

Artigo

Modificação de Eletrodos de Pasta de Carbono com o Polissacarídeo Sulfatado Porfirina: Potenciais Aplicações na Determinação Eletroanalítica de Sulfonamidas

Lima, D.; Lopes, L. C.; Jesus, C. G.; Calixto, C. M. F.; Calaça, G. N.; Viana, A. G.; Pessôa, C. A.*

Rev. Virtual Quim., 2016, X (X), no prelo. Data de publicação na Web: 20 de setembro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Carbon Paste Electrodes Modified with Sulfated Polysaccharide Porphyrin: Potential Applications in the Electroanalytical Determination of Sulfonamides

Abstract: This paper describes the preparation of carbon paste electrodes (CPE) modified with porphyrin (CPE/PFR), a sulfated polysaccharide extracted from red algae, and its application for the electroanalytical determination of sodium sulfacetamide (SFC) and sulfadiazine (SFD) by square wave voltammetry (SWV). The CPE/PFR was characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in presence of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox probe, and the electrochemical behavior of the drugs on the modified electrode surface was studied by CV. Experimental conditions such as pH and voltammetric parameters were optimized in order to achieve the best analytical current signal. The CPE/PFR showed higher current density values (j) and lower charge transfer resistance compared to the unmodified CPE, suggesting that the PFR had a positive effect on the electrode response. A good linear relationship between the oxidation peak current and the concentration of SFC and SFD was obtained by SWV for the CPE/PFR over the range of 4.98 to 47.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for both drugs, in BR buffer solution 0.04 mol L^{-1} by using SWV. Detection limit (DL) and quantification limit (QL) were found to be 0.75 and 2.51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for SFC and 1.47 and 4.91 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for SFD, respectively. Besides the good sensitivity, the CPE/PFR showed several advantages such as stability, ease of preparation and good reproducibility. The promising analytical performance of the developed sensor was finally confirmed at determining the studied drugs in pharmaceutical formulations.

Keywords: Porphyrin; Carbon Paste Electrode; Sulfacetamide; Sulfadiazine; Voltammetry.

Resumo

O presente trabalho descreve a preparação de eletrodos de pasta de carbono (EPC) modificados com o polissacarídeo sulfatado porfirina (PRF), extraído de algas vermelhas. Os eletrodos modificados (EPC/PFR) foram aplicados na determinação dos antibióticos sulfacetamida sódica (SFC) e sulfadiazina (SFD) utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ). O EPC/PFR foi caracterizado por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) na presença da sonda eletroquímica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, e o comportamento voltamétrico dos fármacos sobre o eletrodo modificado foi estudado por VC. A fim de se obter um maior sinal analítico de corrente para a determinação de SFC e SFD com o EPC/PFR, condições experimentais tais como pH e parâmetros operacionais da VOQ foram otimizadas. O EPC/PFR apresentou maiores valores de densidade de corrente (j) e menor resistência à transferência de carga em comparação com o ECV sem modificação, sugerindo que a PFR proporcionou uma melhora significativa em suas propriedades eletroquímicas. Utilizando VOQ, verificou-se que o EPC/PFR apresentou uma resposta de corrente que aumentou de modo linear com a concentração de SFC e SFD na faixa de 4,98 a 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os fármacos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados o EPC/PFR foram iguais a 0,75 e 2,51 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a SFC e 1,47 e 4,91 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a SFD, respectivamente. Além de boa sensibilidade, o EPC/PFR mostrou vantagens como estabilidade, reprodutibilidade e também facilidade de preparação, o que permitiu que o mesmo fosse eficientemente aplicado para a determinação dos fármacos estudados em amostras reais de medicamentos.

Palavras-chave: Porfirina; Eletrodo de Pasta de Carbono; Sulfacetamida; Sulfadiazina; Voltametria.

* Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Campus Uvaranas, CEP 84030-000, Ponta Grossa-PR, Brasil.

 christiana.pessoa@pq.cnpq.br

DOI:

Modificação de Eletrodos de Pasta de Carbono com o Polissacarídeo Sulfatado Porfirana: Potenciais Aplicações na Determinação Eletroanalítica de Sulfonamidas

Dhésmon Lima,^a Luma C. Lopes,^a Cliciane G. de Jesus,^a Carolina Maria F. Calixto,^b Giselle Nathaly Calaça,^a Adriano G. Viana,^a Christiana A. Pessoa^{a,*}

^a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Campus Uvaranas, 84030-000, Ponta Grossa-PR, Brasil.

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Campus Ponta Grossa, CEP 84016-210, Ponta Grossa-PR, Brasil.

* christiana.pessoa@pq.cnpq.br

Recebido em 12 de fevereiro de 2016. Aceito para publicação em 30 de agosto de 2016

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e soluções

2.2. Caracterização do polissacarídeo sulfatado PFR

2.3. Preparação do EPC e do EPC/PFR

2.4. Medidas eletroquímicas

2.5. Otimização dos parâmetros operacionais da VOQ e obtenção de curvas analíticas

2.6. Análise de amostras reais

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização espectroscópica do polissacarídeo sulfatado PFR

3.2. Caracterização eletroquímica do EPC/PFR

3.3. Comportamento voltamétrico da SFC e da SFD sobre o EPC/PFR 0,03%

3.4. Otimização dos parâmetros operacionais da VOQ e curvas analíticas

3.5. Determinação de SFC e SFD em amostras de medicamentos

4. Conclusão

1. Introdução

Os polissacarídeos correspondem a uma

das principais classes de biomoléculas constituintes dos organismos vivos, desempenhando funções biológicas fundamentais como constituição estrutural e geração de energia. Tais biomoléculas

apresentam geralmente um ou mais grupos funcionais ligados em diferentes posições à cadeia de carboidrato,¹ o que lhes confere uma ampla variabilidade estrutural. Polissacarídeos com um elevado grau de funcionalização com grupos sulfato, os chamados polissacarídeos sulfatados (PLS), podem ser facilmente extraídos a partir de algas marinhas. Tais PLS são comumente utilizados na indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas atuando como agentes estabilizantes, geleificantes e espessantes.^{2,3} Suas propriedades biológicas e físico-químicas tem despertado especial atenção de pesquisadores, uma vez que foram relatadas promissoras aplicações em terapias anticoagulantes, antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias, antialérgicas e antivirais.^{1,4-6} Além destas propriedades farmacológicas atrativas, tais polissacarídeos encontram também aplicações em diversas

áreas da biotecnologia e da engenharia.⁷

As porfiranas (PFR) constituem uma classe bem estudada de PLS obtidos por extração aquosa a partir de algas vermelhas das espécies *Porphyra* e *Bangia*.⁵ As PFR (Figura 1) apresentam uma estrutura linear formada por unidades alternadas de β -D-galactopiranoose substituídas glicosidicamente no carbono 3 e por unidades de α -L-galactopiranoose substituídas no carbono 4, em um arranjo dissacarídico alternante repetitivo,⁸ o qual pode ser representado por $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactopiranoose-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-galactopiranoose-(1}\rightarrow]_n$ (Figura 1). A ocorrência natural de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose e de radicais metila em alguns resíduos de β -D-galactopiranoose, assim como de grupos sulfato nas unidades de α -L-galactopiranoose, aumenta a diversidade estrutural desta classe de biomoléculas.⁸⁻¹⁰

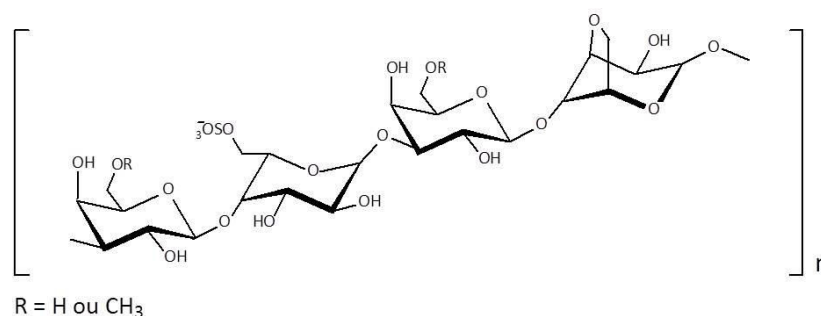


Figura 1. Estrutura química geral para as PFR⁸

Nos últimos anos, houve um aumento considerável no número de trabalhos de pesquisa em Eletroquímica e Eletroanalítica que envolvem a modificação química de eletrodos com polissacarídeos. Isto se deve ao fato destas biomoléculas serem atóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo e fácil obtenção, além de não apresentarem problemas relacionados à desnaturação e consequente perda de atividade biológica.^{1,7,11} Devido a tais vantagens, esta classe de compostos configura-se como uma das mais atrativas e promissoras ao desenvolvimento de eletrodos.^{2,12-18} No caso específico das PFR, a presença de grupos sulfato esterificados à

cadeia de carboidrato faz com que as mesmas possam ser consideradas como autênticos poliânions biológicos, atuando de maneira similar aos polieletrólitos convencionais sintéticos^{1,11} no sentido de facilitar a ocorrência dos processos de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução.¹⁹ A existência de uma elevada quantidade de grupos polares ligados à cadeia polimérica pode modificar ainda as propriedades da superfície eletródica,²⁰ e permitir desta maneira a interação com moléculas específicas, otimizando o processo de detecção. Portanto, quando aplicadas como modificadores de eletrodos, podem melhorar o desempenho destes dispositivos,

conferindo a eles maior sensibilidade, estabilidade e seletividade.

As sulfonamidas (SFs), também conhecidas como sulfas, constituem um importante grupo de drogas sintéticas antibacterianas muito empregadas em medicina (algumas vezes em associação com o fármaco trimetoprima) para o tratamento e prevenção de infecções urinárias, auditivas e oculares em humanos e animais, devido ao seu baixo custo e seu amplo espectro de ação.²¹⁻²⁴ Apesar das SFs apresentarem uma baixa toxicidade para humanos, uma dosagem excessiva pode causar efeitos indesejáveis como distúrbios nos sistemas excretor e digestório, e também reações alérgicas em pacientes hipersensíveis.^{25,26} Além disso, as SFs podem ser altamente persistentes no ambiente e passar por processos de bioacumulação, o que pode levar a um aumento dos efeitos tóxicos.²⁶ O uso indiscriminado de SFs para o tratamento de infecções em animais, e também como aditivo alimentar em rações, pode levar ainda ao acúmulo de resíduos destes compostos no organismo dos mesmos. Como consequência, níveis relativamente altos de SFs podem ser encontrados em alimentos, como carne, leite, ovos e mel. Isso aumenta o risco de efeitos adversos à saúde humana, e também contribui para o aumento da resistência de bactérias patogênicas aos referidos antibióticos.^{27,28}

Neste sentido, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam rápidos, seletivos, robustos e sensíveis para a determinação de SFs em amostras de medicamentos, alimentos, de fluidos biológicos (como soro ou plasma sanguíneo e urina) e ambientais (como solos e águas superficiais). Diversos métodos têm sido desenvolvidos, destacando-se entre eles a cromatografia líquida de alta eficiência,²⁹ cromatografia gasosa,³⁰ eletroforese capilar,²² espectrometria de massas²⁵ e espectroscopia UV-VIS.³¹ Apesar de tais métodos possuírem vantagens como alta sensibilidade e precisão, exigem o uso de técnicas que são caras e que muitas vezes

requerem exaustivas etapas de extração e pré-concentração, o que pode aumentar o tempo e o custo das análises, assim como o risco de perda de amostra.³² Assim, métodos eletroanalíticos que empregam sensores voltamétricos têm sido propostos como alternativas eficientes para a determinação de SFs, devido ao seu baixo custo, resposta rápida, alta sensibilidade, boa seletividade e possibilidade de análise diretamente na amostra, o que elimina em muitos casos a necessidade de tratamentos prévios.³³⁻³⁶

No que se refere ao conhecimento dos autores, não existem reportados na literatura até o momento exemplos da aplicação da PFR na modificação de eletrodos para aplicação na eletroanálise de fármacos. Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver e caracterizar eletrodos de pasta de carbono (EPC) modificados com o polissacarídeo sulfatado PFR, sendo estes aplicados para a determinação eletroanalítica de dois antibióticos da classe das sulfonamidas: sulfacetamida sódica (SFC) e sulfadiazina (SFD).

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e soluções

A PFR utilizada neste trabalho foi previamente obtida mediante extração aquosa à temperatura ambiente a partir de algas vermelhas do gênero *Porphyra* adquiridas comercialmente, segundo procedimento previamente descrito.³⁷ Todos os reagentes empregados para a preparação das soluções e dos eletrodos foram de grau analítico, à exceção dos fármacos SFC e SFD, que foram de grau farmacêutico (Henrifarma). Todas as soluções foram preparadas com água destilada. A solução da PFR foi preparada em solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,15 mol L⁻¹ em pH 6,5. Como sonda eletroquímica utilizou-se uma solução equimolar de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, de concentração 0,01 mol L⁻¹ ou 0,10 mol L⁻¹,

preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ pH 6,5. As soluções dos fármacos SFC e SFD foram preparadas diariamente, e guardadas sob refrigeração a 4 °C ao abrigo da luz quando não utilizadas.

2.2. Caracterização do polissacarídeo sulfatado PFR

A PFR foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* – FTIR) e de ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C). Os espectros de FTIR foram obtidos em equipamento da marca SHIMADZU, modelo FTIR-8400, no modo transmitância e empregando amostras do polissacarídeo em pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros de RMN¹³C foram obtidos em espectrômetro BRUKER, modelo Avance III, em *probe* de diâmetro externo de 5 mm. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D₂O) para análise, a uma temperatura de 80 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As análises para o núcleo de ¹³C foram obtidas na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 2,0 segundos, sendo feitas no total 8000 aquisições.

2.3. Preparação do EPC e do EPC/PFR

A pasta de carbono não modificada foi preparada misturando-se 0,075 g de grafite em pó (Fluka®) com um volume fixo (25 µL) de óleo mineral (Nujol®). Após homogeneização, a pasta foi introduzida e compactada na extremidade de um eletrodo consistindo em um tubo de Teflon® contendo contato elétrico, com profundidade e diâmetro iguais a 0,3 cm para a inserção da pasta. A confecção dos eletrodos de pasta de carbono modificados com a PFR (EPC/PFR) deu-se de maneira semelhante à dos

eletrodos não modificados. À mistura de grafite e óleo mineral foi acrescentado um volume de 25 µL de uma solução 1,00 mg mL⁻¹ do polissacarídeo sulfatado PFR (preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ em pH 6,5), correspondendo a uma proporção PFR/grafite de 0,03% (m/m). A quantidade de solução de PFR adicionada à pasta de carbono foi variada apenas para os estudos de otimização de proporção, por meio da variação da porcentagem em massa da PFR no eletrodo de acordo com os valores 0,02%, 0,03%, 0,05% e 0,07%. Esta mistura foi homogeneizada e, após secagem, devidamente inserida e compactada na extremidade do eletrodo. Quando não utilizados, os eletrodos foram guardados imersos em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ pH 6,5, sob refrigeração a 4 °C.

2.4. Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas à temperatura ambiente em um potenciostato PalmSens® e em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 100 (Ecochemie). Foi empregada uma célula convencional com capacidade de 10 mL, à qual foram conectados três eletrodos, sendo o EPC/PFR ou o EPC sem modificação como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar. A caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados deu-se por VC (a uma velocidade de varredura de potencial igual a 50 mV s⁻¹) e de EIE (potencial de circuito aberto, na faixa de frequências 10 kHz a 100 mHz, com amplitude igual a 10 mV), sendo as medidas realizadas em meio de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 0,01 mol L⁻¹ ou 0,10 mol L⁻¹. Os experimentos voltamétricos na presença da SFC e da SFD foram realizados por VC e por VOQ em meio de tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹, cujo pH foi ajustado pela adição de gotas de solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹. Foram empregadas

soluções estoque dos fármacos de concentração $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, a partir das quais foram realizadas diluições necessárias para as análises voltamétricas.

2.5. Otimização dos parâmetros operacionais da VOQ e obtenção de curvas analíticas

Os parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada (VOQ) para a determinação eletroanalítica de SFC e SFD – frequência de aplicação do pulso de potencial (f), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude do pulso de potencial (α) –, foram otimizados por meio de planejamentos fatoriais completos 2^3 com quintuplicata no ponto central. Os valores dos níveis foram estabelecidos segundo um estudo preliminar univariado. Deste modo, os níveis para a SFC foram: $f = 60 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 80 s^{-1} (+1); $\alpha = 10 \text{ mV}$ (-1) e 30 mV (+1); $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ (-1) e 6 mV (+1), enquanto que para a SFD foram: $f = 30 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 50 s^{-1} (+1); $\alpha = 10 \text{ mV}$ (-1) e 30 mV (+1); $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ (-1) e 4 mV (+1). Os ensaios foram realizados aleatoriamente na presença de $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada analito, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0 para a SFC e em pH 7,0 para a SFD. Após a otimização, curvas analíticas foram obtidas separadamente para os analitos estudados utilizando VOQ, em uma mesma faixa linear de concentrações, variando de 4,98 a $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.6. Análise de amostras reais

A metodologia voltamétrica desenvolvida

com o EPC/PFR foi aplicada para a determinação das sulfonamidas estudadas em amostras comerciais de medicamentos, adquiridas em estabelecimentos locais. A determinação de SFC foi realizada em pomada, ao passo que a SFD foi determinada em suspensão injetável para uso veterinário. Baseando-se na quantidade declarada pelos rótulos das formulações ($74,0 \text{ mg g}^{-1}$ no caso da SFC e $400,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para a SFD), soluções estoques dos medicamentos na concentração $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas, em água destilada para a amostra que continha SFC e em HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para a amostra de SFD, e então utilizadas para a análise voltamétrica. Nos experimentos, empregou-se o método da adição de padrão, com a adição de alíquotas de soluções padrões de SFC ou SFD na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ à célula eletroquímica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização espectroscópica do polissacarídeo sulfatado PFR

A caracterização da PFR foi conduzida por FTIR e RMN- ^{13}C . O espectro na região do infravermelho obtido para a amostra de PFR (Figura 2) apresentou bandas atribuídas a vibrações características do padrão estrutural das porfiranas, como em 3437 , 1423 , 1255 e 1074 cm^{-1} , as quais correspondem ao estiramento da ligação O-H, à deformação angular do grupo C-O-H, ao estiramento do grupo OSO_3^- e ao estiramento da ligação C-O, respectivamente.³⁸⁻⁴¹

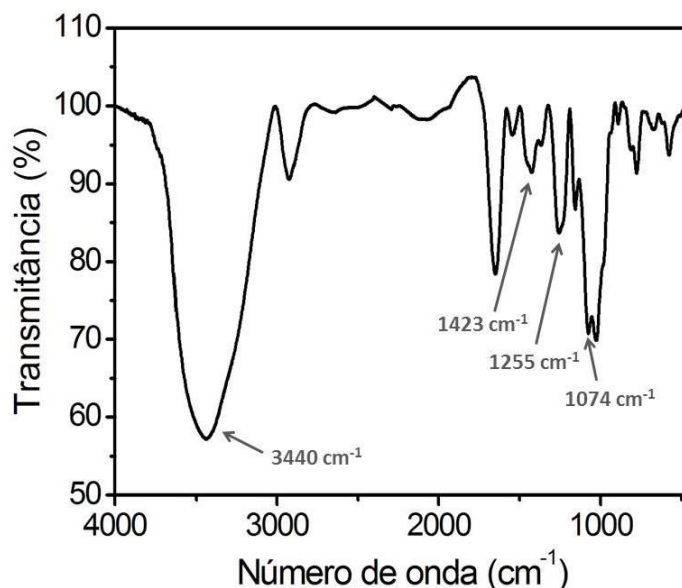


Figura 2. Espectro vibracional na região do infravermelho (FTIR) para amostra do polissacarídeo sulfatado PFR em pastilha de KBr

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais em deslocamentos químicos característicos de cada um dos resíduos de galactose das díades que constituem a estrutura da PFR (Figura 3). Os carbonos anoméricos (C1) apresentaram picos em 104,49 e 100,59 ppm, confirmando a presença da díade ($\rightarrow 3$)- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -L-3,6-anidrogallactopiranosose-(1 \rightarrow), e em 105,80 e 103,60 ppm, que referem-se à

díade ($\rightarrow 3$)- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -L-galactopiranosose-6-sulfato-(1 \rightarrow). Além disso, o sinal em 69,97 ppm pode ser tomado como referente ao C6 sulfatado do resíduo de α -L-galactopiranosose-6-sulfato.³⁸ Portanto, a análise conjunta destes experimentos confirmou que o polissacarídeo estudado possui uma estrutura química padrão porfirana, conforme esperado.

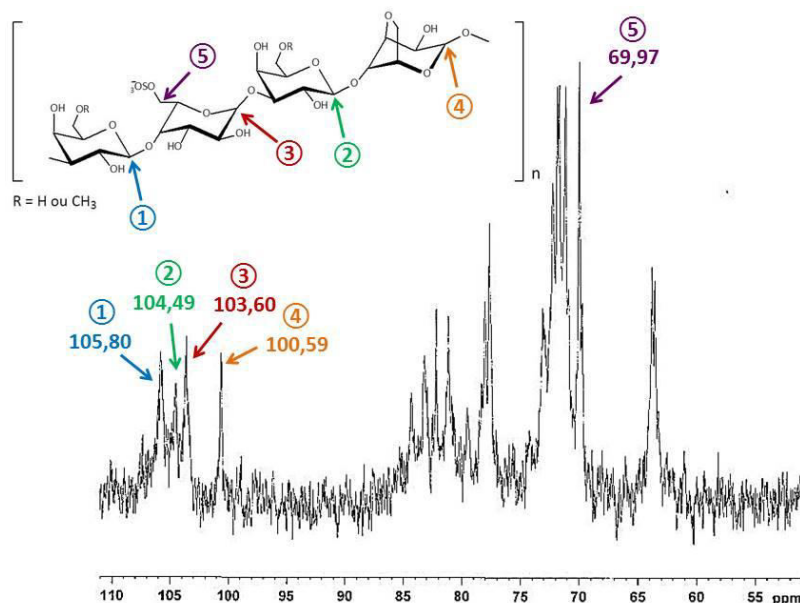


Figura 3. Estrutura geral da PFR e espectro de RMN- ^{13}C totalmente desacoplado para amostra da mesma dissolvida em D_2O

3.2. Caracterização eletroquímica dos eletrodos de pasta de carbono modificados com a PFR (EPC/PFR)

Inicialmente, um estudo comparativo entre o EPC sem modificação e o EPC/PFR foi realizado por meio de VC e EIE, a fim de se

avaliar a influência que o polissacarídeo PFR possui sobre a resposta eletroquímica dos EPC. Utilizou-se para os experimentos um EPC modificado com a PFR em uma proporção PFR/grafite igual a 0,03% (m/m). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.

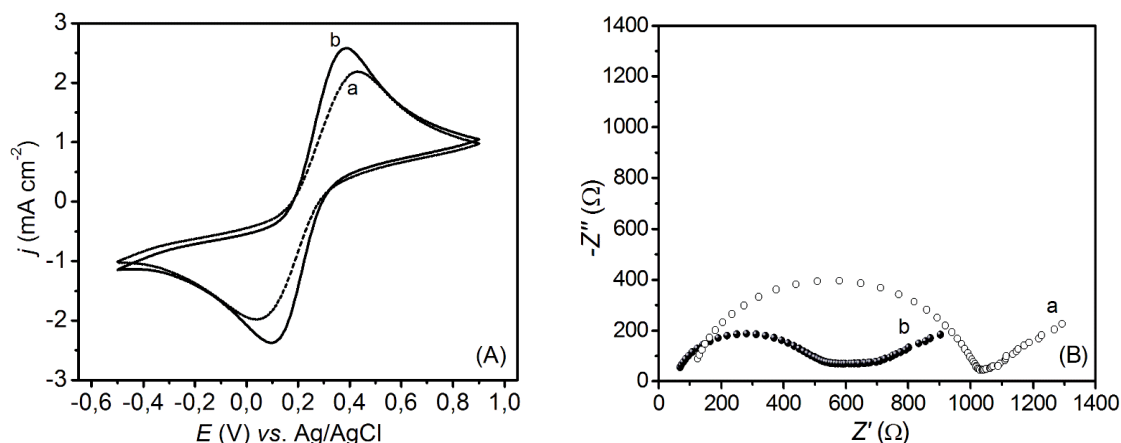


Figura 4. (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica obtidos para o EPC sem modificação (a) e o EPC/PFR 0,03% (b), em meio de solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,01 mol L⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹

A partir dos voltamogramas cíclicos (Figura 4A) pode-se verificar que o EPC/PFR 0,03% apresentou maiores valores de densidade de corrente de pico anódico (j_{pa}) e de pico catódico (j_{pc}) e também um menor valor de separação entre os potenciais de pico (ΔE_p) para o processo redox da sonda eletroquímica ($Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$), quando comparado ao EPC sem modificação (EPC: $j_{pa} = 2,24$ mA cm⁻², $j_{pc} = 2,12$ mA cm⁻² e $\Delta E_p = 390,6$ mV; EPC/PFR 0,03%: $j_{pa} = 2,78$ mA cm⁻², $j_{pc} = 2,60$ mA cm⁻² e $\Delta E_p = 288,1$ mV). Os valores de corrente de pico superiores e o menor valor de ΔE_p observados para o EPC/PFR 0,03% indicam que, neste eletrodo, o processo de transferência eletrônica ocorre com uma maior velocidade comparando-se ao EPC sem modificação.^{20,42}

Os diagramas de Nyquist obtidos para os eletrodos (Figura 4B) mostraram duas regiões distintas: um semicírculo a altas frequências, cujo diâmetro pode ser considerado equivalente à resistência de transferência de

carga da molécula sonda na superfície dos eletrodos (R_{ct}), e uma região linear a frequências mais baixas, que é atribuída ao processo de difusão das espécies $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$.⁴²⁻⁴⁷ Pode-se verificar que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPC sem modificação foi maior do que o obtido para o EPC/PFR 0,03%, sugerindo que os eletrodos não modificados apresentaram uma maior R_{ct} do que aqueles onde a PFR estava presente (EPC: $R_{ct} = 9,30 \times 10^2$ Ω; EPC/PFR 0,03%: $R_{ct} = 4,80 \times 10^2$ Ω). Os maiores valores de corrente e a menor R_{ct} verificada para o EPC/PFR 0,03% comprovam, portanto, que a incorporação da PFR ao EPC traz uma melhora significativa em sua resposta eletroquímica, o que viabiliza a sua aplicação como um sensor.

As melhores respostas observadas para o EPC/PFR 0,03% podem ser uma consequência da elevada quantidade de cargas presentes no polissacarídeo,^{48,49} o que faz com que o mesmo atue de modo similar aos

polieletrólitos convencionais,^{1,11} isto é, facilitando os processos de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução.¹⁹ Outra possível justificativa para o incremento na resposta dos eletrodos modificados pode ser dada com base no fato de que a modificação da pasta com a PFR proporcionou ao material um maior caráter hidrofílico, devido à grande quantidade de hidroxilas e grupos sulfato existentes na estrutura do polissacarídeo. A presença de tais grupos pode ter modificado as propriedades interfaciais da superfície do eletrodo, de modo a favorecer a aproximação da sonda eletroquímica e facilitar a transferência eletrônica.²⁰ A combinação destes dois efeitos descritos pode ter, portanto, facilitado o processo de transferência de elétrons e, deste modo, melhorado o desempenho eletroquímico do EPC/PFR.

No intuito de se obter uma maior sensibilidade de corrente para os eletrodos modificados, realizou-se um estudo de proporção entre polissacarídeo e grafite, variando-se as porcentagens em massa de PRF segundo os valores: 0,02%, 0,03%, 0,05% e 0,07% (Tabela 1). É possível observar que o eletrodo modificado na proporção 0,03% (m/m) obteve maiores valores de j_{pa} e de j_{pc} , assim como um menor ΔE_p , demonstrando assim uma maior reversibilidade no processo de transferência eletrônica. Essa maior reversibilidade indica que o processo ocorre de maneira mais efetiva⁴² para os eletrodos modificados com esta proporção. Assim, estabeleceu-se 0,03% como a proporção ótima para a preparação e aplicação do EPC/PFR como sensor eletroquímico para determinação dos antibióticos SFC e SFD.

Tabela 1. Valores de j_{pa} , $-j_{pc}$ e ΔE_p obtidos com o EPC/PFR em diferentes proporções, em meio de solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,10 mol L⁻¹

PFR/grafite (%)	j_{pa} (mA cm ⁻²)	$-j_{pc}$ (mA cm ⁻²)	ΔE_p (mV)
EPC	20,06	20,17	325,0
0,02	20,54	20,64	340,0
0,03	25,36	24,86	285,0
0,05	19,88	19,49	325,0
0,07	25,06	24,55	290,0

A estabilidade de resposta voltamétrica do EPC/PFR 0,03% foi avaliada por meio da variação nos valores de j_{pa} e E_{pa} após a aplicação de cem ciclos voltamétricos consecutivos sobre o mesmo, ainda na presença da sonda eletroquímica. Para fins de comparação, este mesmo estudo foi realizado com o EPC sem modificação. Os resultados indicaram que, mesmo após a varredura de cem ciclos sucessivos, não ocorreram variações significativas nos parâmetros avaliados tanto para o EPC/PFR 0,03% quanto para o eletrodo não modificado. Desta forma, observou-se uma variação de 0,32% no valor de j_{pa} e de 1,15%

no E_{pa} para o EPC/PFR 0,03%, contrastando com a variação de 2,25% e 1,94% para os mesmos parâmetros para o EPC não modificado, o que nos permite afirmar que a resposta voltamétrica do EPC/PFR 0,03% manteve-se mais estável em relação à resposta apresentada pelo eletrodo não modificado, ainda que a pasta de carbono tenha adquirido um maior caráter hidrofílico após a modificação com a PFR. Neste sentido, nota-se que a incorporação do polissacarídeo também ocasionou um aumento na estabilidade da pasta de carbono, a qual pode ser consequência de uma maior interação entre as partículas de grafite e as

cadeias de PFR. Os resultados positivos obtidos para os eletrodos modificados evidenciam, portanto, que os mesmos são atrativos, apresentando um alto potencial de aplicação em sistemas eletroanalíticos.

3.3. Comportamento voltamétrico da SFC e da SFD sobre o EPC/PFR 0,03%

Segundo Momberg e colaboradores,⁵⁰ a oxidação geral das SFs em soluções aquosas ocorre segundo um mecanismo irreversível e dependente do pH do meio, que envolve a

transferência de dois elétrons e com a participação de dois prótons, no qual o grupo amino primário é oxidado a iminobenzoquinona (Figura 5).

Considerando-se este fato, foram realizados estudos por VC para o EPC/PFR 0,03% separadamente na presença de SFC e SFD em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, em uma faixa de pH variando de 2,0 a 9,0. Os voltamogramas obtidos, assim como as correlações entre o potencial de pico anódico (E_{pa}) e o pH do eletrólito suporte para cada analito são apresentados na Figura 6.

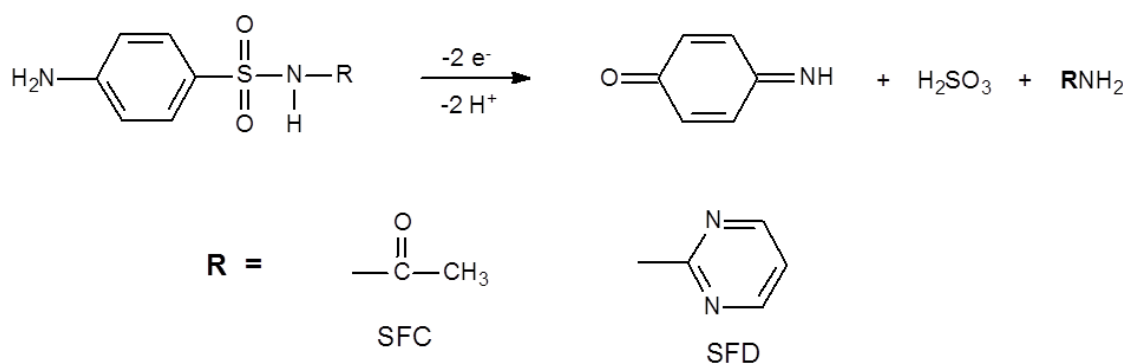


Figura 5. Mecanismo para a oxidação eletroquímica da SFC e da SFD

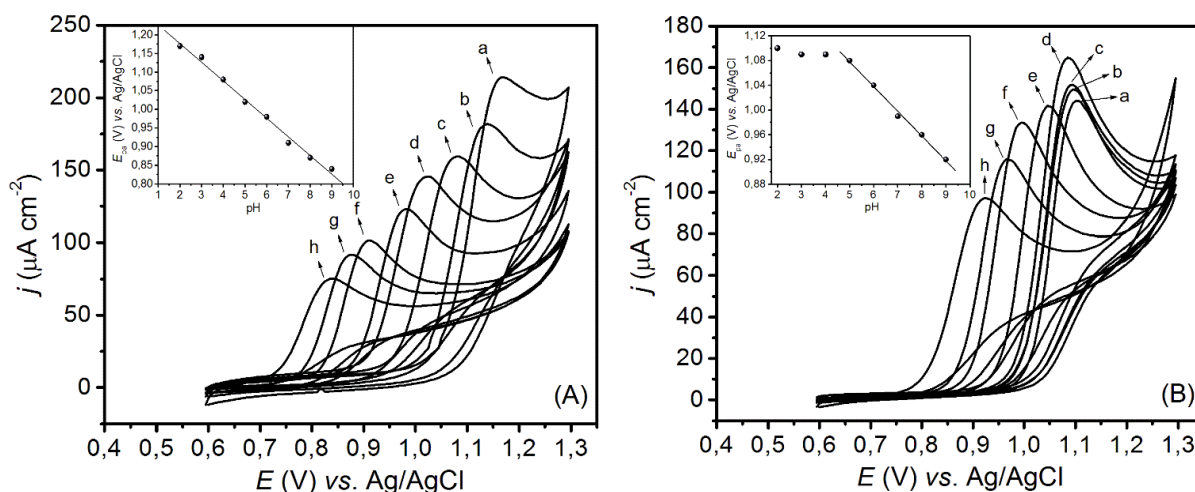


Figura 6. Voltamogramas cíclicos para o EPC/PFR 0,03% na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de (A) SFC e (B) SFD, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, nos pHs 2,0 (a), 3,0 (b), 4,0 (c), 5,0 (d), 6,0 (e), 7,0 (f), 8,0 (g) e 9,0 (h) ($v = 50$ mV s⁻¹). Os gráficos inseridos mostram as correlações obtidas em cada caso entre o potencial de pico anódico (E_{pa}) e o pH do eletrólito suporte

Observa-se na Figura 6 que as sulfonamidas estudadas foram oxidadas na superfície do EPC/PFR 0,03%, apresentando um único processo anódico que ocorreu irreversivelmente, uma vez que nenhum processo catódico foi observado na varredura voltamétrica inversa. Assim como era esperado, verificou-se para ambos os analito uma tendência de deslocamento do pico de oxidação para valores menos positivos de potencial com o aumento do valor do pH da solução. Sabendo-se que a oxidação eletroquímica das sulfas ocorre com a remoção de dois prótons das respectivas moléculas, é possível afirmar que em pHs mais básicos tal desprotonação ocorre mais facilmente,⁵¹ o que possibilita a oxidação da sulfa em um menor valor de potencial. Em pHs ácidos, ao contrário, pode-se assumir que a remoção dos prótons é menos favorecida, o que justifica o valor mais alto de potencial necessário para que os mesmos possam ser retirados da molécula para que a oxidação seja possível.

As relações lineares obtidas entre o E_{pa} e o pH do meio estão representadas nos gráficos inseridos nas Figuras 6A e 6B. Para a SFC, observou-se um comportamento linear na faixa de pH de 2,0 a 9,0, o qual pode ser descrito pela equação: $E_{pa} = 1,27 - 0,050 \text{ pH}$. Para a SFD, a relação linear foi verificada na faixa de pH de 5,0 a 9,0, correspondendo à equação: $E_{pa} = 1,28 - 0,040 \text{ pH}$. As inclinações das retas obtidas foram iguais a 50 e 40 mV pH^{-1} para SFC e SFD, respectivamente. O valor referente à SFC se aproximou da inclinação nernstiana teórica de 59,0 mV pH^{-1} , sugerindo que a oxidação do fármaco ocorre com o envolvimento do mesmo número de prótons e elétrons.⁵² Entretanto, o desvio no comportamento nernstiano percebido para a

SFD pode ser tomado como um indicativo de que o mecanismo de oxidação deste analito possivelmente possui outras etapas e reações acopladas à transferência eletrônica.

Observou-se também que em pHs básicos o valor de j_{pa} é menor comparado ao obtido em pHs ácidos. Assim, para a SFC, selecionou-se o pH 5,0 para os estudos posteriores, enquanto que para a SFD, o pH escolhido foi 7,0. Nestes pHs, a j_{pa} obtida pela oxidação dos analitos apresentou um valor satisfatório ($145,35 \mu\text{A cm}^{-2}$ para SFC e $133,52 \mu\text{A cm}^{-2}$ para a SFD), além do processo ter ocorrido em um potencial menos susceptível à interferência de outras espécies eletroativas (como a trimetoprima, por exemplo) eventualmente presentes em solução (1,02 V para SFC e 0,99 V para a SFD), em comparação aos potenciais observados em pHs mais ácidos.

Vale ressaltar que a influência de outros sistemas tamponantes nestes processos também foi testada (tampão citrato, fosfato-salino e Mcllvaine). No entanto, as melhores respostas foram obtidas em tampão BR para os dois analitos, razão pela qual este meio foi mantido para a realização dos experimentos posteriores.

Estudos comparativos entre o EPC não modificado e o EPC/PFR 0,03% na presença de SFC e SFD, nos valores de pH escolhidos para cada fármaco, demonstraram que o eletrodo modificado apresentou para os dois analitos um valor de j_{pa} maior ($82,40 \mu\text{A cm}^{-2}$ para SFC e $102,96 \mu\text{A cm}^{-2}$ para SFD) em comparação com o eletrodo sem modificação ($64,50 \mu\text{A cm}^{-2}$ para SFC e $84,93 \mu\text{A cm}^{-2}$ para SFD) (Figura 7), confirmando o efeito positivo que a PFR possui sobre o desempenho dos eletrodos.

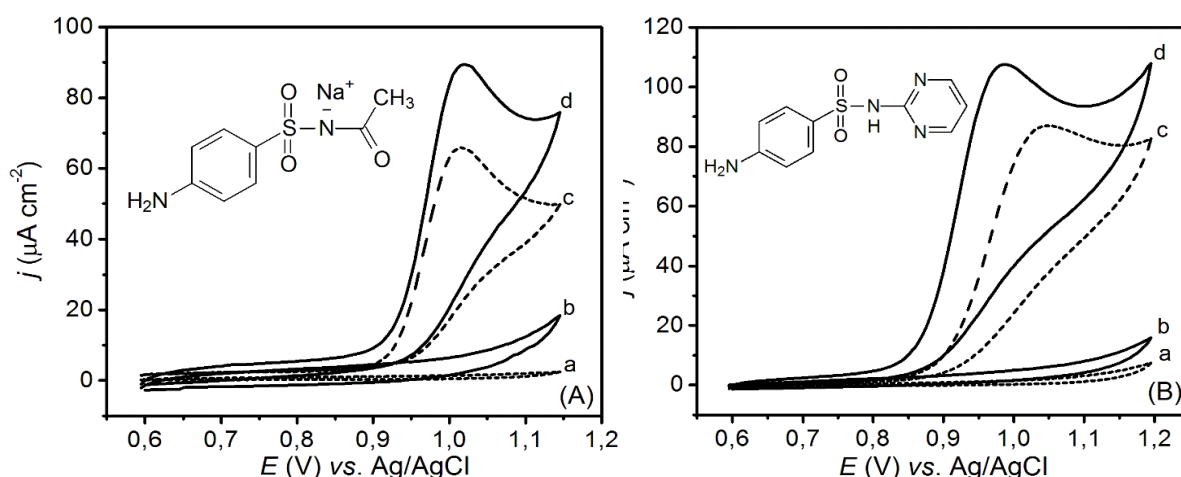


Figura 7. Voltamogramas cíclicos para o EPC (a e c) e para o EPC/PFR 0,03% (b e d) na ausência (a e b) e na presença de $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (c e d) de (A) SFC (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 5,0) e (B) SFD (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 7,0), na velocidade de varredura $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Estudos voltamétricos em diferentes valores de velocidade de varredura de potencial (v) empregando-se uma concentração fixa de cada fármaco igual a $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 5,0 para SFC e 7,0 para SFD, indicou que o

processo de oxidação da SFC e da SFD sobre o EPC/PFR 0,03% é controlado por difusão, uma vez que o gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$ apresentou comportamento linear para ambas as sulfonamidas ($R = 0,999$ para SFC e $R = 0,994$ para SFD) (Figura 8).⁴³

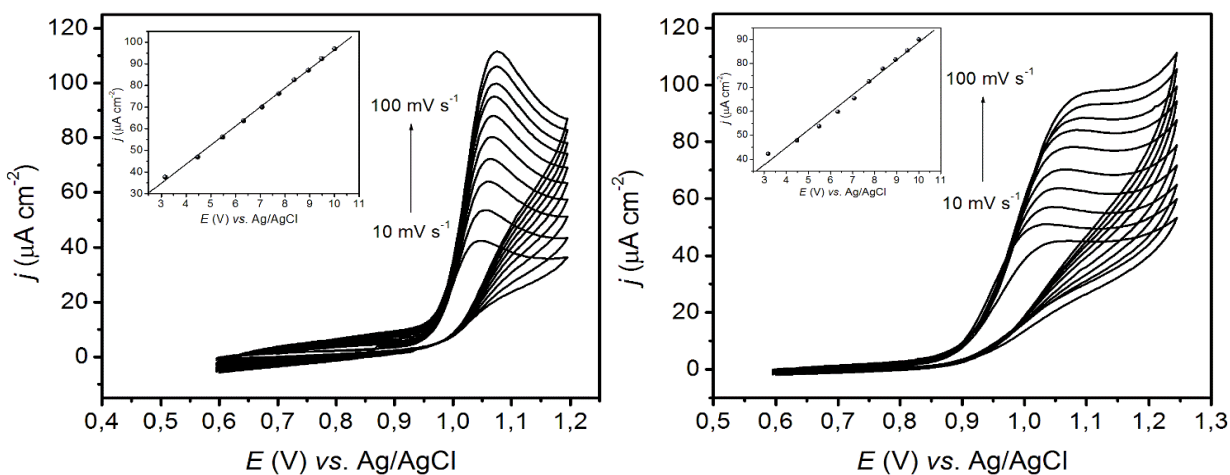


Figura 8. Voltamogramas cíclicos para o EPC/PFR na presença de $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de (A) SFC e (B) SFD, em meio de tampão BR 0,04 mol L^{-1} em pH 5,0 (SFC) e 7,0 (SFD), com velocidades de varredura variando de 10 a 100 mV s^{-1}

3.4. Otimização dos parâmetros operacionais da VOQ e obtenção de curvas analíticas

Os parâmetros operacionais da VOQ (j , a e ΔE_s) estão diretamente relacionados ao perfil voltamétrico e, conseqüentemente, à sensibilidade da técnica.^{53,54} Portanto, para que uma maior resposta de corrente fosse

alcançada para os sistemas em estudo, realizou-se a otimização dos referidos parâmetros empregando-se planejamentos fatoriais completos 2^3 com quintuplicata no ponto central, sendo as replicatas utilizadas para o cálculo da estimativa do desvio. A utilização do planejamento fatorial permitiu

que os três parâmetros fossem avaliados simultaneamente para a obtenção de um maior sinal analítico, conferindo assim aos eletrodos maior sensibilidade aos fármacos estudados. Os resultados obtidos para os planejamentos são mostrados na Tabela 2 para ambos os analitos.

Tabela 2. Combinação dos níveis dos fatores estudados e respostas medidas na otimização dos parâmetros operacionais da VOQ via planejamentos fatoriais 2^3 para $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de SFC e $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de SFD empregando o EPC/PFR

Ensaio	a	f	ΔE_s	$j_{pa,SFC} (\mu\text{A cm}^{-2})$	$j_{pa,SFD} (\mu\text{A cm}^{-2})$
1	-	-	-	128,31	37,60
2	+	-	-	282,53	91,27
3	-	+	-	136,34	43,52
4	+	+	-	315,49	111,41
5	-	-	+	139,72	42,67
6	+	-	+	338,59	108,45
7	-	+	+	146,48	50,14
8	+	+	+	371,97	134,79
9	0	0	0	257,75	93,80
10	0	0	0	257,89	95,63
11	0	0	0	260,98	96,34
12	0	0	0	261,55	96,47
13	0	0	0	256,62	93,24

Níveis dos fatores para a SFC: $f = 60 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 80 s^{-1} (+1); $a = 10 \text{ mV}$ (-1) e 30 mV (+1); $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ (-1) e 6 mV (+1); níveis dos fatores para a SFD: $f = 30 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 50 s^{-1} (+1); $a = 10 \text{ mV}$ (-1) e 30 mV (+1); $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ (-1) e 4 mV (+1).

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que a maior sensibilidade de corrente para ambos os analitos é obtida quando os níveis dos fatores estão ajustados no nível (+), correspondente ao ensaio 8 de cada caso. De acordo com o tratamento

estatístico dos dados, os fatores que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança para ambos os fármacos foram: amplitude, frequência e incremento (efeitos principais), assim como as interações $a \times f$ e $a \times \Delta E_s$ (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos principais e de interação calculados para os planejamentos fatoriais empregados na otimização dos parâmetros operacionais da VOQ para determinação de SFC e SFD com o EPC/PFR 0,03%

SFC		SFD	
Estimativa do desvio		Estimativa do desvio	
$s = 2,17 \times t_{95\%, v=4} = 6,02$		$s = 1,49 \times t_{95\%, v=4} = 4,14$	
Efeitos principais		Efeitos principais	
<i>f</i>	20,28	<i>f</i>	14,97
<i>a</i>	189,43	<i>a</i>	68,00
ΔE_s	33,52	ΔE_s	13,06
Interações de 2ª ordem		Interações de 2ª ordem	
<i>f</i> x <i>a</i>	12,89	<i>f</i> x <i>a</i>	8,27
<i>f</i> x ΔE_s	-0,21	<i>f</i> x ΔE_s	1,94
<i>a</i> x ΔE_s	22,75	<i>a</i> x ΔE_s	7,22
Interação de 3ª ordem		Interação de 3ª ordem	
<i>f</i> x <i>a</i> x ΔE_s	0,42	<i>f</i> x <i>a</i> x ΔE_s	1,16

O fato de os efeitos de segunda ordem *a* x *f* e *a* x ΔE_s terem sido significativos indica que para a obtenção da melhor resposta, em termos de j_{pa} , os três fatores estudados devem ser levados em consideração. Portanto, neste caso, os efeitos principais não devem ser interpretados individualmente. Os efeitos em questão podem ser melhor visualizados por meio das interpretações geométricas apresentadas na Figura 9. Nestas figuras é possível observar

que o melhor sinal analítico é obtido nos vértices (++) para qualquer uma das interações *a* x *f* e *a* x ΔE_s , verificando-se deste modo que um maior valor de densidade de corrente é obtido quando os três fatores estão todos ajustados em seu nível (+). Assim, para a determinação da SFC com o EPC/PFR os valores otimizados foram: *f* = 80 s⁻¹; *a* = 30 mV; e ΔE_s = 6 mV, enquanto para a SFD: *f* = 50 s⁻¹; *a* = 30 mV; e ΔE_s = 4 mV.

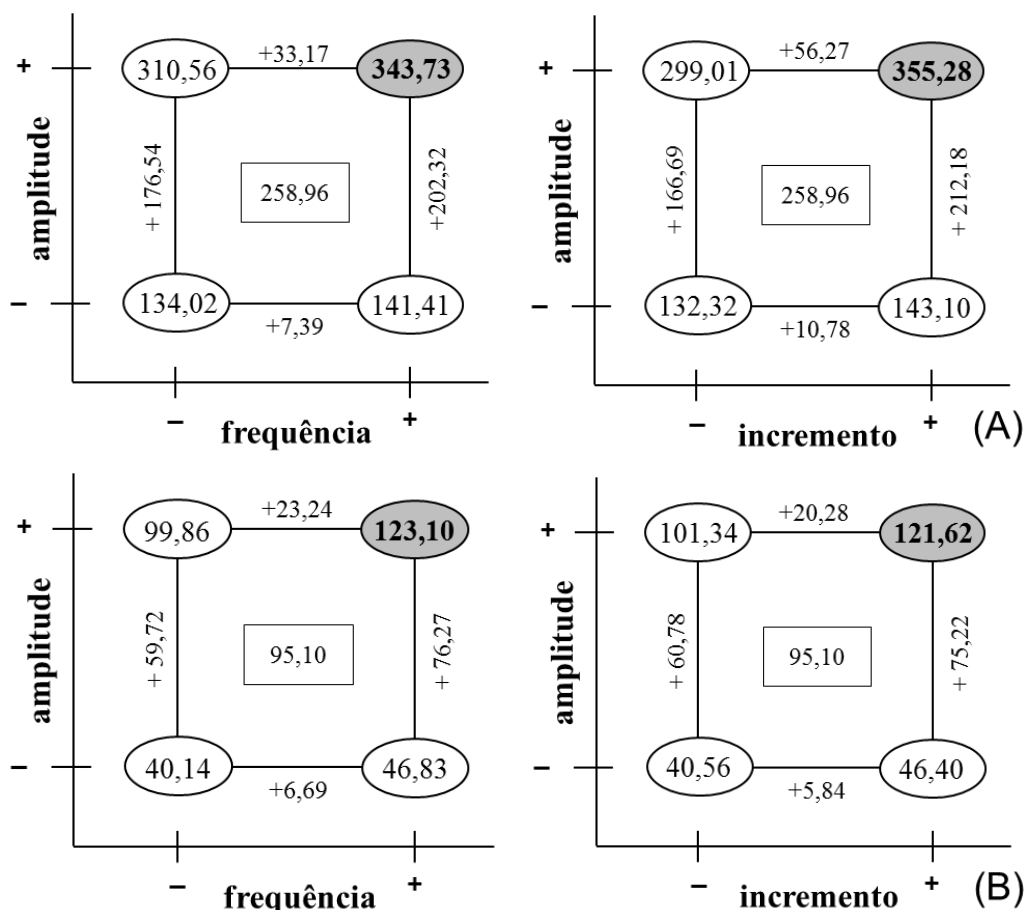


Figura 9. Interpretações geométricas para os efeitos de interação de segunda ordem $a \times f$ e $a \times \Delta E_s$ para (A) SFC e (B) SFD. O valor no centro dos quadrados representa a média dos valores de j_{pa} obtidos para cada caso no ponto central

Com os parâmetros e condições experimentais otimizados, curvas analíticas foram obtidas para os fármacos na faixa de concentração de $4,98 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0 para a SFC e 7,0 para a SFD. Obteve-se, em cada caso, uma relação linear entre a j_{pa} e a concentração de analito (Figura 10), as quais são descritas pelas seguintes equações: j_{pa}

$(\mu\text{A cm}^{-2}) = 1,43 \text{ [SFC]} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,14$; com $R = 0,998$, para SFC, e $j_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0,89 \text{ [SFD]} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,50$; com $R = 0,999$, para a SFD. A sensibilidade do EPC/PFR 0,03% para a detecção voltamétrica das sulfas foi determinada a partir das inclinações das curvas analíticas, correspondendo a $1,43 \mu\text{A L cm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ para a SFC, e $0,89 \mu\text{A L cm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ para a SFD.

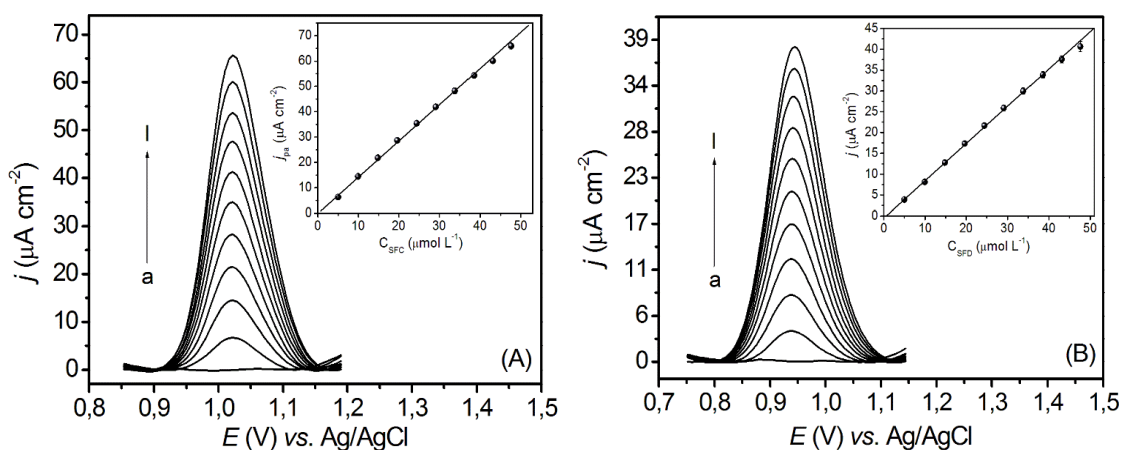


Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes valores de concentração de (A) SFC (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0, com $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$) e (B) SFD (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 7,0 com $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$): ausência dos analitos (a); 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b); 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (c); 14,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (d); 19,61 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (e); 24,39 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (f); 29,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (g); 33,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (h); 38,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (i); 43,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (j); 47,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (l). Os gráficos inseridos mostram as curvas analíticas obtidas para os fármacos estudados ($n=3$)

O aumento linear dos valores de j_{pa} com o aumento da concentração dos fármacos possibilitou o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), seguindo-se os critérios definidos pela IUPAC,⁵⁵ por meio das equações: $LD = 3\sigma/b$ e $LQ = 10\sigma/b$, onde σ é o desvio padrão de dez medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. Os valores de LD obtidos para o EPC/PFR 0,03% foram iguais a 0,75 e 1,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para SFC e SFD. Já os valores obtidos para o LQ para as sulfas estudadas foram da ordem de 2,51 e 4,91 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para SFC e SFD, respectivamente. Os parâmetros resultaram em valores comparáveis aos obtidos em trabalhos previamente reportados que utilizam métodos eletroanalíticos,^{35,36,56-58} cromatográficos,^{59,60} e espectrofotométricos.^{61,62}

A precisão do método foi avaliada por VOQ nas condições experimentais otimizadas, onde empregou-se um EPC/PFR 0,03% em cinco medidas sucessivas no mesmo eletrólito suporte (precisão intra-corrída) e em soluções de eletrólito suporte diferentes (precisão inter-corrída), na presença de $9,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cada sulfá. A reprodutibilidade da preparação do

eletrodo modificado foi determinada utilizando-se quatro diferentes EPC/PFR 0,03%, testados na presença de $9,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cada do analito. Os resultados foram todos expressos em termos do desvio padrão relativo (DPR) das j_{pa} obtidas.

A exatidão do EPC/PFR 0,03% para a determinação voltamétrica de SFC e SFD foi verificada por meio de estudos de recuperação (em triplicata) dos analitos em eletrólito puro (tampão BR 0,04 mol L⁻¹), empregando-se o método da adição padrão e os parâmetros operacionais da VOQ otimizados. O eletrólito suporte foi fortificado com 7,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SFC ou SFD, seguido por adições de alíquotas de uma solução padrão de cada fármaco, na faixa de 4,98 a 24,4 mol L⁻¹ de analito. As concentrações recuperadas foram determinadas por extrapolação das curvas analíticas obtidas em cada caso, e expressas em porcentagem de recuperação.

Os resultados obtidos para todos os parâmetros analíticos descritos anteriormente são mostrados na Tabela 4. Verifica-se que os resultados de recuperação para os analitos aproximaram-se de 100%, evidenciando, juntamente com os baixos

valores de LD e LQ e com os bons níveis de precisão obtidos, a potencialidade de aplicação dos sensores desenvolvidos na determinação dos mesmos em amostras reais.

Tabela 4. Parâmetros analíticos obtidos para a determinação eletroanalítica de SFC e SFD com o EPC/PFR 0,03% utilizando VOQ

Parâmetro	SFC	SFD
Faixa linear	4,98 – 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,98 – 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Equação da reta	$j_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = 1,43 [\text{SFC}] (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,14$	$j_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0,89 [\text{SFD}] (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,50$
R	0,9989	0,9997
Sensibilidade	1,43 $\mu\text{A L cm}^{-2} \text{mol}^{-1}$	0,89 $\mu\text{A L cm}^{-2} \text{mol}^{-1}$
LD	0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$
LQ	2,51 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,91 $\mu\text{mol L}^{-1}$
%DPR ^a	3,18%	1,04%
%DPR ^b	4,65%	2,65%
%DPR ^c	4,52%	2,17%
%Recuperação (n = 3)	107,88%	100,50%

^a Precisão intra-corrida (n = 5)

^b Precisão inter-corrida (n = 5)

^c Reprodutibilidade (n = 4)

3.5. Determinação de SFC e SFD em amostras de medicamentos

A potencialidade de aplicação do EPC/PFR para a determinação das sulfonamidas estudadas foi avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação em amostras de

formulações farmacêuticas, nas condições experimentais otimizadas. Para as determinações, foi empregado o método da adição de padrão, assim como realizado nos experimentos de recuperação dos analitos em eletrólito puro. Os resultados foram obtidos em triplicata, e são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação voltamétrica de SFC e SFD em amostras reais de medicamentos com o EPC/PFR 0,03%

Amostras	Dosagem nominal	Dosagem determinada ^a	DPR (%)	Erro relativo ^b (%)
Pomada (SFC)	74,0 mg g^{-1}	69,9 mg g^{-1}	6,19	5,54
Injetável (SFD)	400,0 mg mL^{-1}	404,4 mg mL^{-1}	2,06	1,10

^a Média de três análises.

^b Erro relativo (%) = $[(\text{Dosagem determinada} - \text{Dosagem nominal}) / \text{Dosagem nominal}] \times 100$

Os valores de dosagem determinados para os medicamentos com o método voltamétrico desenvolvido aproximaram-se dos valores rotulados, e estão dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Americana⁶⁴ e pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.⁶⁵ Desta forma, os resultados obtidos para a análise das formulações farmacêuticas confirmaram o bom nível de exatidão do EPC/PFR 0,03% para a determinação de SFC e SFD em amostras de medicamentos. É conveniente destacar a praticidade do método desenvolvido, uma vez que não foram necessárias etapas prévias de extração dos princípios ativos a partir das amostras para a obtenção de resultados satisfatórios, indicando que o método voltamétrico apresentado pode conduzir a análises mais rápidas. Além disso, a análise das amostras reais pode comprovar a especificidade do EPC/PFR 0,03% para a detecção de SFC e SFD, uma vez que ambas as formulações possuem outros componentes em sua composição (trolamina e trimetoprima para os medicamentos contendo SFC e SFD, respectivamente). Apesar da presença destes potenciais interferentes, as porcentagens de recuperação para os dois analitos foram obtidas dentro dos intervalos adequados,^{64,65} evidenciando a seletividade do sensor desenvolvido.

4. Conclusão

Neste trabalho, um novo sensor para a determinação voltamétrica dos antibióticos SFC e SFD foi desenvolvido a partir da modificação de um eletrodo de pasta de carbono com o polissacarídeo sulfatado PFR e utilizando-se voltametria de onda quadrada. A caracterização eletroquímica dos eletrodos evidenciou que o EPC/PFR apresentou, em comparação com o EPC sem modificação, maiores valores de corrente e uma resposta mais estável, além de uma menor R_{ct} . A melhora na resposta dos eletrodos

modificados pode ser tomada como uma possível consequência do aumento do caráter hidrofílico e da condutividade do material após a incorporação da PFR, o que pode ter facilitado a ocorrência do processo de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução. O sensor apresentou bons índices de precisão e de reprodutibilidade de resposta, mostrando-se sensível para a determinação da SFC e da SFD em amostras de formulações farmacêuticas utilizando voltametria de onda quadrada. Tais características, juntamente com a simplicidade experimental da metodologia voltamétrica desenvolvida, fazem do EPC/PFR uma alternativa viável e de baixo custo a ser aplicada em análises para o controle de qualidade de medicamentos, e com possibilidade de aplicação também para a determinação dos fármacos estudados em outras matrizes, como de águas superficiais e de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), ao Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM), ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-labmu), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecimentos também a H. E. Cavalcanti, por ter fornecido as amostras do polissacarídeo utilizado no trabalho.

Referências Bibliográficas

- 1 Raveendran, S.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9*, 605. [CrossRef] [PubMed]

- ² Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 196. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Kadam, S. U.; Tiwari, B. K.; O'Donnell, C. P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science and Technology* **2015**, *50*, 24. [CrossRef]
- ⁴ Sokolova, E. Byankina, A. O.; Kalitnik, A. A.; Kim, Y. H.; Bogdanovich, L. N.; Solov'eva, T.; Yermak, I. M. Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2014**, *102A*, 1431. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Vo, T.; Ngo, D.; Kang, K.; Jung, W.; Kim, S. The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Molecular Nutrition & Food Research* **2015**, *59*, 1299. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Wijesekara, I.; Panjestuti, R.; Kim, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 14. [CrossRef]
- ⁷ Eiras, C.; Passos, I. N. G.; Brito, A. C. F.; Júnior, J. R. S.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr, O. N. O.; Kitagawa, I. L.; Constantino, C. J. L.; Cunha, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-*o*-metoxianilina e polissacarídeos naturais. *Química Nova* **2007**, *30*, 1158. [CrossRef]
- ⁸ Viana, A. G.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, 2005. [Link]
- ⁹ Jiang, Z.; Hama, Y.; Yamaguchi, K.; Oda, T. Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyran on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *The Journal of Biochemistry* **2012**, *151*, 65. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 196. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Crouzier, T.; Boudou, T.; Picart, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15*, 417. [CrossRef]
- ¹² Vicentini, F. C.; Silva, T. A.; Pellatieri, A.; Janegitz, B. C.; Fatibello-Filho, O.; Faria, R. C. Pb(II) determination in natural water using a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. *Microchemical Journal* **2014**, *116*, 191. [CrossRef]
- ¹³ Bouabi, Y. E.; Farahi, A.; Labjar, N.; Hajjaji, S. E.; Bakasse, M.; Mhammedi, M. A. E. Square wave voltammetric determination of paracetamol at chitosan modified carbon paste electrode: Application in natural water samples, commercial tablets and human urines. *Materials Science and Engineering C* **2016**, *58*, 70. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Zhan, X.; Hu, G.; Wagberg, T.; Zhan, S.; Xu, H.; Zhou, P. Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, 723. [CrossRef]
- ¹⁵ Jian, S.; Liu, X.; Sun, H.; Hou, S. The electrochemical studies of cytochrome c incorporated in 3D porous calcium alginate films on glassy carbon electrodes. *RSC Advances* **2014**, *4*, 6165. [CrossRef]
- ¹⁶ Dai, H.; Xu, G.; Gong, L.; Yang C.; Lin, Y.; Tong, Y.; Chen, J.; Chen, G. Electrochemical detection of triclosan at a glassy carbon electrode modified with carbon nanodots and chitosan. *Electrochimica Acta* **2012**, *80*, 362. [CrossRef]
- ¹⁷ Yu, L.; Liu, Q.; Wu, X.; Jiang, X.; Yu, J.; Chen, X. Chiral electrochemical recognition of tryptophan enantiomers at a multi-walled carbon nanotube-chitosan composite modified glassy carbon electrode. *RSC Advances* **2015**, *5*, 98020. [CrossRef]

- ¹⁸ Malik, P.; Srivastava, M.; Verma, R.; Kumar, M.; Kumar, D.; Singh, J. Nanostructured SnO₂ encapsulated guar-gum hybrid nanocomposites for electrocatalytic determination of hydrazine. *Materials Science and Engineering C* **2016**, *58*, 432. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Rotariu, L.; Istrate, O.; Bala, C. Poly(allylamine hydrochloride) modified screen-printed carbon electrode for sensitive and selective detection of NADH. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *191*, 491. [CrossRef]
- ²⁰ Rice, M. E.; Galus, Z.; Adams, R. N. Graphite paste electrodes: Effects of paste composition and surface states on electron-transfer rates. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1983**, *143*, 89. [CrossRef]
- ²¹ Białk-Bielińska, A.; Stolte, S.; Arning, J.; Uebers, U.; Bösch, A.; Stepnowski, P.; Matzke, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere* **2011**, *85*, 928. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Wen, Y.; Li, J.; Zhang, W.; Chen, L. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 2131. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Calaça, G. N.; Pessoa, C. A.; Wohnrath, K.; Nagata, N. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2014**, *6*, 438. [Link]
- ²⁴ Lahcen, A. A.; Errayess, S. A.; Amine, A. Voltammetric determination of sulfonamides using paste electrodes based on various carbon nanomaterials. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, 2169. [CrossRef]
- ²⁵ D’Orazio, G.; Rocchi, S.; Fanali, S. Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: separation of sulfonamides employing non-porous core-shell particles. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1255*, 277. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Baran, W.; Adamek, E.; Ziemiańska, J.; Socczak, S. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *196*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Casella, I. G.; Contursi, M.; Gioia, D. Development of a liquid chromatography/amperometric detection method for the determination of multiresidue sulfonamide antibiotics in meat-based baby foods. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 2125. [CrossRef]
- ²⁸ Lopes, R. P.; Passos, E. E. F.; Filho, J. F. A.; Vargas, E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control* **2012**, *28*, 192. [CrossRef]
- ²⁹ Kim, H. J.; Jeong, M. H.; Park, H. J.; Kim, W. C.; Kim, J. E. Development of an immunoaffinity chromatography and HPLC-UV method for determination of 16 sulfonamides in feed. *Food Chemistry* **2016**, *196*, 1144. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Chiavarino, B.; Crestoni, M. E.; Marzio, A. D.; Fornarini, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1998**, *706*, 269. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Dmitrienko, S. G.; Kochuk, E. V.; Tolmacheva, V. V.; Apyari, V. V.; Zolotov, Y. A. Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection. *Food Chemistry* **2015**, *188*, 51. [CrossRef] [PubMed]

- ³² Rosatto, S. S.; Freire R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova* **2001**, *24*, 77-86. [CrossRef]
- ³³ Hong, X.; Zhu, Y.; Zhang, Y. Electrocatalytic response of poly(cobalt tetraaminophthalocyanine)/multi-walled carbon nanotubes-Nafion modified electrode toward sulfadiazine in urine. *Journal of Zhejiang University Science B* **2012**, *13*, 503. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Shabani-Nooshabadi, M.; Roostae, M. Modification of carbon paste electrode with NiO/graphene oxide nanocomposite and ionic liquids for fabrication of high sensitive voltammetric sensor on sulfamethoxazole analysis. *Journal of Molecular Liquids* **2016**, *220*, 329. [CrossRef]
- ³⁵ Braga, O. C.; Campestrini, I.; Vieira, I. C.; Spinelli, A. Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 813. [CrossRef]
- ³⁶ Yadav, S. K.; Choubey, P. K.; Agrawal, B.; Goyal, R. N. Carbon nanotube embedded poly 1,5-diaminonaphthalene modified pyrolytic graphite sensor for the determination of sulfacetamide in pharmaceutical formulations. *Talanta* **2014**, *118*, 96. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. *Carbohydrate Polymers* **2000**, *42*, 301. [CrossRef]
- ³⁸ Zhou, C.; Yu, X.; Zhang, Y.; He, R.; Ma, H. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 2046. [CrossRef]
- ³⁹ Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R.; *Introduction to Spectroscopy*, 4a ed., Books/Cole: Belmont, 2009.
- ⁴⁰ Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M.; *Structure determination of organic compounds: tables of spectral data*, 4a ed., Springer: Berlin, 2009.
- ⁴¹ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; *Spectrometric identification of organic compounds*, 7a ed., John Wiley & Sons: Danvers, 2005.
- ⁴² Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press: New York, 1993.
- ⁴³ Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2a ed., John Wiley & Sons: New York, 2001.
- ⁴⁴ Shamsipur, M.; Tabrizi, M. A.; Mahkan, M. Aboudi, J. A high sensitive TNT sensor based on electrochemically reduced graphene oxide-poly(amidoamine) modified electrode. *Electroanalysis* **2015**, *27*, 1466. [CrossRef]
- ⁴⁵ Wang, G.; Shi, G.; Chen, X.; Yao, R.; Chen, F. A glassy carbon electrode modified with graphene quantum dots and silver nanoparticles for simultaneous determination of guanine and adenine. *Microchimica Acta* **2015**, *182*, 315. [CrossRef]
- ⁴⁶ Lin, D.; Tang, T.; Harrison, D. J.; Lee, W. E.; Jemere, A. B. A regenerating ultrasensitive electrochemical impedance immunosensor for the detection of adenovirus. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *68*, 129. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁷ Meshki, M.; Behpour, M.; Masoum, S. Application of Fe doped ZnO nanorods-based modified sensor for determination of sulfamethoxazole and sulfamethizole using chemometric methods in voltammetric studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**, *740*, 1. [CrossRef]
- ⁴⁸ Cavalcanti, H. E.; Lima, D.; Pessôa, C. A.; Viana, A. G. Voltammetric behavior of carbon paste electrodes with native and chemical modified porphyrans. *ECS Transactions* **2014**, *61*, 37. [CrossRef]

- ⁴⁹ Zhang, Q.; Qi, H.; Zhao, T.; Deslandes, E.; Ismaeli, N. M.; Molloy, F.; Critchley, A. T. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 2447. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁰ Momberg, A.; Carrera, M. E.; Baer, D. V.; Bruhn, C.; Smyth, M. R. The oxidative voltammetric behaviour of some sulphonamides at the glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* **1984**, *159*, 119. [CrossRef]
- ⁵¹ Arvand, M.; Ansari, R.; Heydari, L. Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode. *Materials Science and Engineering C* **2011**, *31*, 1819. [CrossRef]
- ⁵² Felix, F. S.; Brett, C. M. A.; Angnes, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43*, 1622. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ Komorski-Lovrić, Š.; Lovrić, M. Square-wave voltammetry of quasi-reversible surface redox reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, *384*, 115. [CrossRef]
- ⁵⁴ Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova* **2003**, *26*, 81. [CrossRef]
- ⁵⁵ Mocak, J.; Bond, A. M.; Mitchell, S.; Scollar, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques. *Pure & Applied Chemistry* **1997**, *69*, 297. [CrossRef]
- ⁵⁶ Campestrini, I.; Braga, O. C.; Vieira, I. C.; Spinelli, A. Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine. *Electrochimica Acta* **2010**, *55*, 4970. [CrossRef]
- ⁵⁷ Almeida, S. A. A.; Heitor, A. M.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Sales, M. G. F. Sulfadiazine-selective determination in aquaculture environment: selective potentiometric transduction by neutral or charged ionophores. *Talanta* **2011**, *85*, 1508. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁸ Souza, C. D.; Braga, O. C.; Vieira, I. C.; Spinelli, V. Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *135*, 66. [CrossRef]
- ⁵⁹ Balakrishnan, V. K.; Terry, K. A.; Toito, J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction mode. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1131*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁰ Injac, R.; Kocevar, N.; Kreft, S. Precision of micellar electrokinetic capillary chromatography in the determination of seven antibiotics in pharmaceuticals and feedstuffs. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *594*, 119. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶¹ Betageri, V. S.; Kulkarni, R. M.; Shivaprasad, K. H.; Shivshankar, L. M. Kinetic spectrophotometric determination of sulfa drugs in pharmaceutical formulations. *Der Pharma Chemica* **2011**, *3*, 227. [Link]
- ⁶² Hajian, R.; Mousavi, E.; Shams, N. Net analyte signal standard addition method for simultaneous determination of sulphadiazine and trimethoprim in bovine milk and veterinary medicines. *Food Chemistry* **2013**, *138*, 2-3, 745. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶³ Sítio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 02 fevereiro 2016.

⁶⁴ *United States Pharmacopeia 30: The Official Compendia of Standards*. National Formulary 25. Rockville, 2007, p. 3234.

⁶⁵ *Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para*

Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011, p. 44.