $-13,5 \pm 0,095 \mu\text{A}$ . O coeficiente de variação ou desvio padrão relativo para este caso, pode ser obtido por meio da equação (6), onde  $sd$  é o desvio padrão entre as medidas de corrente de pico.

$$RSD(\%) = \frac{sd}{I_p} \cdot 100 \quad (6)$$

Já para a precisão intermediária foram feitas medidas em cinco dias diferentes e os valores das médias obtidas para  $I_p$  foram tratados utilizando-se novamente a equação (6), de forma que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4 apresentada anteriormente.

Os valores de RSD estão dentro da faixa de aceitabilidade para a quantidade de amostra analisada pela metodologia analítica em questão.

#### 4.4.5 Estudo de robustez da metodologia eletroanalítica

Para avaliação da robustez da metodologia em estudo, o parâmetro de influência investigado foi o pH, uma vez que, neste estudo, este é um dos parâmetros de maior significância experimental. Outras técnicas, como as cromatográficas, por exemplo, avaliam diversos fatores como pH, razão entre os reagentes da fase móvel e vazão da fase móvel, por exemplo. Os fatores que podem influenciar nos resultados da metodologia devem, então, ser avaliados.



O estudo foi feito simulando desvios positivos e negativos de valores de pH, na ordem de 0,2 unidades, em três níveis distintos: 11,8, 12,0 e 12,2. Desta forma, foi simulada uma pequena variação de pH que pode ser associada, por exemplo, a calibração do pHmetro ou erro do analista que executa as operações. Este experimento tem por objetivo avaliar a capacidade do método em resistir a pequenas variações do parâmetro avaliado.

Observando a Figura 33, pode-se concluir que a variação de pH não influenciou nos valores de corrente de pico.

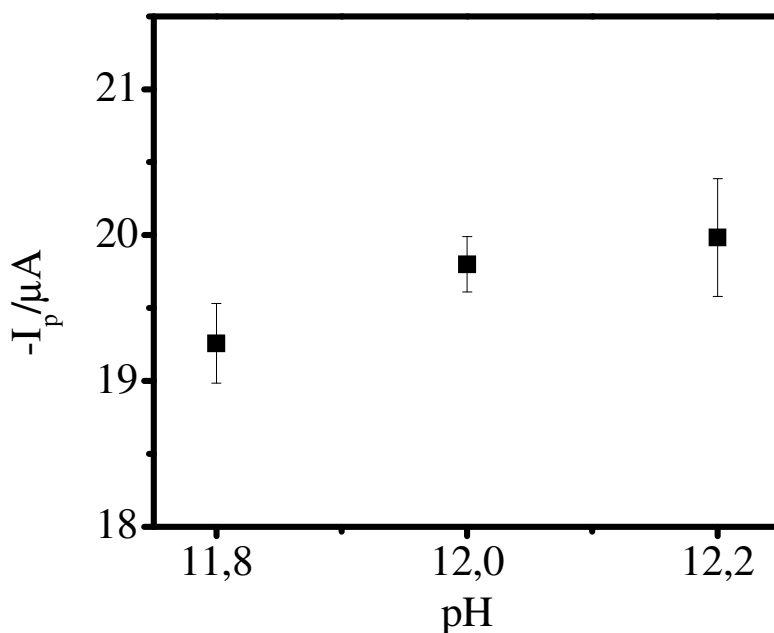


Figura 33. Variação do pH de trabalho em níveis positivos e negativos para avaliação da robustez da metodologia de trabalho para a redução de CTZ sobre p-AgSAE em meio de tampão BR com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

Estes, para o pH 12, apresentaram maior precisão nas replicatas, o que já era de se esperar pois a metodologia foi estabelecida para este valor de pH. O valor médio de  $-I_p$  para pH 12 foi de 19,8  $\mu A$ . O valor médio para os pHs 11,8 e 12,2 foram de 19,3 e 20,0  $\mu A$ , respectivamente. Foi realizado teste t para comparação das médias obtidas

para cada valor de pH. Comparando-se o pH 11,8 com o pH ótimo (pH estabelecido na otimização das condições experimentais), o valor de  $t$  calculado foi de 1,74, sendo que o valor de  $t$  crítico é de 4,3 ( $P = 0,05$ ). Já se comparando o valor obtido para o pH 12,2 com o valor obtido para o pH ótimo, o valor de  $t$  calculado foi de 0,41. Assim, a hipótese nula adotada como sendo a concordância entre os resultados obtidos é verdadeira, já que o  $t$  calculado é menor que o valor de  $t$  crítico.

Estes dados comprovam que sensíveis variações de pH não influenciam nos valores de corrente obtidos para a metodologia empregada na determinação de CTZ. Assim, baseado neste experimento, pode-se sugerir que a metodologia aqui proposta apresenta indícios de robustez.

#### **4.4.6 Estudos de exatidão da metodologia eletroanalítica**

Após a construção das curvas analíticas e da obtenção dos demais parâmetros, foram realizados estudos com o objetivo de avaliar a exatidão da metodologia. Esta é utilizada para medir o grau de concordância entre o resultado de uma medição ou análise com um valor verdadeiro ou real das amostras. A exatidão para técnicas voltamétricas pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos para o padrão (matriz isenta da amostra) com os resultados obtidos para a matriz da amostra<sup>73</sup>. Outro fator que também pode ser estudado é a especificidade. Comparando-se os resultados das curvas de recuperação em eletrólito puro com os valores para as aplicações nas formulações, pode-se obter uma estimativa da influência dos excipientes presentes. A recuperação é dada em função de uma concentração adicionada e uma concentração teórica, onde a concentração adicionada é obtida extrapolando a curva obtida. A equação (7) apresenta a fórmula utilizada para o cálculo da taxa de recuperação:

$$\% \text{Recuperação} = \frac{[\text{CTZ}]_{\text{recuperada}}}{[\text{CTZ}]_{\text{adicionada}}} \cdot 100 \quad (7)$$

A Figura 34 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para recuperação de CTZ em eletrólito puro, onde o VOQ em cor preta representa a contaminação ( $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) e as demais adições de padrão são representadas na cor vermelha (adições que vão de  $1,47 \times 10^{-6}$  a  $2,91 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Este procedimento foi repetido para os estudos de recuperação nas amostras de comprimido, creme e xampu.

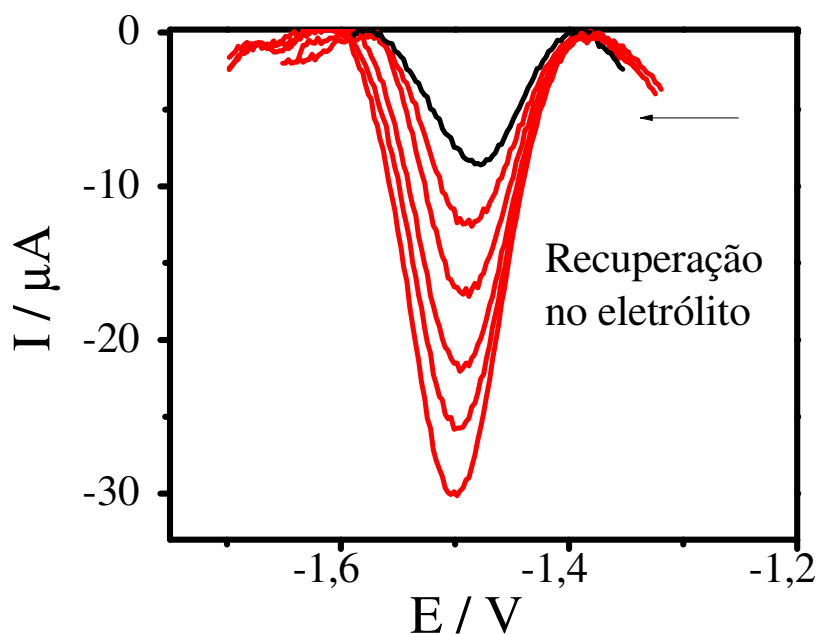


Figura 34. Voltamograma de onda quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

A Figura 35 demonstra a forma de obtenção da concentração recuperada. Para a obtenção do sinal recuperado, após a adição da contaminação e das demais alíquotas de solução padrão, por extrapolação no eixo x é obtida uma concentração recuperada (fazendo-se  $x = 0$ ). Esta é, então, a taxa de recuperação calculada por técnicas voltamétricas.

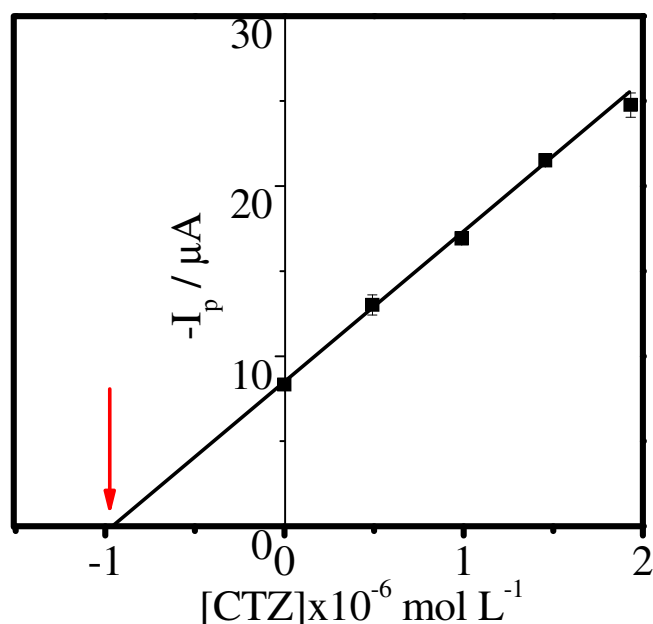


Figura 35. Relação entre  $[CTZ]$  e corrente de pico para a recuperação no eletrólito, em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Para a recuperação em eletrólito puro, que tem por objetivo avaliar a ausência de interferentes para fins de comparação, o valor médio obtido foi de 100,6%. O valor da contaminação foi de  $9,90 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo o valor recuperado de  $1,06 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Este valor está associado à taxa de recuperação descrita acima, sendo referência para comparação com as taxas de recuperação para as amostras de comprimido, xampu e creme.

O valor do BIAS, que de acordo com a IUPAC é um parâmetro estatístico que avalia o quanto o valor obtido se distancia do valor real ou teórico, pode ser utilizado na identificação da presença de erros sistemáticos nos resultados<sup>74</sup>. Este parâmetro pode assumir tanto valores positivos quanto valores negativos, indicando desvios da média obtida para mais ou para menos em torno do valor verdadeiro. Assim, o valor do BIAS obtido para a recuperação no eletrólito foi de 0,51%, demonstrando o erro envolvido na etapa de recuperação somente em meio de eletrólito de suporte.

O valor do RSD para a taxa de recuperação em eletrólito puro foi de 1,97 %. Os valores encontrados na literatura<sup>75,76</sup> apresentam desvios normalmente inferiores a 5,0%. Para a quantidade de amostra utilizada, o valor de RSD recomendado é de até 15%<sup>63</sup>.

#### 4.4.5.1 Estudo da taxa de recuperação em amostra de comprimido

Para extração do CTZ a partir de amostras de comprimido da marca Cetoneo<sup>®</sup>, foram pesadas cinco unidades, sendo a massa média de  $0,4025 \pm 0,0013$  g. Foi gerada uma curva de adição de padrão, onde a primeira adição é efetuada com a solução de  $[CTZ] = 9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  preparada a partir do comprimido. A Figura 36 apresenta o VOQ para a recuperação de CTZ em amostra de comprimido, onde a voltamograma em cor preta demonstra o sinal obtido após contaminação e os demais voltamogramas, as sucessivas adições realizadas para obtenção da curva de recuperação. Não foi observada alteração na característica dos voltamogramas pela utilização de amostra preparada a partir do comprimido, embora este tipo de amostra possua diversos excipientes. Este estudo comprova que a matriz presente na amostra de comprimido não influencia na determinação de CTZ utilizando esta metodologia.

A Figura 37 apresenta os resultados para a concentração recuperada na amostra de comprimido.

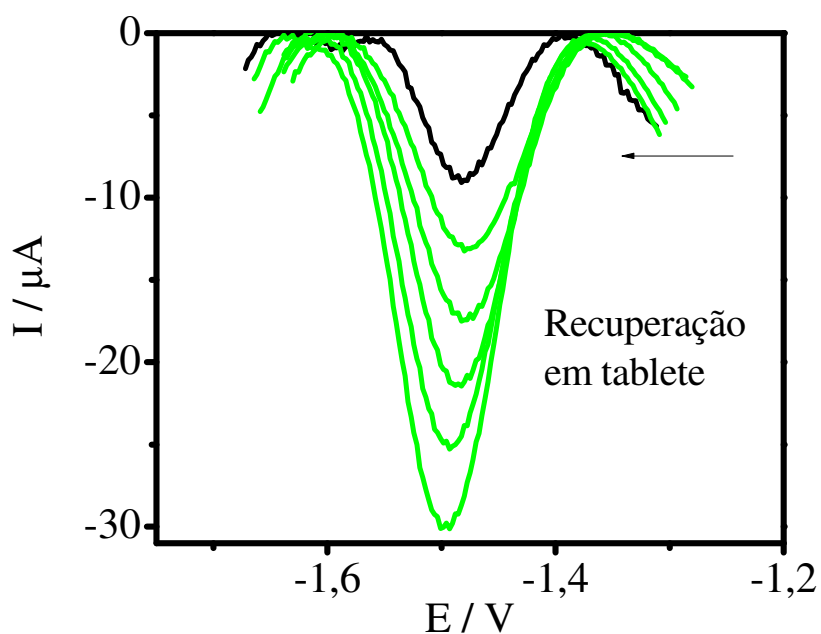


Figura 36. Voltamograma de onda quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em comprimido em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

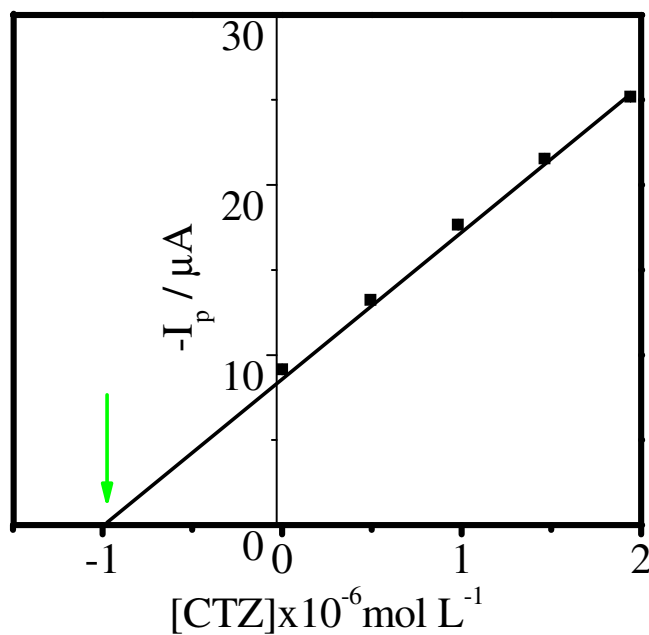


Figura 37. Relação entre  $[CTZ]$  e corrente de pico para a recuperação em amostra de comprimido em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

A taxa de recuperação de CTZ nas amostras de comprimido foi de 90,84%, que equivale a um valor recuperado de  $8,99 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , que se enquadra dentro da faixa de aceitabilidade recomendada pela ANVISA. Os valores do RSD e do BIAS para a taxa de recuperação em amostra de comprimido foram de 3,57 % e -10,4%, respectivamente. Pode-se justificar o valor taxa inferior a 100% por dificuldades na extração do princípio ativo do comprimido ou ainda pela adsorção de algum dos excipientes presentes à superfície do eletrodo, que pode gerar certa redução nos valores de recuperação e deslocamento dos potenciais de pico. Com relação à especificidade da metodologia, esta não sofreu interferência significativa do sinal analítico devido à presença dos excipientes, ressaltando a especificidade do método. Este parâmetro leva em consideração pequenas alterações envolvidas, podendo-se citar neste caso alteração na matriz com a utilização da amostra preparada a partir do comprimido.

#### **4.4.5.2 Estudo de recuperação em amostras de xampu e creme**

Para determinação de CTZ em amostras de xampu e creme (pomada), a metodologia empregada para extração do princípio ativo foi a mesma adotada pelo método padrão da farmacopéia brasileira<sup>77</sup>. A amostra solubilizada de xampu apresentou tonalidade cor de rosa, enquanto a preparada a partir do creme foi completamente solubilizada, apresentando um aspecto de limpidez. Apesar da natureza complexa das amostras, não houve grande interferência no perfil voltamétrico, o que comprova a especificidade da metodologia eletroanalítica proposta para a determinação de CTZ em diferentes amostras, como pode ser observado na Figura 38 para a recuperação em amostra de xampu. Neste caso, houve deslocamento do potencial de redução do CTZ quando da adição da solução amostra de xampu (voltamograma na cor preta), em relação aos demais sinais obtidos após a adição de alíquotas da solução

padrão. A Figura 39 demonstra a forma de obtenção da concentração recuperada para a amostra de xampu.

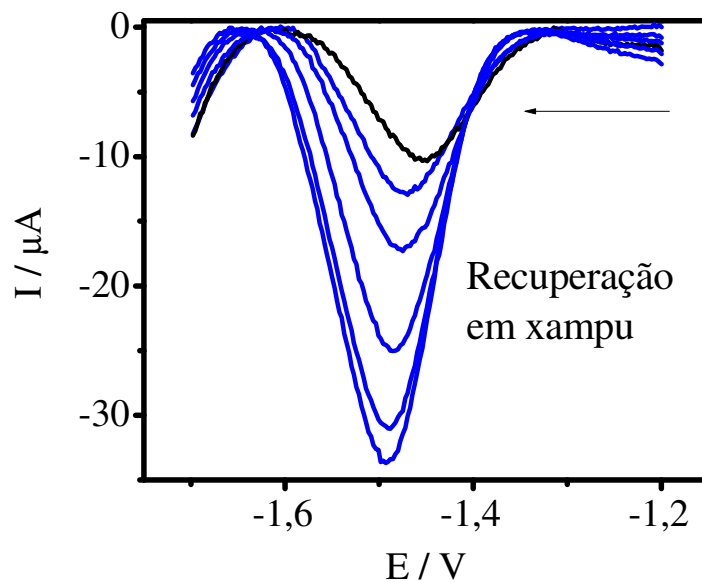


Figura 38. Voltamograma de onda quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em amostra de xampu em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

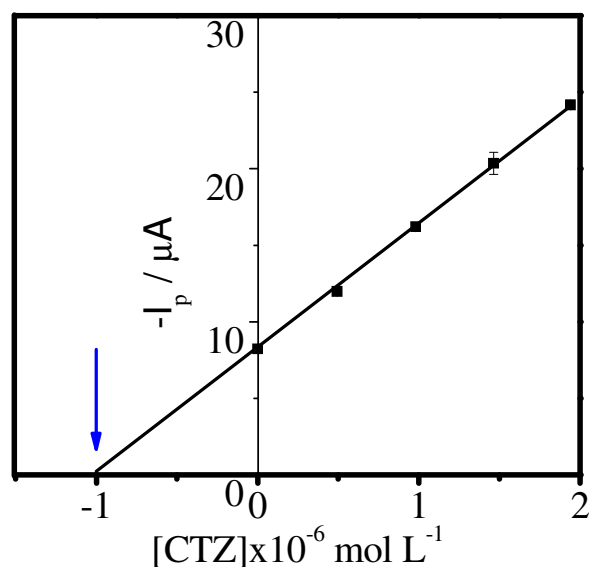


Figura 39. Relação entre [CTZ] e corrente de pico para a recuperação em amostra de xampu em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.



A taxa de recuperação para a amostra de xampu foi de 103,3 %, com valor de BIAS de 3,33 %. O RSD para a taxa de recuperação em amostra de xampu foi de 1,56%. Mesmo adicionando-se pequena quantidade de amostra, durante a etapa de desaeração foi gerada pequena quantidade de bolhas, que não influenciaram nos valores de recuperação.

Para o estudo de recuperação em amostra de creme, como mencionado anteriormente, a solução resultante apresentou aspecto de limpidez, garantindo visualmente uma completa solubilização da amostra. A forma de calcular a taxa de recuperação foi a mesma que para as demais amostras avaliadas neste estudo.

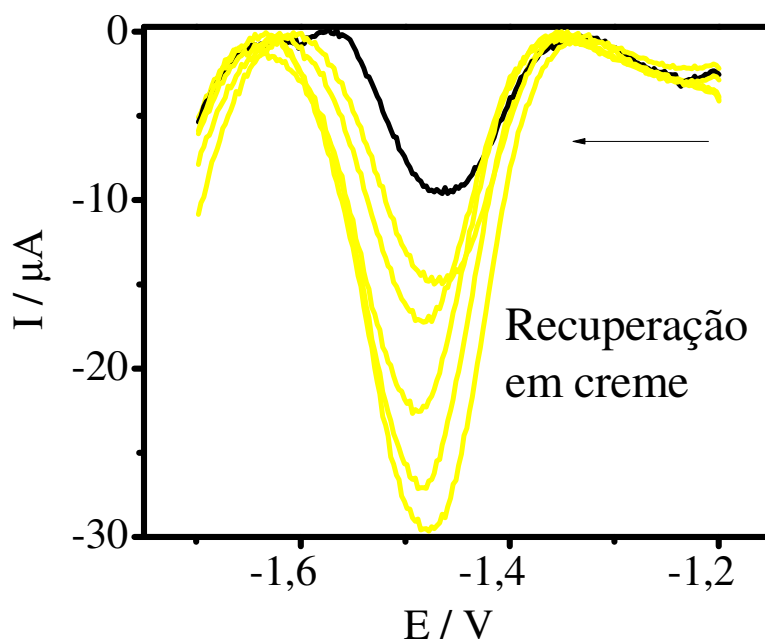


Figura 40. Voltamograma de onda quadrada para diferentes concentrações de CTZ na recuperação em amostra de creme em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

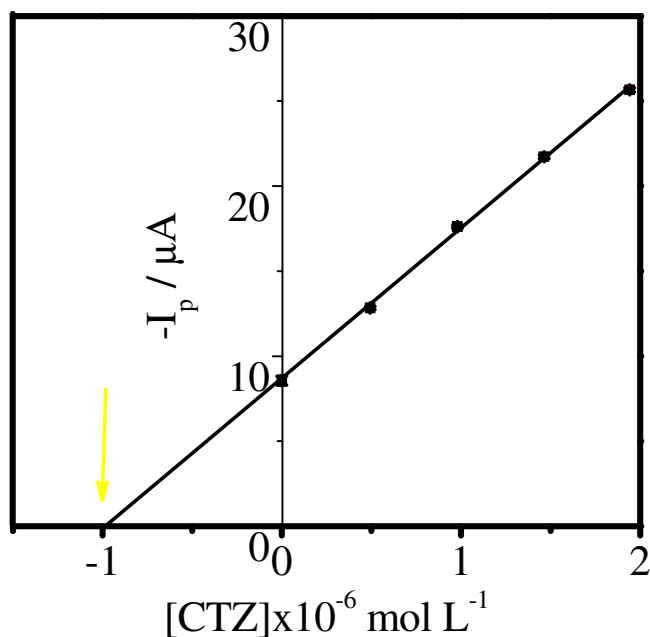


Figura 41. Relação entre  $[CTZ]$  e corrente de pico para recuperação em amostra de creme em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.

Assim, o valor da taxa de recuperação foi de 104,9 % com valor de BIAS de 4,34 e RSD de 2,73%, como pode ser observado nas Figuras 40 e 41, em análise de forma semelhante às anteriores. Assim como para a amostra de xampu, quando a solução contendo a contaminação foi posta sob agitação de gás, foram geradas bolhas, mas estas não interferiram significativamente nas medições.

A Tabela 5 apresenta um resumo dos estudos de exatidão desenvolvidos para a metodologia eletroanalítica proposta, que se baseia na utilização de um eletrodo sólido de amálgama de prata polido (p-AgSAE) na determinação de CTZ em diferentes tipos de formulações farmacêuticas.

*Tabela 5. Resumo dos dados obtidos para os estudos de exatidão da metodologia em meio de tampão BR pH 12 com  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ , sobre p-AgSAE.*

	Eletrólito	Comprimido	Xampu	Creme
Dosagem	–	200 mg / comprimido	20 mg / mL	20 mg / g
[CTZ] <sub>encontrada</sub> / mol L <sup>-1</sup>	9,95x10 <sup>-7</sup>	8,99x10 <sup>-7</sup>	1,02x10 <sup>-6</sup>	1,03x10 <sup>-6</sup>
Intervalo de Confiança	± 1,87x10 <sup>-7</sup>	± 2,34x10 <sup>-7</sup>	± 1,13x10 <sup>-7</sup>	± 2,39x10 <sup>-7</sup>
Recuperação (%)	100,6	90,84	103,3	104,9
RSD (%)	1,97	3,57	1,56	2,73
Bias (%)	0,51	-9,19	3,33	4,88

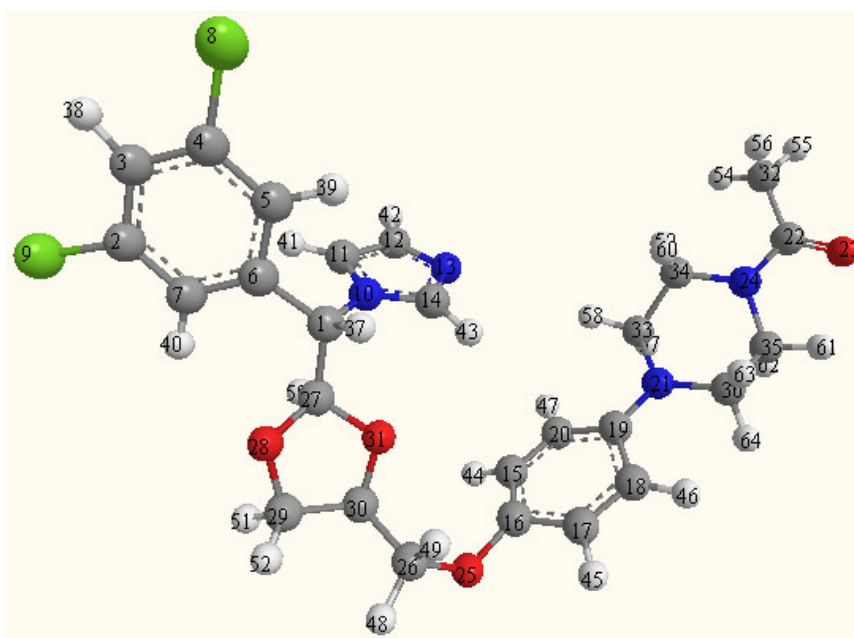
Como já mencionado anteriormente pode ser mencionada a questão da seletividade e especificidade da metodologia, uma vez que não houve influência dos diferentes tipos de matriz utilizadas nestes ensaios. Esta influência poderia ser evidenciada pela presença de picos na mesma região de redução do analito de interesse, o que não ocorreu nas medidas realizadas.

#### 4.4.4 Seletividade e especificidade da metodologia eletroanalítica

Em relação à seletividade, não houve interferência na determinação do composto por parte do meio eletroquímico escolhido e nem quando se utilizou amostra real, uma vez que o pico de redução do CTZ apresentou valores significativos da taxa de recuperação. Entretanto, não foram realizados testes específicos com os componentes isolados presentes nas formulações estudadas ou com a mistura total com ausência do analito (placebo). Ainda de acordo com os resultados de taxa de recuperação, estes podem representar um forte indício da especificidade da metodologia empregada, mas testes utilizando alguns componentes presentes na formulação ratificariam o resultado obtido.

#### 4.5 Cálculos Químico-Quânticos

Tanto a estrutura de menor energia como o mapa de energia dos orbitais de fronteira foram obtidos utilizando-se a teoria do funcional de densidade (DFT, do inglês *density functional theory*). Esta Figura 42 apresenta a estrutura de menor energia para a molécula de CTZ, em diferentes projeções, onde a segunda demonstra a distribuição da nuvem eletrônica para cada átomo da molécula.



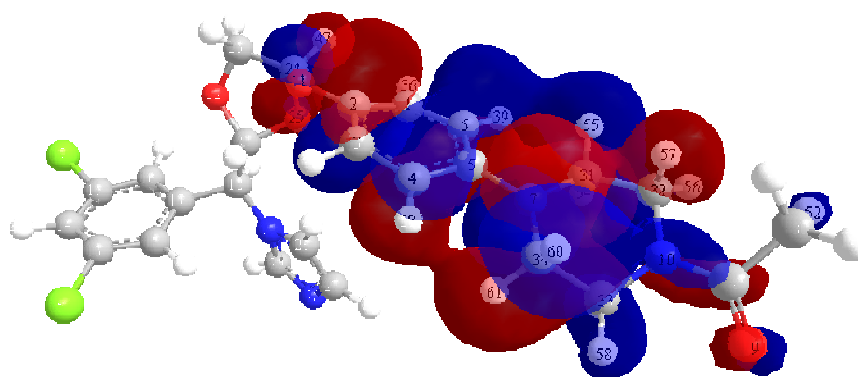
Por meio da elucidação da estrutura de menor energia, foi possível obter o volume espacial ocupado por uma única molécula de CTZ, sendo este igual a  $456,95\text{\AA}^3$ . Com base neste dado, o volume molar do fármaco é de  $283\text{ cm}^3\text{ mol}^{-1}$ . Possuindo o volume molar do CTZ, pode-se utilizá-lo no cálculo do coeficiente de difusão do mesmo, que é uma variável amplamente utilizada em diversas equações das técnicas voltamétricas. O coeficiente de difusão pode ser obtido utilizando-se a equação 8 a seguir, onde T é a temperatura (K), M é a massa molecular da espécie ( $\text{g mol}^{-1}$ ),  $\eta$  é a viscosidade do solvente ( $\text{cm s}^{-1}$ ), V é o volume molar da espécie ( $\text{cm}^3\text{ mol}^{-1}$ ) e X coeficiente de associação do solvente.

$$D = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{T\sqrt{xM}}{\eta V^{0,6}} \quad (8)$$

O valor encontrado foi de  $2,57 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{ s}^{-1}$ . Para moléculas orgânicas, os valores dos coeficientes de difusão se encontram na ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}\text{ cm}^2\text{ s}^{-1}$ . Isto demonstra que o estudo quântico pode ser utilizado na determinação de parâmetros que apresentam dificuldades para serem obtidos experimentalmente.

Avaliando-se o mapa de distribuição dos orbitais de menor energia (LUMO), que, em uma reação de redução, são os orbitais moleculares responsáveis pela acomodação do elétron recebido, pode ser observado que este se encontra distribuído sobre o anel imidazólico e o anel halogenado da molécula de CTZ, como pode ser observado na Figura 43. Este indício teórico pode ser utilizado para uma suposição mecanística de como pode estar ocorrendo a redução sobre a superfície do eletrodo.

## (A) HOMO



## (B) LUMO

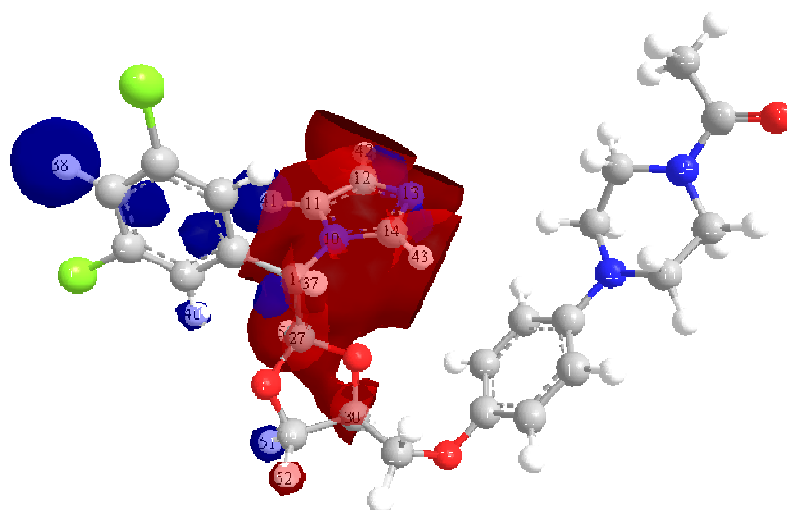


Figura 43. A) Mapa de distribuição dos orbitais de fronteira HOMO e na molécula de CTZ. B) Mapa de distribuição dos orbitais de fronteira LUMO e na molécula de CTZ.

A análise dos orbitais HOMO e LUMO é importante, como descrito anteriormente, para compreensão dos possíveis sítios redox da molécula. O orbital HOMO corresponde ao orbital molecular mais externo, que possui elétrons (ocupado), sendo assim a região da molécula onde se encontram elétrons mais disponíveis para participação em uma reação redox. Já o LUMO corresponde ao orbital molecular de menor energia que não possui elétrons (desocupado), sendo uma região de possível recepção de elétrons.



Como mencionado na introdução deste trabalho, uma das possíveis reações que pode ocorrer no organismo, em relação à degradação do CTZ, é a oxidação do anel piperazínico. Assim, observando a Figura 43 para o orbital HOMO, tem-se que este se apresenta sobre o anel piperazínico da molécula, de forma que este estudo teórico pode ser utilizado para demonstrar que a reação realmente pode ocorrer neste local da molécula. Agora avaliando-se o LUMO, tem-se que este se apresenta sobre o anel imidazólico da molécula de CTZ, o que indica ser esta a região onde ocorre a reação de redução.

Avaliando-se a distribuição de cargas sobre a molécula de CTZ, tem-se que as cargas mais positivas se encontram sobre os átomos N(13) e C(14), ambos pertencentes ao anel imidazólico. Os valores das cargas são de 0,596 e 0,493 u.a., respectivamente. Estas cargas positivas indicam átomos com características eletrofílicas em potencial, o que pode ser utilizado para ratificar que, na molécula, estes são os átomos com maior probabilidade de receber elétrons em uma reação de redução.

Outro aspecto investigado foi a predição de espectros teóricos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , para comparação com os espectros reais obtidos pela técnica. Assim, a Figura 44 apresenta os espectros de ressonância magnética nuclear do  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula de CTZ, com a utilização de TMS como padrão interno na obtenção dos espectros teóricos.

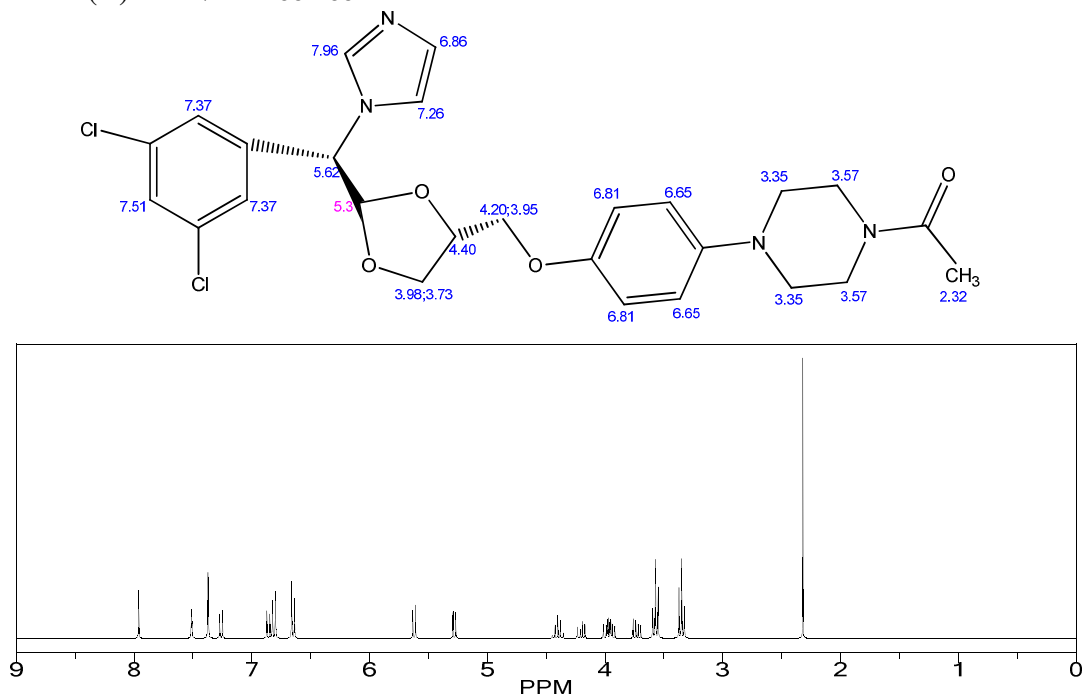
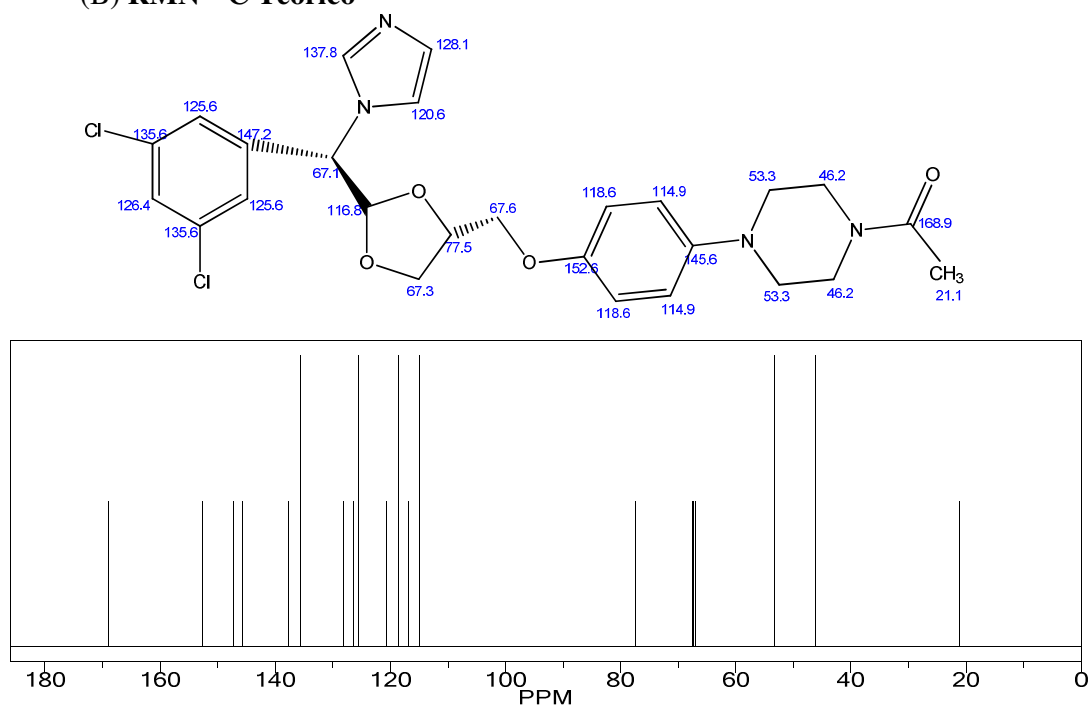
(A) RMN  $^1\text{H}$  Teórico(B) RMN  $^{13}\text{C}$  Teórico

Figura 44. (A) Estrutura da molécula de CTZ com os deslocamentos correspondentes ao espectro de RMN  $^1\text{H}$ . (B) Estrutura da molécula de CTZ com os deslocamentos correspondentes ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .



Baseado nos resultados teóricos obtidos e no número de elétrons envolvidos na reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE, pode-se sugerir uma redução no anel imidazólico da molécula. Desta forma e supondo-se a reação de redução nesta região da molécula, foi gerado um espectro de RMN  $^1\text{H}$  teórico para este possível produto de redução, como pode ser observado na Figura 45.

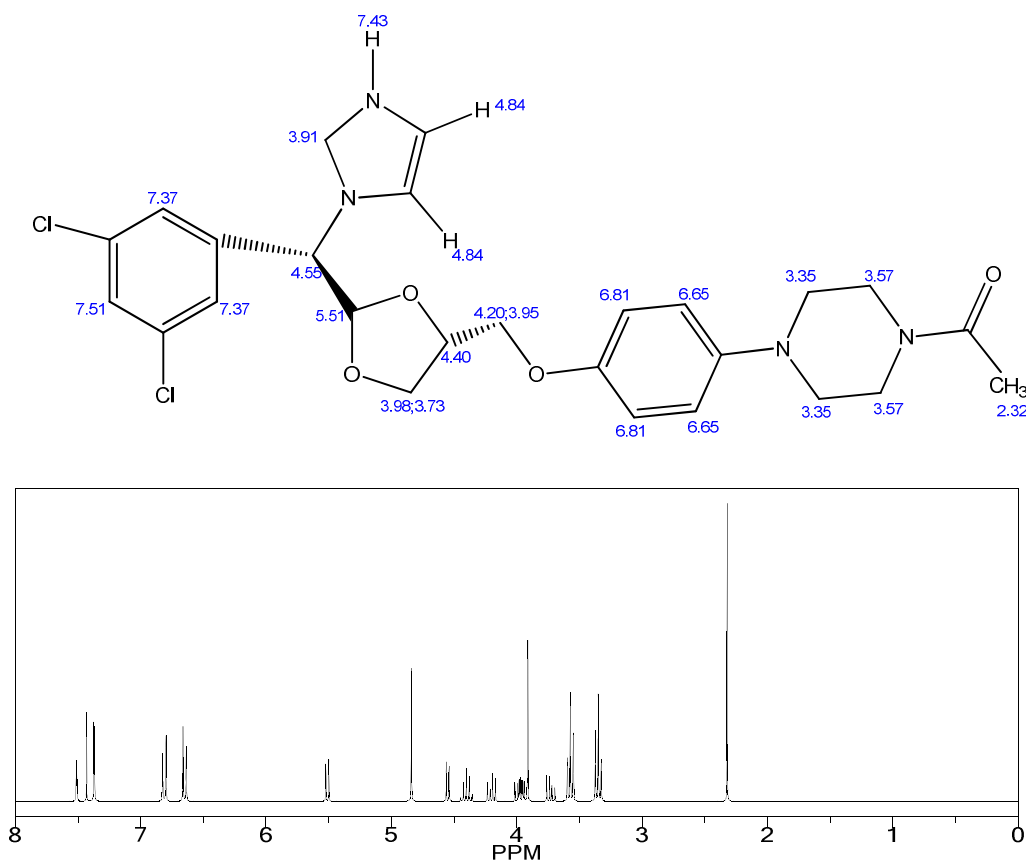


Figura 45. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  teórico para um provável produto da reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE.

Os valores para os deslocamentos químicos (ppm) dos hidrogênios presentes no anel imidazólico são de  $\delta$  3,91 ppm, dois com  $\delta$  4,84 ppm e o último com  $\delta$  7,43 ppm. Estes deslocamentos são de fundamental importância na identificação deste produto de reação.

Devido à complexidade da solução utilizada, também foi simulado um espectro para esta mistura contendo em sua composição, além do eletrólito de suporte utilizado, etanol e o analito propriamente dito, de forma a buscar uma melhor elucidação para os picos observados no espectro. Assim, a Figura 46 apresenta um espectro de RMN  $^1\text{H}$  com a mistura de todos estes componentes.

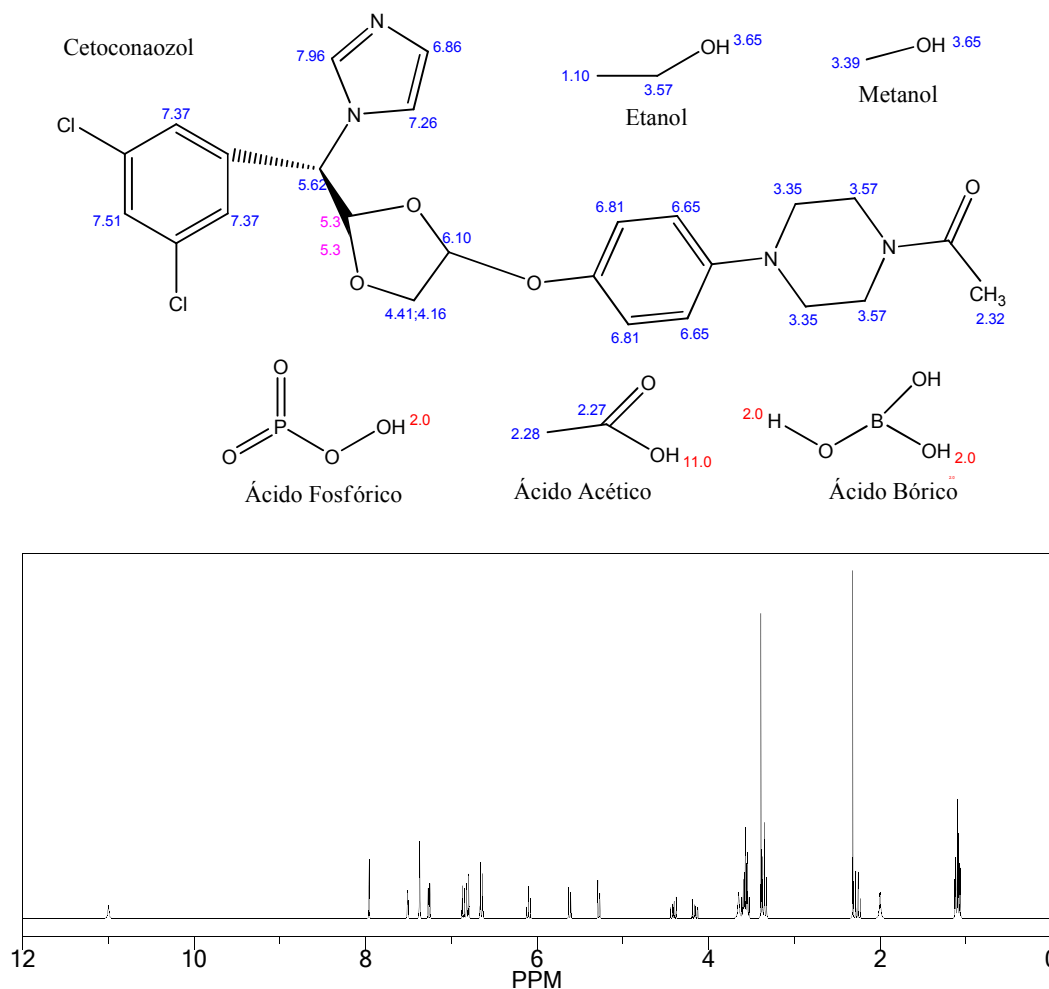


Figura 46. Estruturas dos componentes na mistura analisada e o espectro de RMN  $^1\text{H}$  teórico resultante.

Após todos estes estudos teóricos, os resultados obtidos poderão ser comparados com dados experimentais, afim de caracterizar e estabelecer o mecanismo de redução do CTZ sobre p-AgSAE. Para tanto, foi realizado um estudo de eletrólise do CTZ com

potencial controlado, sendo o acompanhamento feito por UV-Vis, como será visto adiante.

#### 4.6 Investigação dos produtos da eletrólise

O(s) produto(s) obtido(s) após a etapa de eletrólise exaustiva do CTZ em meio de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , foram realizados em potencial de  $-1,8 \text{ V}$ . O potencial aplicado foi superior ao potencial de redução do CTZ para garantir que todo o reagente fosse reduzido, sendo, assim, convertido em produto. A solução eletrolisada resultante foi analisada por RMN  $^1\text{H}$  utilizando uma correlação 2D heteronuclear (gHSQC) que proporciona uma correlação entre os átomos da molécula facilitando a elucidação da estrutura. A eletrólise foi realizada durante um período de seis horas para obtenção da maior quantidade possível de produtos, de forma que espectros de UV-Vis foram utilizados para monitorar a banda de absorbância do CTZ e verificar seu consumo na célula eletroquímica. Este apresenta uma única banda de absorção quando solubilizado no meio eletroquímico utilizado neste trabalho, que ocorre em cerca de  $293 \text{ nm}^{13}$ . As análises foram realizadas inicialmente de 15 em 15 minutos (isso na 1ª hora de eletrólise). Na sequência, as análises foram realizadas a cada 30 minutos (até a 5ª hora de eletrólise). A Figura 47 apresenta os espectros de UV-Vis para o acompanhamento da eletrólise. Com apenas 15 minutos de eletrólise foi possível identificar uma redução significativa da mesma. Assim, o sinal passou a ficar praticamente constante durante a realização das demais medidas, sendo suavizado com o passar do tempo de eletrólise. Em relação às seis horas de análise mencionadas na parte experimental, este tempo foi avaliado para a observação de novas bandas de absorção, o que não foi observado nos resultados obtidos no intervalo de comprimento de onda avaliado.

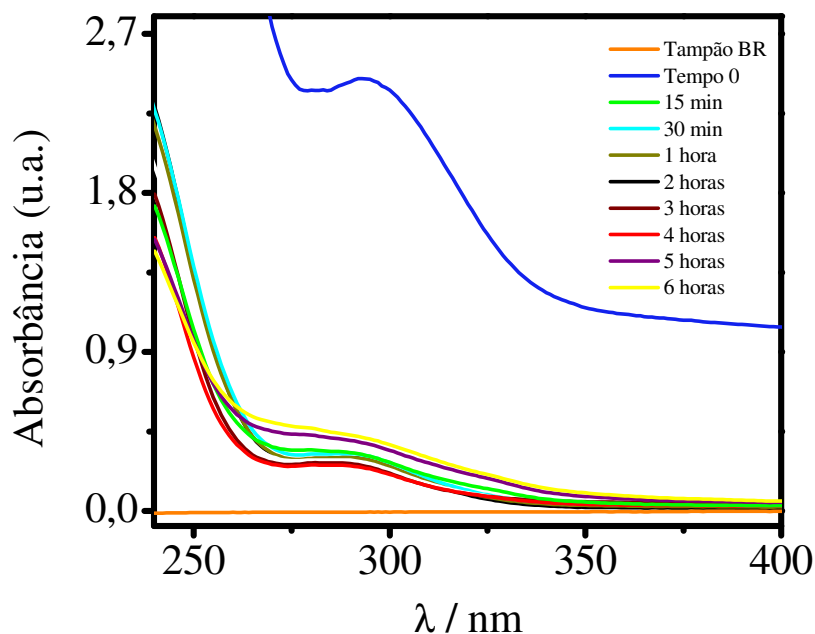


Figura 47. Espectros na região do UV-Vis para o acompanhamento da redução da banda de absorvância do CTZ em meio de tampão BR pH 12, sobre p-AgSAE.

Já a Figura 54, que é uma ampliação da anterior para melhor visualização das bandas obtidas, observa-se que ocorre uma suavização com o passar do tempo de eletrólise. Nas horas intermediárias (da 1<sup>a</sup> à 4<sup>a</sup> hora de eletrólise), foi observado apenas uma leve redução da banda de absorvância do CTZ.

Embora não se tenha observado o surgimento de uma outra banda de absorvância, foi demonstrado que houve a degradação do composto. A solução resultante foi liofilizada com o objetivo de concentrar ao máximo os produtos obtidos, uma vez que a técnica de RMN não possui sensibilidade suficiente para concentrações da ordem ppb, por exemplo.

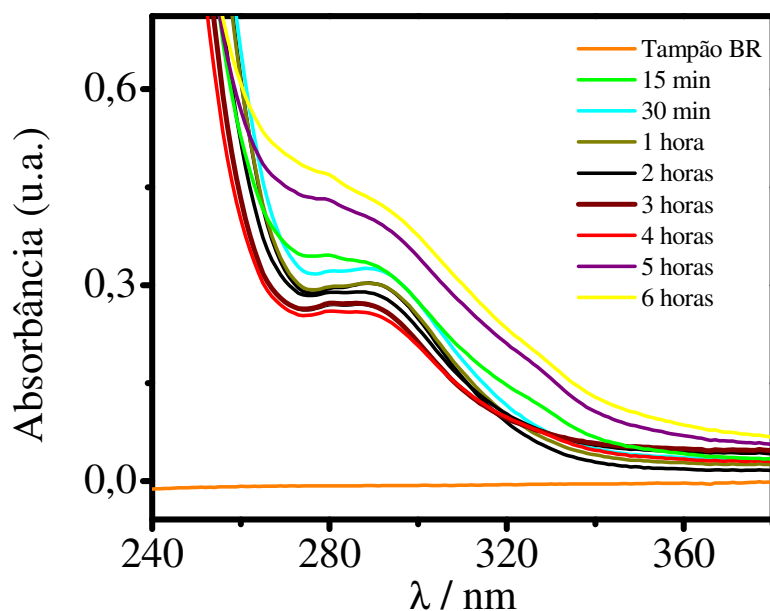


Figura 48. Ampliação do espectro na região do UV-Vis para o acompanhamento da redução da banda de absorbância do CTZ em tampão BR.

O ANEXO 1 apresenta o espectro RMN  $^1\text{H}$  gHSQC gerado a partir do material liofilizado, sendo este dissolvido em metanol. De posse dos espectros teóricos, algumas atribuições podem ser feitas, comparando o teórico ao experimental.

Pode-se observar  $\delta\text{OH}$  (lê-se: deslocamento químico de hidrogênio de hidroxila) dos ácidos utilizados na composição do eletrólito de suporte, onde os valores são de  $\delta$  0,9 e  $\delta$  1,3 ppm. Pode-se observar  $\delta\text{CH}_3$  para  $\delta$  1,1 ppm para ácido acético e etanol;  $\delta\text{OH}$  em  $\delta$  3,65 ppm para metanol;  $\delta\text{CH}_2$  em  $\delta$  3,57 ppm  $\delta\text{CH}_2$  do etanol e também pode estar relacionado ao  $\delta\text{CH}_2$  (C-C-N) do anel piperazínico do CTZ;  $\delta$  3,35 para os demais  $\delta\text{CH}_2$  (C-C-N) pertencentes ao anel piperazínico da molécula de CTZ;  $\delta$  3,95 ppm  $\delta\text{CH}_2$  (C-CH<sub>2</sub>-O). Os sinais esperados para deslocamento químico dos hidrogênios do anel imidazólico são de  $\delta$  7,96 ppm  $\delta\text{CH}$  (N-C=N),  $\delta$  7,26 ppm  $\delta\text{CH}$  (C-C=C) e  $\delta$  6,86 ppm  $\delta\text{CH}$  (C-C=N). Estes sinais não foram observados no espectro obtido. Por outro lado, os sinais de deslocamento esperados para um produto que sofre redução no anel

imidazólico possui deslocamentos de  $\delta$  7,43 ppm  $\delta$ NH (C-N-C), dois H com  $\delta$  4,84 ppm  $\delta$ CH (N-C=C-N) e  $\delta$  3,91 ppm (N-C-N). Estes sinais podem ser utilizados para comprovar que a reação de redução do CTZ realmente ocorre sobre o anel imidazólico.

#### 4.6 Proposição Mecanística

Uma proposição mecanística que pode ser feita, tomando-se por base os resultados obtidos até agora. Assim, no cálculo realizado por VC, foi constatado o envolvimento de dois elétrons na reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE. Os estudos de voltametria de onda quadrada mostraram que a redução é consiste de um processo quase reversível. Já os resultados teóricos mostraram que o anel imidazólico da molécula de CTZ é o local onde possivelmente ocorre a reação de redução da molécula de CTZ. Por fim, pela avaliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  onde foram obtidos os sinais de deslocamento químico para os hidrogênios após uma reação de redução no anel imidazólico, segue, na Figura 49 uma provável reação de redução do CTZ sobre p-AgSAE.

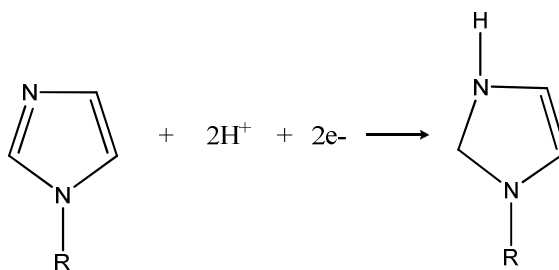


Figura 49. Suposição mecanística para a redução de CTZ em meio de tampão BR pH 12, sobre p-AgSAE.

Este mecanismo envolve a participação de dois elétrons, onde ocorre a redução da dupla ligação existente entre C=N (carbono 14 e nitrogênio 13) do anel imidazólico.

## 5. CONCLUSÕES

Os estudos foram iniciados com a avaliação da superfície eletródica, sendo avaliada por MEV e EDX, caracterizando a distribuição dos elementos presentes na amálgama de prata. Após esta etapa, foi realizado um estudo para encontrar as condições mais adequadas de redução do CTZ sobre a molécula em estudo, onde Tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> mostrou-se como o meio mais indicado para tal fim. Foram então otimizados os parâmetros da VOQ (frequência – 100 s<sup>-1</sup>; amplitude – 25 mV; incremento de potencial – 2 mV), sendo também utilizados os critérios de diagnóstico da VOQ para classificação do processo de redução como quase-reversível. A obtenção dos parâmetros mais adequados possibilitou o início dos estudos analíticos, propriamente ditos.

Os parâmetros de validação estabelecidos pela ANVISA foram avaliados. Assim, a metodologia desenvolvida apresenta uma faixa de trabalho de 4,97x10<sup>-7</sup> a 4,30x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, limites de detecção e de quantificação de 1,19x10<sup>-7</sup> e 3,98x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores dos RSD para as avaliações da precisão da metodologia foram inferiores a 5,0%. A robustez da metodologia foi avaliada pela variação do pH do eletrólito de suporte, não sendo observada diferença na corrente de pico. A exatidão da metodologia foi avaliada em função da taxa de recuperação, onde os valores das taxas de recuperação foram de 100,6%: 90,8%; 103,3% e 104,9%, respectivamente para eletrólito, comprimido, xampu e creme. Os valores dos RSD para as taxas de recuperação foram inferiores a 5,0%.

Para a elucidação do mecanismo de redução do CTZ, a eletrólise com potencial controlado foi utilizada para formação dos produtos de reação, que foram identificados utilizando RMN <sup>1</sup>H, onde se pode observar os sinais de deslocamento de  $\delta$  7,43 ppm



$\delta$ NH (C-N-C), dois H com  $\delta$  4,84 ppm  $\delta$ CH (N-C=C-N) e  $\delta$  3,91 ppm (N-C-N), o que confirma que a etapa de redução do CTZ ocorre sobre o anel imidazólico da molécula.

Desta forma, pode-se concluir que o eletrodo sólido de amálgama de prata se apresentou como uma solução para a substituição do HMDE na determinação de CTZ, de forma que este tipo de material pode ser utilizado em procedimentos analíticos com as mesmas características apresentadas pelo eletrodo gotejante de mercúrio e com uma redução drástica na quantidade de resíduos gerados.





## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ariens, E. J.; Simons, A. M.; *Topical Current Chemicals*, **52** (1974) 1.
- 2 Brunton, L.L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica, 11 ed. MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, **2006**.
- 3 Abdel-Rahman, S.; Kauffman, R. E.; *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44** (2004) 111.
- 4 Pereira, D. A.; *Química Nova*, **30** (2007) 171.
- 5 Odds, F. C.; Milne, L. J. R.; Gentles, J. C.; Ball, E. H.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **22** (1982) 43.
- 6 Lacaz, C. S. *Tratado de micologia médica*, **9** (2002) 998.
- 7 Smith, D. A.; Jones, B. C.; Walker, D. K.; *Medicinal Research Review*, **3** (1996) 243.
- 8 Tavares, W., Manual de Antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos, 2 ed. Editora Atheneu, São Paulo – SP, **1996**.
- 9 Low, A. S.; Wangboonskul, J. *The Analyst*, **124** (1999) 1589.
- 10 Khashaba, P. Y.; El-Shabouri, S. R.; Emara, K. M.; Mohamed, A. M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **22** (2000) 363.
- 11 de Bruijn, P.; Kehr, D. F. S.; Verweij, J.; Sparreboom, A. *Journal of Chromatography B*, **753** (2001) 395.
- 12 Proença, K. S.; Oliveira, R. V. M.; Gonçalves, M. M.; Vila, M. M. D. C., *Revista Brasileira de Farmácia*, **88** (2007) 187.
- 13 Cirilli, R.; Costi, R.; Di Santo, R.; Ferreti, R.; La Torre, F.; Angiolella, L.; Micocci, M. *Journal of Chromatography A*, **942** (2002) 107.
- 14 Heyden, Y. V.; Nguyet, A. N. M.; Dataevernier, M. R.; Massart, D. L.; Plaizzier-Vercammen, J., *Journal of Chromatography A*, **958** (2002) 191.
- 15 Abdel-Moety, E. M.; Khattab, F. I.; Kelani, K. M.; AbouAl-Alamein, A. M., *Il Farmaco* **57** (2002) 931.
- 16 Chem, Y.; Felder, L.; Jiang, X.; Naidong, W., *Journal of Chromatography B*, **774** (2002) 67.
- 17 Vertzoni, M. V.; Reppas, C.; Archontaki, H.A. *Journal of Chromatography B*, **839** (2006) 62.
- 18 Kovacs, K; Stampf, G.; Klebovich, I.; Antal, I.; Ludanyi, K., *European Journal of pharmaceutical science*, **36** (2009) 352.



- 19 Bajad, S.; Johri, R. K.; Singh, K.; Singh, J.; Bedi, K. L.; *Journal of Chromatography A*, **949** (2002) 43.
- 20 Farhadi, K.; Maleki, K.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30** (2002) 1023.
- 21 Arranz, A.; Echevarria, C.; Moreda, J. M.; Cid, A.; Arranz, J. F. *Journal of Chromatography A*, **871** (2000) 399.
- 22 Lichtig, J.; Andrade, R. F.; Vaz, J. M. *Analytica Chimica Acta* **332** (1996) 161.
- 23 Shamsipur, M.; Farhadi, K., *Electroanalysis* **12** (2000) 429.
- 24 Shamsipur, M.; Farhadi, K., *The Analyst* **125** (2000) 1639.
- 25 Pereira, F. C.; Stradiotto, N. R.; Zaroni, M. V. B. *Journal of Brazilian Chemical Society* **12** (2001) 202.
- 26 Peng, T.; Cheng, Q.; Yang, C. F. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **370** (2001) 1082.
- 27 Arranz, P.; Arranz, A.; Moreda, J. M.; Cid, A.; Arranz, J. F.. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33** (2003) 519.
- 28 Osteryoung, J. G.; Osteryoung, R. A.; *Analytical Chemistry*, **57** (1985) 101.
- 29 Osteryoung, J. G.; Schreiner, M. M; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (1988) 19.
- 30 Compton, R. G.; Banks, C. E., *Understanding Voltammetry*. World Scientific Publishing Co. Pte Ltd, USA, **2007**.
- 31 Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. *Química Nova*, **26** (2003) 88.
- 32 Ramaley, L.; Krause, M.S. *Analytical Chemistry*, **41** (1969) 1362.
- 33 Souza, D.; Codognoto, L.; Malagutti, A.R.; de Toledo, R.A.; Pedrosa, V.A.R.; Oliveira, T.S.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.; Machado, S.A.S.; *Química Nova*, **27** (2004) 790.
- 34 Lovric, M.; Jadresco, D., *Eletrochimica Acta*, **53** (2008) 8045.
- 35 Lovric, M; *Electroanalysis*, **14** (2002) 405.
- 36 Toledo, R.A, Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos – USP, **2006**.
- 37 Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods*, 2 ed. Wiley, Nova York, EUA, **2001**.
- 38 Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson, **2006**.
- 39 Ciszewska, M; Donten, M.; Stojek, Z. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 4112.

- 40 Horasawa, N.; Nakajima, H.; Ferracane, J.L.; Takahashi, S.; Okabe, T. *Dent Mater*, **12** (1996) 154.
- 41 Yospchuck, B.; Novotný, L.; *Electroanalysis*, **24** (2002) 14.
- 42 Duwensee, H.; Adamovsky, M.; Flechsig, G.U.; *International Journal of Electrochemical Science*, **2** (2007) 498.
- 43 Melo, L. C.; Salazar-Banda, G. R.; Machado, S. A. S.; Neto, P.L.; Souza, D.; Correia, A.N.; *Talanta*, **79** (2009) 1216.
- 44 De Souza, D.; de Toledo, R. A.; Galli, A.; Salazar-Banda, G. R.; Silva, M. R. C.; Garbelinni, G. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **387** (2007) 2245.
- 45 De Souza, D.; de Toledo, R. A.; Suffredini, H. B.; Mazo, L. H.; Machado, S. A. S.; *Electroanalysis*, **18** (2006) 605.
- 46 Yospchuck, B.; Novotný, L.; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **32** (2002) 141.
- 47 Yospchuck, B.; Novotný, L.; *Talanta*, **56** (2002) 886.
- 48 Ciszowska, M.; Donten, M.; Stojek, Z.; *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 4112.
- 49 Horasawa, N.; Nakajima, H.; Ferracane, J. L.; Takahashi, S.; Okabe, T.; *Dent Mater*, **12** (1996) 154.
- 50 Novotný, L.; Yospchuck, B.; Heyrovský, M.; Palecek, E. *Electroanalysis*, **21** (2002) 14.
- 51 Fadrná, R. *Analytical Letters*, **37** (2005) 3255.
- 52 Dias, J. J. C. *Química Quântica: fundamentos e métodos*. Lisboa: Fundação Calouste Gubenkian, 1980.
- 53 Hollauer, E. *Química Quântica*. Editora LCT, Rio de Janeiro, **2008**.
- 54 Clare, B. W. Frontier orbital energies in quantitative structure-activity relationships: A comparison of quantum chemical methods. *Theory. Chimica. Acta*, **87** (1994) 415.
- 55 Bruns, R. E.; Guadagnini, P. H.; Souza, A. A. *Química Nova* **19** (1996) 148.
- 56 Mendham J; Denney, R.C. *VOGEL – Análise Química Quantitativa*. Editora LTC Rio de Janeiro – RJ, Brasil, **2002**.
- 57 Silvertin, R. M.; Bassler, G. C.; Morril, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Guanabara Dois, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, **1979**.
- 58 Morita, T.; Assunção R. M. V., *Manual de soluções, reagentes e solventes*, Ed. Edgard Blucher, São Paulo – SP, Brasil, **2004**.

- 59 Wang, L.H.; Tseng, S.W; *Analytica Chimica Acta*, **432** (2001) 39.
- 60 Skoog, D.A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; Fundamentos de Química Analítica, Ed. Thomson São Paulo – SP, Brasil, **2007**.
- 61 Galli, A. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo – USP, **2005**.
- 62 Leite, F.; Validação em Análise Química, Ed. Átomo, Campinas – SP, Brasil, **1998**.
- 63 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.
- 64 Britton, H. T. K.; Robinson, R. A., *J. Chem. Soc.*, (1931) 1456.
- 65 Santos, L.B.O; Abate, G.; Masini, J.C. *Talanta* **68** (2005) 165.
- 66 Mirceski, V.; Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M.; Square Wave Voltammetry, theory and application, Ed. Springer, 2008.
- 67 Osteryoung, J.; O’Dea, J.J. *Electroanalytical Chemistry*. **14** (1982) 209.
- 68 Lovric, M; Komorsky-Lovric, S. *Journal of Eletroanalytical Chemistry* **248** (1988) 239.
- 69 Lovric, M., *Elektrokhimiya*, **27** (1991) 186.
- 70 Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **384** (1995) 115.
- 71 IUPAC, Analytical Chemistry Division, Commission on Spectrochemical and Optical Procedures for Analysis, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation, *Spectrochimica Acta, part B* **33** (1978) 242.
- 72 Horwitz, W. *Journal of Associated office Analytical Chemistry* **63** (1980) 1344.
- 73 Beltagi, A.M.; Abdallah, O.M.e; Ghoneim, M.M. *Talanta* **74** (2008) 851.
- 74 Poppi, R. J.; Braga, J. W. B. *Química Nova* **27** (2004) 1004.
- 75 Jiranek, I.; Peckova, K.; Kralova, Z.; Moreira, J.C.; Barek, J. *Electrochimica Acta* **54** (2009) 1939.
- 76 Selesovská-Fardá, R.; Fojta, M.; Navrátil, T.; Chýlková, J., *Analytica Chimica Acta* **582** (2007) 344.
- 77 Farmacopéia Brasileira, <<http://www.farmacopeia.org.br>>, acessada em maio de 2009.
- 78 Alcacér, L. Introdução à Química Quântica Computacional, Ed.IST Press, Lisboa-  
Por. **2007**.



## ANEXO 1

