



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA ISONIAZIDA EMPREGANDO UM
ELETRODO MODIFICADO COM 2,3-DICLORO-5,6-DICIANO-*p*-BENZOQUINONA
E GRAFENO: APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZADAS
NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.**

KAYNI CASSEA MOREIRA SOARES LIMA

São Luís – MA

2016

KAYNI CASSEA MOREIRA SOARES LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA ISONIAZIDA EMPREGANDO UM
ELETRODO MODIFICADO COM 2,3-DICLORO-5,6-DICIANO-*p*-BENZOQUINONA
E GRAFENO: APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZADAS
NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como pré-requisito para obtenção do grau de mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Silva Luz.

São Luís – MA

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Lima, Kayni Cassea Moreira Soares.

Desenvolvimento de um sensor para isoniazida empregando um eletrodo modificado com 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona e grafeno: Aplicação em formulações farmacêuticas utilizadas no tratamento da tuberculose / Kayni Cassea Moreira Soares Lima. - 2016.

90 f.

Orientador(a): Rita de Cássia Silva Luz.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2016.

1. 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona. 2. Grafeno. 3. Isoniazida. 4. Tuberculose. I. Luz, Rita de Cássia Silva. II. Título.

KAYNI CASSEA MOREIRA SOARES LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA ISONIAZIDA EMPREGANDO UM
ELETRODO MODIFICADO COM 2,3-DICLORO-5,6-DICIANO-*p*-BENZOQUINONA
E GRAFENO: APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZADAS
NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

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

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

Universidade Federal do Maranhão

Membro Titular

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima

Universidade Federal do Maranhão

Membro Titular

Profa. Dra. Rita de Cássia Silva Luz

Universidade Federal do Maranhão

Presidente

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, por seu amor, confiança e apoio sempre;
Aos meus avós, por todo cuidado e ensinamentos de vida;
Aos meus irmãos, pela convivência sempre harmoniosa e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me dar forças e saúde para nunca desistir dos meus projetos e sempre cuidar e iluminar meus caminhos;

À minha orientadora Profa. Dra. Rita Luz agradeço de forma especial por toda disponibilidade da orientação, pela paciência e por todos os ensinamentos para meu crescimento intelectual e de vida também, a sra é um exemplo de profissional e ser humano sem igual.

Agradeço também ao Prof. Dr. Flávio Damos pelo auxílio de sempre e por todo suporte no decorrer do nosso trabalho;

À minha família, em especial minha mãe Cássia, que sempre lutou para que eu e meus irmãos pudéssemos somente estudar e nos incentiva a batalhar por nossos objetivos; meus irmãos Katharine e Júnior por todo apoio e amor de sempre; e aos meus tão amados avós, Raimundo e Cleonice que sempre foram a base de nossa família;

Ao Prof. Dr. Riddvan Fernandes, pelo apoio, incentivo e carinho de sempre, mostrando-me que o melhor caminho é o dos estudos.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Sensores, por todos os momentos de aprendizagem compartilhados;

Aos meus amigos, que direta ou indiretamente sempre me deram força e muito carinho;

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFMA, que contribuíram para minha formação;

À Universidade Federal do Maranhão por toda estrutura para a realização deste trabalho;

À CAPES, pela bolsa concedida e às agências de fomento FAPEMA e CNPq pelos auxílios financeiros concedidos à pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de uma nova plataforma para a eletrocatalise de isoniazida (INH) empregando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ) adsorvido em óxido de grafeno reduzido (OGr). O eletrodo modificado (ECV/OGr/DDQ) foi coberto com um filme de náfion[®] para evitar o lixiviamento do compósito da superfície eletródica. Os materiais OGr, DDQ e OGr/DDQ foram caracterizados por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a resposta analítica do sensor para o analito foi estudada através das técnicas voltametria cíclica (CV) e amperometria. O sensor apresentou uma excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação de INH com uma diminuição do sobrepotencial cerca de 660 mV *vs* Ag/AgCl e corrente de pico anódica quatro vezes maior que a resposta observada em um eletrodo não modificado. O aumento na velocidade de reação para a INH foi atribuído à eficiente transferência eletrônica entre a espécie estudada e os materiais imobilizados na superfície do ECV. O número de elétrons determinado no processo de oxidação de INH sobre o eletrodo modificado foi igual a 2. Sob as condições experimentais e operacionais otimizadas, o sensor apresentou uma relação linear para a INH de 0,5 à 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para $n=16$ ($r^2 = 0,999$); boa sensibilidade e limite de detecção igual a 0,42 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ e 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O sensor proposto foi utilizado com sucesso para a determinação INH em amostras de medicamentos utilizadas no respectivo tratamento da tuberculose e os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação mostraram que o método proposto apresenta boa exatidão com valores de recuperação entre 98,46 e 101% para a INH.

Palavras-chave: *Isoniazida, Sensor, 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona, óxido de grafeno reduzido, tuberculose.*

ABSTRACT

The present work describes the development of a novel platform for the electrocatalysis of isoniazid (INH) employing a glassy carbon electrode (GCE) modified with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (DDQ) adsorbed on reduced graphene oxide (rGO). The modified electrode (GCE/OGr/DDQ) was covered with a Nafion® film to avoid the leaching out of the composite from electrodic surface. The materials rGO, DDQ and rGO/DDQ were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the analytical response of the sensor for the analyte was studied by cyclic voltammetry (CV) and amperometry techniques. The sensor showed excellent electrocatalytic activity for INH oxidation with a decrease in the overpotential about 660 mV vs Ag/AgCl and anodic peak current about 4 times higher than the observed response at an electrode unmodified. The increase of the reaction rate for INH was attributed to the efficient electron transfer between the studied specie and immobilized material on the surface of the GCE surface. The number of electrons determined in the INH oxidation process on the modified electrode was equal to 2. Under the optimized operational and experimental conditions, the sensor showed a wide linear range for INH from 0.5 to 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for $n = 16$ ($r^2 = 0.999$); good sensibility and limit of detection equal to 0.42 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$, and 0.15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The proposed sensor was successfully applied for INH determination in drug samples used in the tuberculosis treatment and results obtained in studies of addition and recovery showed that the proposed method has good accuracy with recovery values between 98.46 and 101 % to INH.

Keywords: *Isoniazid; Tuberculosis; Sensor; 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone; Reduced graphene oxide.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da isoniazida.....	23
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do Grafeno: átomos de carbono arranjados na forma de rede hexagonal.....	25
Figura 3 - Construção de materiais de outras dimensionalidades a partir de uma monocamada de grafeno.	26
Figura 4 - Etapas de fabricação de grafeno por CVD: após a formação do filme metálico sobre o suporte, este é aquecido e colocado em contato com uma mistura de hidrocarbonetos (fonte de carbono).	27
Figura 5 - Método de produção de grafeno por crescimento epitaxial sobre substrato de SiC, no qual os átomos de silício presentes na superfície do substrato sublimam a temperaturas elevadas, formando uma camada superficial rica em carbono, que se rearranjam formando uma camada superficial rica em carbono, que se rearranjam formando grafeno.....	28
Figura 6 - Grafite, óxido de grafite e grafeno, respectivamente, em dispersões de 1 mg em 5 mL de água.	29
Figura 7 - Estrutura química do DDQ.	30
Figura 8 - Potenciostato/galvanostato da Eco Chemie (Autolab modelo PGSTAT 128N).....	40
Figura 9 - Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas. ER= Eletrodo de referência; ET= Eletrodo de trabalho e EA= Eletrodo Auxiliar.	40
Figura 10 - Espectrofotômetro Shimadzu FT-IR Prestige 21	41
Figura 11 - Espectros FTIR do OGr (a- linha azul), o DDQ (b- linha vermelha) e o compósito OGr/DDQ (c- linha preta).	50
Figura 12 - VCs referentes ao ECV/DDQ/OGr/Náfion® (- - -) e do ECV/OGr/DDQ (----) em 0,1 mol L ⁻¹ de STF, pH 7,0. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	51
Figura 13 - (A) VCs referentes ao ECV/OGr/DDQ/Náfion® em 0,1 mol L ⁻¹ de STF em pH 7,0 para velocidades de varreduras de potencial de 0,01 – 0,20 V s ⁻¹ ; (B) gráfico de $I_p - v$ obtido a partir de (A), e (C) gráfico de $I_p - v^{1/2}$ para velocidades de varredura de 0,20 – 1,0 V s ⁻¹	53
Figura 14 - (A) VCs do: ECV/OGr/DDQ/Náfion® na ausência (1) e presença (2) de INH, ECV não modificado na ausência (3) e presença (4) de INH. (B) VCs do: ECV/DDQ/Náfion® na ausência (1) e presença (2) de INH; ECV/OGr/Náfion® na ausência (3) e presença (4) de INH. Experimentos realizados em 0,1 mol L ⁻¹ de STF, pH 7,0.	56

Figura 15 - VCs referentes ao ECV/OGr/DDQ/Náfion® na presença de 0,1 mmol L⁻¹ de INH em diferentes velocidades de varredura (0,01 – 0,2 V s⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ de STF (pH 7,0). Figura inserida: Gráfico de I_p versus v^{1/2}. 58

Figura 16 - Influência do pH sobre a corrente de pico (A) e sobre o potencial de pico (B) para a oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®. Medidas conduzidas em STF 0,1 mol L⁻¹ contendo INH (0,1 mmol L⁻¹); v = 0,05 V s⁻¹. 62

Figura 17 - Curva analítica para oxidação de INH em 0,1 mol L⁻¹ STF em pH 7,0 nas seguintes concentrações: (a) 0,5, (b) 1, (c) 5, (d) 10, (e) 20, (f) 30, (g) 40, (h) 50, (i) 70, (j) 100, (k) 130, (l) 160, (m) 200, (n) 260, (o) 320, (p) 380 μmol L⁻¹ de INH, Figura Inserida: Curva Amperométrica para a determinação de INH no eletrodo modificado com DDQ/OGr/Náfion®. E_{ap}= 0,32 V. 66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Quantidade de OGr e DDQ estudados no preparo do sensor.44
- Tabela 2** - Quantidades de OGr e DDQ imobilizadas no filme de Náfon® estudados no preparo do sensor para 1 mL de água. Medidas conduzidas em STF 0,1 mol L⁻¹ contendo INH (0,1 mmol L⁻¹); $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$60
- Tabela 3** - Influência da concentração da solução tampão sobre a corrente de pico do sensor proposto. Medidas conduzidas em solução 0,1 mmol L⁻¹ de INH em STF, pH 7,0.....63
- Tabela 4** - Influência de Eapl. sobre a resposta amperométrica do sensor proposto. Medidas conduzidas em solução 0,1 mmol L⁻¹ de INH contida em 0,1 mol L⁻¹ de STF (pH 7,0).....65
- Tabela 5** - Comparação do desempenho analítico utilizando diferentes eletrodos para determinação de INH.67
- Tabela 6** - Resultados da de INH por determinação amperometria empregando-se o ECV/OGr/DDQ/Náfon®67
- Tabela 7** - Estudo da adição e recuperação do analito nas amostras farmacêuticas contendo isoniazida.69
- Tabela 8** - Avaliação da repetibilidade das medidas obtidas com o sensor ECV/Grafeno/DDQ/Náfon® imerso em 0,1 mol L⁻¹ solução de tampão fosfato (pH 7,0) contendo 100 µmol L⁻¹ de INH. $E_{\text{apl.}}=0,32 \text{ V}$70
- Tabela 9** - Avaliação da repetibilidade das medidas obtidas com quatro sensores à base de OGr/DDQ/Náfon® imerso em 0,1 mol L⁻¹ solução de tampão fosfato (pH 7,0) contendo 100 µmol L⁻¹ de INH. $E_{\text{apl.}}=0,32 \text{ V}$70
- Tabela 10** - Avaliação da seletividade do sensor proposto em relação a possíveis interferentes encontrados em amostras farmacêuticas contendo 1 µmol L⁻¹ INH (n = 3).71
- Tabela 11** - Figuras de mérito obtidas com o método analítico proposto.73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Coeficiente de transferência eletrônica
A	Área do eletrodo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Coeficiente de regressão linear da curva analítica
C_o	Concentração do analito
C_o^*	Concentração da espécie eletroativa no seio da solução
CILE	Carbon ionic liquid electrode
D_o	Coeficiente de difusão
DDQ	(2,3-dicloro-5, 6-diciano-1, 4-benzoquinona)
ΔE	Varição de potencial
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Differential pulse voltammetry
$E_{p/2}$	Potencial de pico a meia altura
EA	Eletrodo auxiliar
ECS (SCE)	Eletrodo de calomelano saturado
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EQM's	Eletrodos quimicamente modificados
ER	Eletrodo de referência
ERGO	Electrochemically reduced graphene oxide
ET	Eletrodo de trabalho
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
Hepes	4-(2-hidroxietil)piperazina-1-ácido etanosulfônico
I	Corrente elétrica

I_{cat}	Corrente catalítica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
I_p	Corrente de pico
$I_{p/2}$	Corrente de pico à meia altura
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
n	Número de elétrons
n	Número de medições
n_a	Número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação
NF	<i>National Formulary</i>
NTC	Nanotubo de carbono
OGr	Óxido de grafeno reduzido
OMC	Ordered mesoporous carbon
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Coefficiente de correlação linear
<i>Rec.</i>	Recuperação
rGO	Reduced graphene oxide
s	Desvio padrão
sat.	Saturado
STF	Solução Tampão Fosfato
t	Tempo
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Tuberculose e Tratamento farmacológico	22
3.2	Isoniazida	23
3.3	Grafeno.....	24
3.4	2,3-Dicloro-5, 6-diciano-1, 4-<i>p</i>-benzoquinona – DDQ	29
3.5	Sensores eletroquímicos empregados para a determinação de INH.....	31
3.6	Importantes parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos	32
a)	Seletividade.....	32
b)	Linearidade	33
c)	Precisão	33
d)	Exatidão	34
e)	Limite de detecção (LOD).....	35
f)	Limite de quantificação (LOQ).....	36
g)	Sensibilidade	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Reagentes e soluções	39
4.2	Instrumentação	39
4.3	Síntese do grafeno	41
4.4	Preparo do eletrodo modificado e cálculo da área ativa do eletrodo	42
4.5	Caracterização dos componentes do sensor empregando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	43
4.6	Estudo do comportamento eletroquímico do ECV/OG_r/DDQ.....	43
4.7	Estudo do comportamento eletroquímico do ECV modificado e não modificado na ausência e presença de isoniazida.....	43

4.8 Estudos relacionados ao processo de oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®	44
4.9 Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais	44
4.9.1 Parâmetros experimentais.....	44
4.9.2 Parâmetros operacionais.....	45
4.10 Caracterização analítica do sensor para a determinação de INH	45
4.11 Preparo das amostras farmacêuticas para as medidas eletroquímicas	45
4.12 Determinação de INH em amostras farmacêuticas empregando o ECV/OGr/DDQ/Náfion® e testes de adição e recuperação (Avaliação da exatidão do sensor proposto).....	46
4.13 Estudo de interferentes.....	46
4.14 Avaliação da precisão e estabilidade do sensor	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Caracterização do compósito por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
5.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com o compósito OGr/DDQ/Náfion®.....	50
5.3 Estudo da influência da velocidade de varredura do ECV/OGr/DDQ/Náfion®	52
5.4 Eletrooxidação catalítica de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion® e influência da velocidade de varredura	53
5.5 Otimização dos parâmetros experimentais	59
5.5.1 Estudo da influência das quantidades de OGr/DDQ, do pH, tipo e concentração da solução tampão sobre a oxidação eletrocatalítica de INH	59
5.6 Parâmetros operacionais da amperometria.....	64
5.7 Caracterização analítica do sensor para a determinação de INH.....	65
5.8 Determinação de INH em formulações farmacêuticas e estudos de recuperação	67

5.9	Análise da precisão do sensor	70
5.10	Estudo de interferentes.....	71
5.11	Avaliação das figuras de mérito obtidas com o sensor proposto e considerações finais sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®	72
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	88

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A isoniazida (INH) é um dos fármacos mais antigos utilizados no tratamento da tuberculose (TB) possuindo alta especificidade contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, como também é conhecido. É provavelmente, o melhor fármaco disponível empregado no tratamento inicial da tuberculose (DEEPAK, *et al.*, 2014).

A maioria das pessoas infectadas por TB não apresenta inicialmente nenhum sintoma, ou seja, ela é uma doença assintomática, também conhecida como TB latente (LOPES, *et al.*, 2011), pois o indivíduo está contaminado, mas o mesmo não desenvolve a doença e já na TB ativa o indivíduo contaminado desenvolve a doença nos dois primeiros anos após a infecção (NOGUEIRA, *et al.*, 2012).

A TB é uma doença infecto-contagiosa transmitida principalmente pelo ar em praticamente todos os casos. Como trata-se então de uma doença “silenciosa”, existe uma maior possibilidade de transmissão entre as pessoas que convivem com indivíduos contaminados com a bactéria. A infecção ocorre a partir da inalação de gotículas contendo bacilos expelidos pela tosse, fala ou espirro do doente com tuberculose ativa de vias respiratórias (DE LIMA, 2014).

Pessoas que possuem baixa imunidade, como por exemplo as pessoas infectadas pelo HIV (do inglês *Human immunodeficiency vírus*) ou que possuem Aids, apresentam maior risco de adquirir TB, pois cerca de 30% das pessoas com HIV com TB latente acabarão evoluindo para TB ativa (LEMOS *et al.*, 2012). Isso resulta num aumento no risco de mortalidade precoce. Neste contexto, pesquisas mostram que o risco de se desenvolver TB ativa é reduzido quando pessoas co-infectadas por HIV e TB utilizam INH.

Neste sentido, percebe-se a importância do uso desse fármaco no tratamento da TB, bem como a importância deste no tratamento de pessoas que apresentam um sistema imunológico debilitado. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos analíticos que garantam o controle na qualidade da dosagem dos princípios ativos, como é o caso da INH.

O grande desafio no que diz respeito ao desenvolvimento de novos métodos analíticos é a utilização de dispositivos que permitam a detecção mais rápida do analito, que sejam seletivos, que possuam alta sensibilidade e custo acessível em comparação às técnicas geralmente utilizadas (RADOI; COMPAGNONE, 2009.).

Neste sentido destacam-se os métodos eletroanalíticos os quais possibilitam a detecção de INH através de sua oxidação eletroquímica. No entanto, a oxidação direta desse analito em eletrodos convencionais (não modificados) é cineticamente lenta e requer um elevado sobrepotencial (>900 mV), ou seja, necessita de maior energia para que o processo de oxidação do analito ocorra, e conseqüentemente o sistema apresenta baixa seletividade.

Esse é o principal problema a ser contornado para a determinação de Isoniazida por métodos eletroquímicos. Entretanto, para superar esta limitação, vários métodos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de melhorar a velocidade de transferência de elétrons, diminuir o sobrepotencial e conseqüentemente aumentar a sensibilidade e seletividade do sistema (RASTOGI *et al*, 2016).

Neste contexto, a busca por materiais à base de grafeno tem avançado nos últimos anos, devido principalmente suas propriedades mecânicas e térmicas, sendo as mesmas muito interessantes para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos (PUMERA, 2013; LIU *et al.*,2013). Visto que uma variedade de compostos orgânicos ou biomoléculas podem ser acrescidos à este derivado de carbono a fim de se obter compósitos que reúnam as melhores propriedades de cada espécie tornando o sensor mais seletivo e sensível para um determinado analito.

O grafeno tem sido utilizado combinado com catalisadores de transferência eletrônica (GUO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015) e tem aberto uma nova e interessante área em ciências de materiais nos recentes anos. O uso simultâneo deste material com outros compostos pode fornecer melhores características ao sistema, tais como, alta condutividade e boa estabilidade. Esses tipos de compósitos podem gerar atividade sinérgica sobre a atividade eletrocatalítica de filmes compósitos aumentando, principalmente, assim a seletividade e sensibilidade dos sensores ou biosensores.

Neste trabalho, o 2,3-dicloro-5, 6-diciano-1, 4-benzoquinona (DDQ), um forte agente oxidante, foi adsorvido sobre o óxido de grafeno reduzido (OGr) e então imobilizado em um filme de náfon para se obter uma nova plataforma para a oxidação eletrocatalítica e determinação de INH de forma rápida, seletiva, sensível e em baixo potencial.

Adicionalmente, embora muitos estudos sobre a oxidação eletroquímica de INH usando vários eletrodos modificados sejam bem relatados na literatura, a modificação

de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com DDQ/OG_r/Náfion[®] para a oxidação eletroquímica de INH está sendo relatada pela primeira vez.

A presente modificação tem como premissa básica aumentar a velocidade de transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e o analito em solução explorando as propriedades eletrocatalíticas do compósito para a oxidação do analito, bem como aumentar a seletividade do eletrodo base e a sensibilidade do mesmo, tornando possível não apenas a determinação de INH em medicamentos utilizados no tratamento de TB mas também em fluidos biológicos visando o monitoramento do analito frente a sua absorção no organismo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver e aplicar uma nova plataforma para estudar a oxidação eletrocatalítica de Isoniazida empregando um compósito à base de DDQ/OGr sob um filme de Náfion[®] visando a determinação do analito em medicamentos utilizados no tratamento da TB. Neste sentido, para alcançar tal objetivo os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- a. Preparar o sensor à base de OGr/DDQ;
- b. Estudar o comportamento eletroquímico do ECV modificado e não modificado na ausência e presença de INH;
- c. Caracterizar o OGr, o DDQ e o compósito OGr/DDQ empregando a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- d. Estudar o comportamento voltamétrico do ECV/OGr/DDQ na ausência e presença de Náfion[®];
- e. Investigar o processo de oxidação do analito por meio da Voltametria Cíclica (VC);
- f. Otimizar os parâmetros experimentais e operacionais para a determinação de INH, tais como, concentração da razão OGr/DDQ, pH, tipo e concentração da solução tampão, e potencial aplicado ao eletrodo de trabalho;
- g. Realizar a caracterização analítica do sensor desenvolvido;
- h. Avaliar a repetibilidade de medidas e no preparo do sensor, verificar a estabilidade do mesmo, bem como realizar estudo de possíveis interferentes;
- i. Aplicar o sensor em amostras farmacêuticas para a determinação de INH, bem como realizar estudos de adição e recuperação do analito nas amostras para avaliar a exatidão do método desenvolvido.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tuberculose e Tratamento farmacológico

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que atinge prioritariamente os pulmões, mas que pode atingir também outros órgãos do corpo humano como rins, meninges, gânglios e ossos. É uma das doenças que mais têm causado mortes em todo o mundo. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo e, por isso, é considerado um país prioritário para o controle da doença pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (DA ROCHA *et al.*, 2015; CAVALCANTI, 2009).

Pessoas com deficiência no sistema imunológico possuem maior risco de desenvolvê-la, o que explica sua alta incidência em portadores do vírus HIV. A tuberculose é a principal causa de morte nesse grupo, correspondendo a aproximadamente um em cada quatro mortes de pessoas HIV positivas (VIANA, CHELLINI, 2013).

No Brasil, a TB é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. Nos últimos 17 anos, a tuberculose apresentou queda de 38,7% na taxa de incidência e 33,6% na taxa de mortalidade. De acordo com as informações contidas no Portal da Saúde (2016) a tendência de queda em ambos os indicadores vem-se acelerando ano após ano em um esforço nacional, coordenado pelo próprio ministro, o que pode determinar o efetivo controle da tuberculose em um futuro próximo, quando a doença poderá deixar de ser um problema para a saúde pública. Segundo o Guia para o diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose (2006) elaborado pelo Hospital das Clínicas de São Paulo, a identificação rápida de novos casos de tuberculose, o isolamento adequado desses pacientes, é extremamente importante para limitar a exposição de outros pacientes e dos profissionais da saúde, principalmente quando se dispõe de recursos físicos e técnicos limitados. Falhas no reconhecimento, no isolamento e no manejo de pacientes com TB são importantes determinantes de surtos nosocomiais (infecções obtidas em ambientes hospitalares).

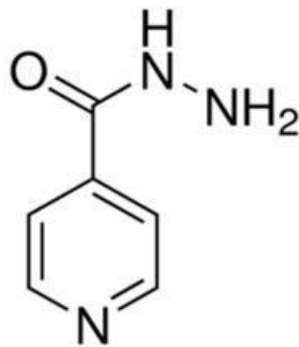
O tratamento da TB é feito através do uso de antibióticos, como por exemplo a isoniazida, ou através da associação deste com outros fármacos, e é 100% eficaz, se

realizado por um período mínimo de seis meses sem interrupção, pois os sintomas podem voltar e o bacilo, por sua vez, torna-se resistente aos medicamentos utilizados. Portanto, a melhor forma de assegurar a cura do paciente é a utilização dos princípios básicos para o tratamento, que são: associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos (DE LIMA, 2014).

3.2 Isoniazida

A isoniazida - INH (Hidrazina do ácido 4-piridinocarboxílico) é um dos fármacos mais antigo utilizado para o tratamento da TB. Possui uma das mais simples estruturas químicas (Figura 1) possuindo alta especificidade contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MASHHADI, et al., 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde, baseado nesses parâmetros, tem recomendado a administração de INH, com dose diária de até 300 mg por 6 meses a 9 meses, para a efetividade do tratamento (PINEDA et al, 2004).

Figura 1 – Estrutura química da isoniazida



FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Por recomendação da American Thoracic Society (ATS), a partir de 1965, seu uso foi introduzido também na quimioprofilaxia da TB a qual constitui-se numa medida terapêutica para a prevenção da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou para evitar o desenvolvimento da doença nos indivíduos infectados. Esta terapia geralmente baseia-se na administração de INH. Entretanto, o uso de rifampicina e pirazinamida vem sendo recentemente introduzido (COCA, 2009).

Apesar de a INH ser um medicamento geralmente bem tolerado, este pode apresentar efeitos adversos como a hepatotoxicidade e a neurotoxicidade, causados por resistência ao medicamento ou absorção/uso irregular. Estima-se que aproximadamente 5% dos indivíduos, a quem é prescrita, podem apresentar esses efeitos (COCA, 2009). Portanto, o uso regular dos medicamentos à base de INH pelo paciente é extremamente importante para um tratamento eficaz da doença. De acordo com a recomendação estabelecida pelo Ministério da Saúde/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, American Thoracic Society (ATS)/Centers for Disease Control and Prevention (CDC)/Infectious Diseases Society of America (IDSA) e Organização Mundial de Saúde (OMS), a INH é normalmente administrada em dose relativamente elevada (300mg/dia por 6 – 9 meses). (ARBEX *et al.*, 2010).

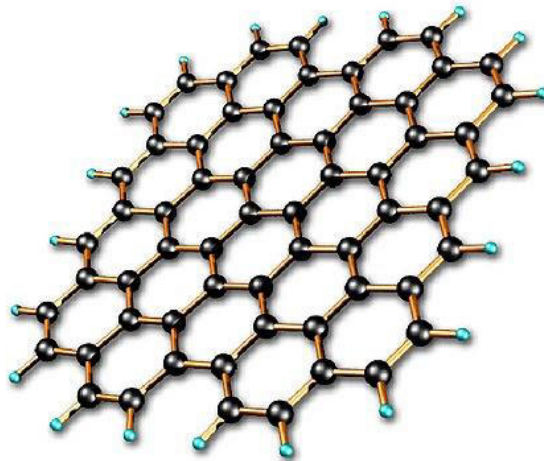
Neste sentido, torna-se necessário o controle de qualidade na dosagem dos princípios ativos nas formulações farmacêuticas porque estes devem ser comercializados como formulações seguras e terapeuticamente ativos cujo desempenho deve ser consistente e previsível. Esse controle é feito principalmente com base em indicações oficiais, como as Farmacopéias, e também através de métodos desenvolvidos e validados. É essencial o monitoramento dos insumos utilizados nas preparações farmacêuticas, sobretudo dos princípios ativos, que determina a utilização terapêutica do medicamento e se relaciona diretamente à formulação, ou seja, se a qualidade da substância ativa não for comprovada e ainda houver possibilidade de incompatibilidade com sua formulação, não se pode garantir a estabilidade do medicamento (CAVALCANTI, 2009). Várias metodologias são relatadas para a determinação de INH em formulações farmacêuticas, como por exemplo, fluorimetria (LAPA *et al.*, 2000), espectrofotometria (KAMEL 2008) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (PRAJAPATI; AGRAWAL, 2014), e mais recentemente os métodos eletroquímicos (KARIMI, *et al.* 2010; JENA, *et al.*, 2010; SATYANARAYANA, *et al.* 2014).

3.3 Grafeno

Os materiais à base de carbono constituem um grupo muito importante de nanomateriais que tem despertado grande interesse nos últimos anos devido ao potencial de aplicação que apresentam, baseando-se no fato de que propriedades da matéria dependem não só da sua composição e estrutura, como também de seu

tamanho e forma (ZARBIN; OLIVEIRA, 2013). Um importante representante deste grupo é o grafeno (Figura 2), que pode ser definido como uma monocamada bidimensional de espessura atômica, constituída por átomos de carbono hibridizados em sp^2 , unidos por ligações e arranjados na forma de uma rede hexagonal. Cada átomo de carbono do retículo tem um orbital pz não hibridizado que contribui para a formação de uma rede deslocalizada de elétrons, responsável pelas suas propriedades condutoras, térmicas, elétricas, ópticas e mecânicas extraordinárias (SMANIOTTO, 2015), o que possibilita sua aplicabilidade em diversas áreas como eletrônica, tecnologia da informação e comunicação, armazenamento de energia, catálise, sensores entre outros (RAY, 2015).

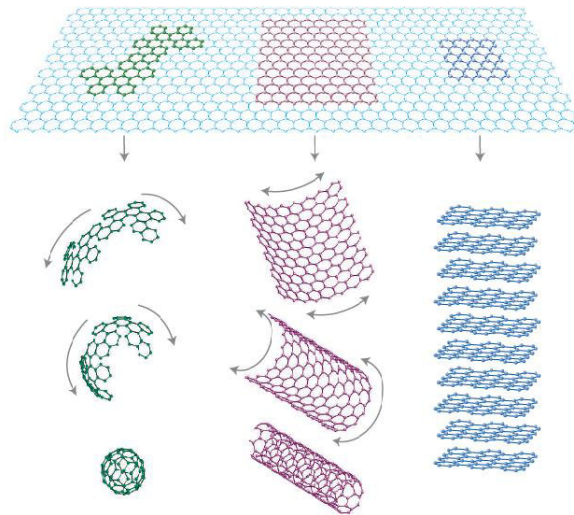
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do Grafeno: átomos de carbono arranjados na forma de rede hexagonal.



(FONTE: ZARBIN; OLIVEIRA, 2013)

Apesar de ser estudado há mais de 50 anos, foi apenas em 2004 que o grafeno foi isolado e caracterizado pela primeira vez (NOVOSELOV *et al.*, 2004; DA SILVA, 2012). Comparando-se com os nanotubos de carbono, o grafeno destaca-se por apresentar maior pureza e um custo mais acessível já que pode ser sintetizado a partir do grafite. A Figura 3 mostra os possíveis materiais obtidos a partir do grafeno com outras dimensões, como nanotubos (1D) e fulerenos (0D) (LIU, *et al.*, 2014; GEIM, NOVOSELOV, 2007)

Figura 3 - Construção de materiais de outras dimensionalidades a partir de uma monocamada de grafeno.



(FONTE: DA SILVA, 2014).

Esse novo material vem ganhando grande visibilidade não somente no campo da eletroquímica, no que tange a modificação de superfícies de eletrodos, mas como também nas áreas de eletrônica e catálise por apresentar características bastante interessantes, tais como: transporte rápido de elétrons, alta condutividade térmica e flexibilidade e alta resistência mecânica (RAY, 2015).

Outras propriedades do grafeno como transparência óptica e robustez mecânica são também motivos de sua ascensão no mundo científico, pois estes dois parâmetros são muito superiores aos dos demais alótropos do carbono (DE FREITAS, 2015).

Atualmente, as rotas mais utilizadas para a obtenção deste material são por exemplo, esfoliação mecânica do grafite, sublimação de carbetos, deposição química por fase de vapor e síntese química, obviamente que cada método de preparação do grafeno apresenta suas vantagens e limitações.

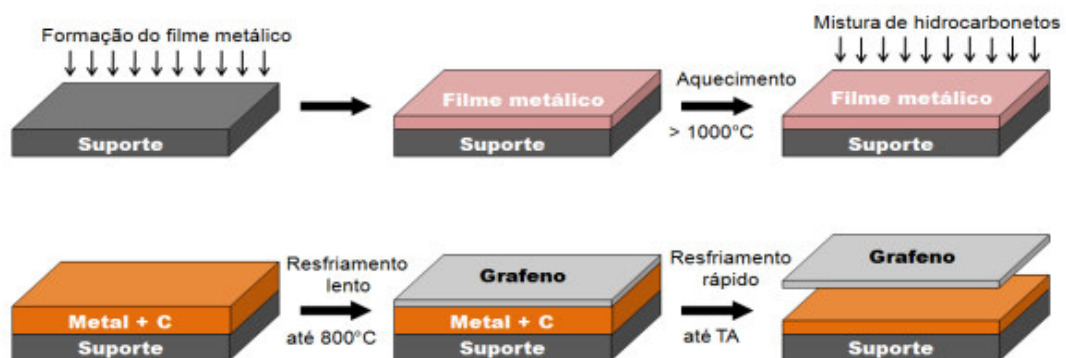
A esfoliação mecânica é considerada um processo pouco eficiente e envolve a retirada de camadas de um cristal de grafite de alta pureza com uma fita adesiva. Uma vantagem desta técnica é a possibilidade de escolher a localização da deposição do grafeno. Geralmente nesta técnica monocamadas de grafeno são depositadas em um substrato de Si/SiO₂ (camada de óxido) A principal desvantagem é que pode deixar resíduos de cola da fita adesiva na amostra, por isso, é necessária uma etapa de

tratamento térmico de redução para remover os resíduos orgânicos (DE JESUS 2012; FEIJÓ 2014).

O processo de crescimento por deposição química em fase de vapor, *Chemical Vapor Deposition* (CVD), baseia-se na produção de filmes de grafeno uniformes e de grande área sobre lâminas de cobre ou níquel sendo bastante promissora para diversas aplicações como telas sensíveis ao toque devido à condutividade, flexibilidade e transparência dos filmes (SMANIOTTO, 2014)

Este método (Figura 4) consiste no aquecimento do suporte metálico em forno conectado a um sistema de abastecimento de gás, que fornece uma mistura gasosa de hidrocarbonetos. O carbono tem a capacidade de se espalhar no metal, com elevadas temperaturas, formando uma solução sólida. Em seguida, o substrato é submetido a um resfriamento rápido. Como a solubilidade do carbono diminui com a temperatura, os átomos de carbono difundem-se para a superfície do substrato metálico organizando-se na estrutura do grafeno. Portanto, primeiramente resfria-se o suporte lentamente para que a solubilidade do carbono diminua e o direcione para a superfície. Logo após, submete-se o material a um resfriamento rápido até a temperatura ambiente para que haja o desprendimento do grafeno no suporte (DA SILVA, 2014). Entretanto, a principal desvantagem desta técnica é a transferência do filme para uma superfície dielétrica ou outro substrato de interesse, o que pode ser tão complicado quanto o próprio crescimento do grafeno (SMANIOTTO, 2014).

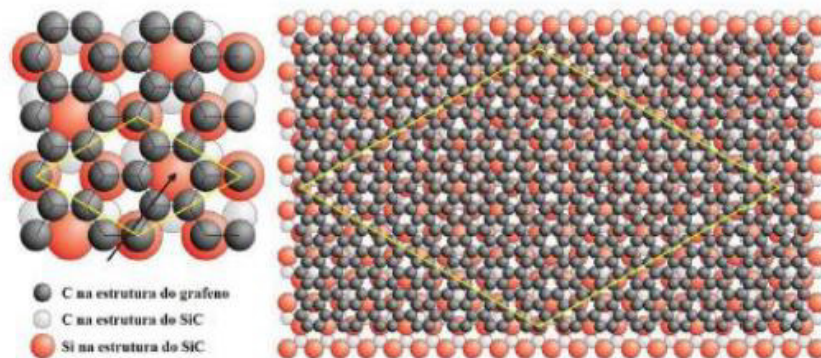
Figura 4 - Etapas de fabricação de grafeno por CVD: após a formação do filme metálico sobre o suporte, este é aquecido e colocado em contato com uma mistura de hidrocarbonetos (fonte de carbono).



(FONTE: DA SILVA, 2014).

Outro método que também fornece grafeno de alta qualidade é o crescimento epitaxial sobre pastilhas de SiC (SMANIOTTO, 2015). Esta técnica (Figura 5) consiste no tratamento térmico deste material para que ocorra a sublimação do material ligado ao carbono, o silício. Dessa forma, o carbono que sobra forma o grafeno. Embora esta técnica apresente aplicações promissoras na área da eletrônica, em especial transistores de alta frequência, apresenta limitações como o alto custo do SiC e a elevada temperatura utilizada durante o processo.

Figura 5 - Método de produção de grafeno por crescimento epitaxial sobre substrato de SiC, no qual os átomos de silício presentes na superfície do substrato sublimam a temperaturas elevadas, formando uma camada superficial rica em carbono, que se rearranjam formando uma camada superficial rica em carbono, que se rearranjam formando grafeno.



(FONTE: DA SILVA, 2014).

Dentre os vários métodos conhecidos para se obter grafeno, a rota mais viável que proporciona rendimento deste material em maior escala, é a redução química do óxido de grafeno (STANKOVICH, *et al.*, 2006). Esta técnica, consiste na oxidação de grafite formando o óxido de grafite (GO). As porções oxigenadas presentes nesse material tornam o GO produzido mais fácil de ser disperso em água. Quando este óxido é misturado à água utilizando banho de ultrassom, a estrutura tridimensional do GO se desfaz, e obtêm-se dispersões estáveis de coloração marrom (Figura 6), constituída de folhas individuais do chamado óxido de grafeno (OG). Estas dispersões posteriormente são reduzidas, utilizando-se diversos agentes redutores como a hidrazina e o borohidreto de sódio. Após a redução o produto formado é denominado grafeno, ou mais especificamente, óxido de grafeno reduzido (OGr). O elevado rendimento, juntamente com o baixo custo em relação aos outros métodos, torna a esfoliação do grafite um método vantajoso para a obtenção de OGr. Entretanto, vários

grupamentos oxigenados permanecem na estrutura do grafeno, além de defeitos na rede, o que significa amostras com baixa qualidade estrutural (NUNES, 2013; MEHL *et al.*, 2014).

Figura 6 - Grafite, óxido de grafite e grafeno, respectivamente, em dispersões de 1 mg em 5 mL de água.



(FONTE: NUNES 2013)

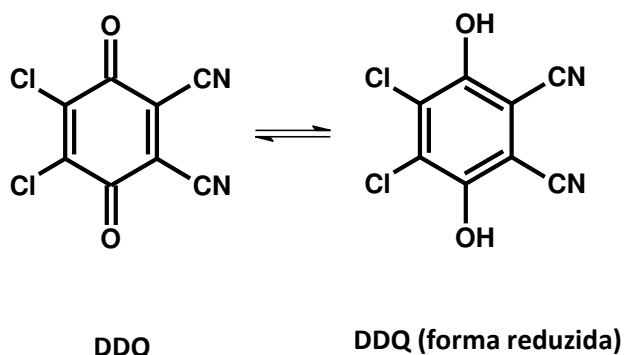
A associação do grafeno com outros materiais, tais como alguns compostos orgânicos, tem despertado o interesse de um grande número de pesquisadores, principalmente no que diz respeito ao campo de sensores eletroquímicos, onde o desenvolvimento de novos materiais ou novas plataformas para a oxidação ou redução de moléculas podem proporcionar características extremamente importantes tais como maior sensibilidade e seletividade ao sistema desenvolvido. A seguir descreve-se um pouco sobre a molécula utilizada nesse trabalho a qual foi associada ao óxido de grafeno reduzido focando no desenvolvimento de uma nova plataforma para a oxidação de INH, e posterior quantificação em amostras farmacêuticas.

3.4 2,3-Dicloro-5, 6-diciano-1, 4-*p*-benzoquinona – DDQ

As quinonas constituem um grupo importante de receptores de elétrons, que dão origem a complexos de transferência de carga com vários doadores, e são derivados de compostos aromáticos como benzeno, naftaleno e antraceno. A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições “*orto*” (adjacentes) ou “*para*”. Utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que contém o anel, as quinonas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (SOUSA, 2012).

O estudo de quinonas por suas interações de transferência de carga é decorrente do importante papel que possuem no campo biológico (REFAT, MOHAMED, 2013). Dentre as quinonas, o DDQ (2, 3-dicloro-5, 6-diciano-1, 4-benzoquinona) (Figura 7) é um forte agente oxidante e comumente conhecido como receptor um bom de elétrons utilizado na indústria de síntese química. Ele está, também, envolvido em processos de armazenamento e utilização de energia, desempenhando um papel vital nas reações biológicas. Devido à importância de DDQ como um famoso e eficiente “aceitador”, os seus complexos de transferência de carga e interações com formulações farmacêuticas têm sido o assunto de estudos extensivos com diferentes dadores (HABEB *et al.*, 2015).

Figura 7 - Estrutura química do DDQ.



(FONTE: PRÓPRIO AUTOR)

No presente trabalho um eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado com óxido de grafeno reduzido (OGr), DDQ e um filme de Náfion[®] cujo material foi denominado (OGr/DDQ/Náfion[®]) o qual foi desenvolvido a fim de somar as propriedades do OGr com as da quinona para facilitar ainda mais a transferência eletrônica entre a INH e a superfície do eletrodo modificado.

3.5 Sensores eletroquímicos empregados para a determinação de INH

Na literatura são reportados vários tipos de sensores eletroquímicos empregados na determinação de INH em diferentes tipos de amostras, conforme será descrito nos trabalhos a seguir.

Yan e colaboradores (2011) modificaram a superfície de um ECV com uma dispersão de carbono mesoporoso em Náfion (OMC-Náfion) para a determinação de INH. O analito apresentou um pico de oxidação em cerca de 0,4 V em tampão fosfato pH 7. As correntes de pico anódicas apresentaram uma relação linear numa faixa de concentração de INH entre 1×10^{-7} à $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, no potencial de 0,2 V utilizando amperometria. O limite de detecção foi $8,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Este método foi aplicado em formulações farmacêuticas.

Absalan e colaboradores (2016) investigaram a eficiência da oxidação eletrocatalítica de INH em um eletrodo de carbono e líquido iônico (CILE) modificado por eletropolimerização de nanopartículas de Paládio (PdNPs), utilizando a técnica de voltametria cíclica e a eficiência da eletrodeposição das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura. Um gráfico de calibração linear foi obtido nas faixas de concentração de INH entre 5×10^{-6} a 1×10^{-4} mol L⁻¹ e de $1,5 \times 10^{-4}$ a $2,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O limite de detecção foi de $4,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e o sensor proposto foi aplicado em amostras de sangue e formulações farmacêuticas.

Zhu e colaboradores (2015) desenvolveram um outro sensor para a determinação de INH modificando um ECV com filmes de óxido de grafeno parcialmente reduzido (ERGO) pela redução do óxido de grafite (GO) em tampão fosfato pH 7,0 utilizando varreduras sucessivas numa faixa de potencial entre -1,5 V a 0 V vs SCE. O coeficiente de transferência eletrônica e o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação foram obtidos através de abordagens eletroquímicas. Foi possível observar uma relação linear dos valores de corrente de pico anódicas de INH com as concentrações de INH numa faixa entre 9×10^{-8} mol L⁻¹ a 1×10^{-3} mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O sensor proposto para determinação de INH foi aplicado em amostras de formulações farmacêuticas e apresentou respostas satisfatórias.

3.6 Importantes parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos

Novos métodos analíticos devem apresentar dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação. Validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica, bem como é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BARROS, 2002).

As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, as mais comumente descritas na literatura especializada são: seletividade, faixa de linearidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez (RIBEIRO et al, 2008). No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos – a Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2007, respectivamente. Os guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida, sendo intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (KRULL; SWARTZ, 1998). Uma breve definição dos parâmetros de validação será descrito a seguir:

a) Seletividade

A seletividade de um método refere-se à sua capacidade em avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Assim, a seletividade garante que a resposta obtida seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN et al., 2001). A seletividade é o passo primordial no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser avaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. (GRANGEIRO JÚNIOR et al., 2004).

b) Linearidade

A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada (ICH, 2005; VALENTINI, 2007). Havendo uma relação linear, os resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como por exemplo, o método dos mínimos quadrados (VALENTINI, 2007).

c) Precisão

A precisão é utilizada para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra sob as condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2007). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ) de um número significativo de medidas. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), de acordo com a equação 1:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

Onde \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de μ , a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável, calculada pela equação 2:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

Em que t_{n-1} corresponde ao valor crítico de *Student* com $n-1$ graus de liberdade. O valor de t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variância (CV) dada pela equação 3.

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Pode ser considerada em três níveis diferentes: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois níveis (SOARES SOBRINHO et al., 2005).

A repetitividade ou repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2007). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações, e pode ser expressa através da estimativa do DPR.

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (INMETRO, 2007). A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias.

d) Exatidão

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação (BARROS, 2002). Os procedimentos utilizados normalmente para avaliar a exatidão de um método são: a comparação com materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007).

Os materiais de referência certificados (MRC) são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os MRC são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (*National Institute of Standards and Technology* – Estados Unidos), LGC (*Laboratory of the*

Government Chemist – Reino Unido), USP (*United States Pharmacopeia* – Estados Unidos), etc.

A avaliação da exatidão do método a partir da comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, em que é avaliado o grau de proximidade entre os resultados obtidos por ambos. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida (RIBANI *et al.*, 2004).

A recuperação é definida como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é passível de ser quantificada (THOMPSON *et al.*, 1999). A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*) em pelo menos três concentrações diferentes. Segundo INMETRO (2007), a recuperação pode ser calculada pela equação 4:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{c_1 - c_2}{c_2} \times 100 \quad (4)$$

Onde C_1 corresponde à concentração determinada na amostra adicionada e C_2 à concentração determinada na amostra não adicionada.

e) Limite de detecção (LOD)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção (BRITO *et al.* 2003). O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. Segunda a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (CURRIE, 1995), o LOD pode ser calculado através dos parâmetros da curva analítica, e ser expresso pela equação 5:

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{s}{b} \quad (5)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão das respostas do branco e b é a inclinação (*slope*) ou coeficiente de regressão angular da curva analítica.

f) Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (BRITO et al 2003). Segundo a IUPAC (CURRIE, 1995), o LOQ pode ser calculado através dos parâmetros da curva analítica, e ser expresso de acordo com equação 6:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{b} \quad (6)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão das respostas do branco e b é a inclinação (*slope*) ou coeficiente de regressão angular da curva analítica. Após ter sido determinado, o valor deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias.

g) Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (AMARANTE *et al.*, 2001). Do ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico (CAUSON, 1997; CURRIE, 1995).

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Este critério expressa a capacidade de o procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

Todos os parâmetros descritos acima foram avaliados com o objetivo de verificar se o sensor proposto pode ser validado para ser utilizado como uma nova alternativa ou um novo método para a determinação de isoniazida.

PARTE EXPERIMENTAL

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos utilizados no presente trabalho foram de grau analítico. A isoniazida (INH), o DDQ, o Dimetil sulfóxido (DMSO), o 4-(2-hidroxietil) piperazina-1 (Hepes), o sulfato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$), os ácidos etanosulfônico, ácido clorídrico, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, pó de grafite e uma solução de Náfion[®] (solução em isopropanol à 5%) foram adquiridos da Sigma Aldrich[®], (St. Louis, EUA). O hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil. O fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) foi adquirido da Dinâmica[®] Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil. O grafeno foi sintetizado no Laboratório de Eletroquímica da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. As soluções-padrão de INH foram preparadas diariamente com diluição apropriada das soluções-estoque com água deionizada.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em um sistema OS100LXE adquirido da Companhia GEHAKA (Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com resistividade maior ou igual a 18.2 M Ω . Para o ajuste do pH das soluções-tampão, utilizou-se um pHmetro QUIMIS modelo Q400AS e ajustado com soluções 0,1 mol L⁻¹ de HCl ou 0,2 mol L⁻¹ de NaOH.

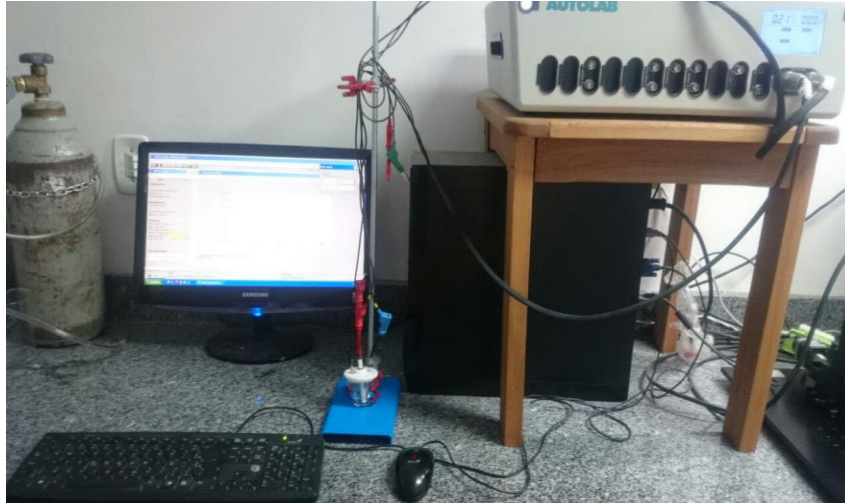
As cápsulas contendo isoniazida foram cedidas por um posto de saúde local. As mesmas foram fabricadas por dois laboratórios diferentes.

4.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab[®] modelo PGSTAT 128 N da *Echo Chemie* (Utrecht, The Netherlands) (Figura 8), acoplado a um microcomputador com o *software* GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

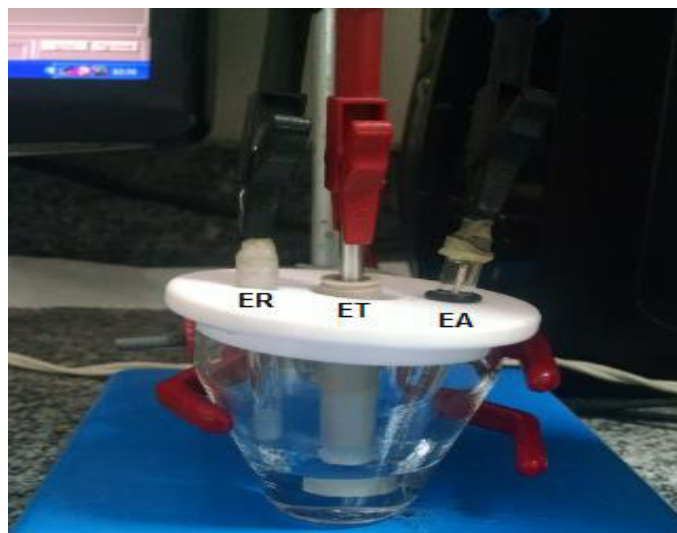
As respostas eletroquímicas de potenciais e correntes de pico foram obtidas pelas técnicas de Voltametria cíclica (VC) e Amperometria.

Figura 8 - Potenciostato/galvanostato da Eco Chemie (Autolab modelo PGSTAT 128N)



Para obtenção das medidas, o sistema foi constituído por uma célula eletroquímica com capacidade de 10,0 mL com furos para entrada de eletrodos em uma tampa de Teflon[®]. O eletrodo de trabalho utilizado foi de eletrodo de carbono vítreo (ECV). Os eletrodos auxiliar e de referência foram constituídos, respectivamente, por um fio de ouro e por Ag/AgCl (sat.), contendo 3 mol L⁻¹ de KCl (Figura. 9).

Figura 9 - Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas. ER= Eletrodo de referência; ET= Eletrodo de trabalho e EA= Eletrodo Auxiliar.



Os espectros no infravermelho na região de 500 à 4000 cm^{-1} foram registrados utilizando-se um Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo FT- IR Prestige-21 conforme mostrado na (Figura 10), instalado na Central Analítica da Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão.

Figura 10 - Espectrofotômetro Shimadzu FT-IR Prestige 21



4.3 Síntese do grafeno

O óxido de grafite (OG) foi preparado de acordo com (Ferreira *et al.*, 2013) utilizando uma modificação do método de Hummers e Offeman. Resumidamente, 500 mg de grafite, 500 mg de NaNO_3 , e 23 mL de H_2SO_4 foram mantidas sob agitação em um banho de gelo. Em seguida, 3 g de KMnO_4 foi lentamente adicionada à dispersão previamente preparada. Em seguida, a solução foi transferida para um banho de água a 35 °C e agitou-se durante 60 min até formar uma pasta espessa, e 40 mL de água foi adicionada a mistura reacional mantendo-se sob agitação durante 30 min, enquanto aumentava-se a temperatura para 90 °C. Finalmente, 0,1 L de água foi adicionada à mistura, seguido por uma adição gota a gota de 3 mL de H_2O_2 (30%), o que alterou a cor da solução de castanho escuro para amarelo. A dispersão foi então filtrada e o sólido foi lavado com 0,1 L de água. O resíduo do filtro foi disperso em água por agitação mecânica e foi centrifugado em baixa velocidade durante 2 min. O processo anterior foi repetido até que todas as partículas visíveis de OG fossem

removidas a partir da solução. O sobrenadante foi submetido a centrifugação de alta velocidade (8000 rpm) durante 15 min para remover pequenos particulados solúveis em água. O sedimento final foi disperso novamente em água com agitação mecânica suave utilizando um banho de ultrassom, obtendo-se uma solução de OG esfoliada. O óxido de grafite obtido (0,5 g) disperso em 500 mL de água deionizada, foi esfoliado como óxido de grafeno sob tratamento de ultrassom durante 1 h. A dispersão homogênea resultante foi misturada com 10 mL de água, 10 mg de uma solução de hidrazina (35% em peso em água, contendo 2,8 mg de hidrazina) e 35,0 mL de solução de amoníaco (28% em peso em água). Depois de ser vigorosamente agitada durante 30 min, foi mantido num banho de água (95°C) durante 1 h. A mistura resultante foi filtrada e lavada para obter o óxido de grafeno reduzido (LIMA *et al*, 2016).

4.4 Preparo do eletrodo modificado e cálculo da área ativa do eletrodo

Previamente à modificação, a superfície do ECV foi preparada através da renovação de sua superfície com alumina de forma a promover uma limpeza prévia do eletrodo lavando-se em seguida a fim de remover qualquer material aderido. Após a limpeza do eletrodo, uma suspensão foi preparada pela mistura de 3,0 mg de OGr e 1 mg de DDQ em 1 mL de DMSO. Em seguida, 10 µL desta suspensão foi adicionada diretamente sobre a superfície do ECV e deixado a secar a 70 °C durante 30 min. Após a secagem do eletrodo, adicionou-se 10 µL da solução de Náfion® diretamente sobre a superfície do eletrodo. O eletrodo modificado foi denotado como ECV/OGr/DDQ/Náfion®.

A área efetiva da superfície do eletrodo modificado foi estimada como descrito por (SiSWANA *et al.*, 2006) usando o ferricianeto $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica, aplicando a teoria de Randles Sevcik (WANG, 1994; BARD; FALKNER, 2001). A equação a seguir foi utilizada para o cálculo da área do eletrodo:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D_o^{1/2} \nu^{1/2} \quad (7)$$

Onde I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons envolvidos na reação do ferricianeto; A é a área efetiva do eletrodo modificado em cm^2 ; C é a concentração em mol cm^{-3} de ferricianeto que foi de $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ preparado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de

Cloreto de potássio (KCl); D é o coeficiente de difusão do ferricianeto em solução aquosa ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (BARD; MIRKIN, 2012) e ν é a velocidade de varredura, a qual foi variada nas velocidades 0,01, 0,025, 0,050, 0,075 e 0,10 V s^{-1} .

4.5 Caracterização dos componentes do sensor empregando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de caracterizar os materiais por FTIR, registrou-se espectros na região de 500 à 4000 cm^{-1} para o OGr, para o DDQ e para o compósito OGr/DDQ. Para tanto, os materiais foram prensados em pastilhas de KBr a 1% para posterior análise.

4.6 Estudo do comportamento eletroquímico do ECV/OGr/DDQ

Com a finalidade de conhecer e comparar a intensidade dos sinais analíticos obtidos, o comportamento eletroquímico do ECV/OGr/DDQ foi avaliado por voltametria cíclica (VC) na ausência e presença do filme de Náfion[®]. Nesse caso, não houve adição de isoniazida (INH) na solução tampão utilizada.

4.7 Estudo do comportamento eletroquímico do ECV modificado e não modificado na ausência e presença de isoniazida

O comportamento eletroquímico do ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] foi avaliado por voltametria cíclica (VC) na ausência e presença de INH. Para fins de comparação, também foram obtidos os VCs do ECV não modificado e o ECV modificado com OGr e Náfion[®], o qual foi denotado como ECV/OGr/Náfion[®] e o ECV modificado com DDQ e Náfion[®], o qual foi denotado como ECV/DDQ/Náfion[®]. Todos esses eletrodos foram testados, na ausência e presença de 0,1 mmol L^{-1} de INH em solução 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (STF), pH 7,0, e velocidade de varredura, ν , de 0,05 V s^{-1} .

4.8 Estudos relacionados ao processo de oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®

Informações adicionais sobre a oxidação de INH sobre a superfície do ECV/OGr/DDQ/Náfion® foram adquiridas através da avaliação de VCs obtidos em diferentes velocidades de varredura v , (0,01 - 0,25 V s⁻¹) utilizando-se 5 mL do eletrólito suporte (solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,0, contendo 0,1 mmol L⁻¹ de INH).

4.9 Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais

Para melhor desempenho do sensor proposto, os parâmetros experimentais e operacionais do sistema que influenciam a sensibilidade da técnica, a estabilidade e o perfil da resposta analítica foram investigados e otimizados. A VC foi a técnica utilizada para a otimização dos parâmetros experimentais.

4.9.1 Parâmetros experimentais

Um ECV foi polido com uma suspensão de alumina de diâmetro 0,05 μm e enxaguado com água deionizada. Após a limpeza do eletrodo, uma suspensão de OGr/DDQ/Nafion® foi preparada com 3 mg de OGr e 1 mg de DDQ em 1 mL de DMSO. A Tabela 1 mostra outras proporções previamente estudadas para a detecção de INH.

Tabela 1 - Quantidade de OGr e DDQ estudados no preparo do sensor.

Proporção (m/m)	
OGr	DDQ
1 mg	1 mg
1 mg	2 mg
1 mg	3 mg
1 mg	4 mg
2 mg	1 mg
3 mg	1 mg
4 mg	1 mg

Após a verificação de quais concentrações de DDQ e OGr proporcionavam melhor resposta analítica, variou-se o pH da solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo INH, nos valores de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0, 7,5 e 8,0 para se estudar a influência do pH do meio sobre a resposta do sensor. Logo em seguida, verificou-se também o sinal analítico referente à detecção de INH nos tampões Fosfato, MacIlvaine, Hepes e Britton-Robinson, todos no mesmo valor de pH otimizado.

4.9.2 Parâmetros operacionais

Para a construção da curva analítica foi empregada a técnica Amperometria. Para tanto, otimizou-se o potencial aplicado, E_{apl} , para a oxidação do analito. Os potenciais estudados foram: 0,28; 0,30; 0,32; 0,34; 0,36 e 0,38 V *vs* Ag/AgCl, empregando-se a solução tampão nas condições otimizadas.

4.10 Caracterização analítica do sensor para a determinação de INH

Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais, construiu-se uma curva analítica de corrente de pico anódica (I_{pa}) em função da concentração de INH para a determinação deste analito. Além dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), obteve-se também a sensibilidade da curva analítica.

4.11 Preparo das amostras farmacêuticas para as medidas eletroquímicas

Duas amostras em cápsulas contendo INH, produzidas pelos Laboratórios A e B, foram adquiridas em um posto de saúde do Estado do Maranhão. O rótulo das duas amostras apresentava um valor de 200 mg para a INH e 300 mg de rifampicina. O sensor proposto foi testado para a determinação de INH nas duas amostras após as mesmas serem preparadas de acordo com o seguinte procedimento: o conteúdo de cada cápsula de uma amostra foi pesado e solubilizado em água deionizada. A solução foi filtrada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico e diluída até um volume final de 500 mL. Uma alíquota de 10 μL de cada amostra foi adicionada à célula eletroquímica contendo 5 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0) para posterior análise.

4.12 Determinação de INH em amostras farmacêuticas empregando o ECV/OGr/DDQ/Náfion® e testes de adição e recuperação (Avaliação da exatidão do sensor proposto)

A quantidade de INH nas amostras farmacêuticas foi determinada pelo método de adição padrão, utilizando-se 5,0 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0) contidos na célula eletroquímica, onde foram realizadas adições sucessivas do analito (0,0; 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 160,0 µL) nas amostras a partir de uma solução padrão estoque 5 mmol L⁻¹ de INH. Construiu-se então uma curva analítica relacionando às concentrações da substância adicionada à célula contendo a amostra com os respectivos sinais analíticos obtidos. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde ao sinal analítico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada. Os resultados finais da quantidade de INH em cada amostra do medicamento foram expressos como o valor médio de três determinações.

Os testes de adição e recuperação do analito foram realizados em uma célula eletroquímica contendo 5,0 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), onde foram adicionados uma quantidade conhecida do analito na amostra e, em seguida, volumes crescentes e conhecidos de solução padrão estoque 5 mmol L⁻¹ de INH. A porcentagem de recuperação foi dada pela razão entre a concentração do analito (amostra + padrão adicionado) encontrada e a concentração total esperada multiplicada por 100. Os testes de adição e recuperação foram realizados em triplicata para maior confiabilidade dos resultados. É importante ressaltar que todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente.

4.13 Estudo de interferentes

A interferência de espécies químicas que podem ser encontradas nas formulações farmacêuticas ou mesmo em amostras biológicas, tais como ácido ascórbico, hidrazina, tiosulfato, rifampicina e estearato de magnésio, foi verificada, através da medida da intensidade de sinal analítico para uma solução que continha INH numa concentração conhecida, com posterior comparação desse sinal com o

sinal obtido em solução contendo o analito e o interferente na proporção 1:100. O estudo foi realizado nas condições experimentais e operacionais otimizadas e as medidas foram realizadas em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

4.14 Avaliação da precisão e estabilidade do sensor

A precisão do sensor foi avaliada pela repetibilidade das medidas e pela reprodutibilidade no preparo de diferentes sensores preparados em dias diferentes. A repetibilidade foi avaliada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) dos valores de corrente para medidas voltamétricas realizadas no mesmo dia, bem como para quatro sensores preparados em dias diferentes. Para este último também foi calculado o DPR entre os valores de corrente dos voltamogramas obtidos.

A estabilidade do eletrodo modificado com o compósito OGr/DDQ/Náfion® foi avaliada realizando-se 100 medidas amperométricas referente à oxidação de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INH sobre o eletrodo modificado. Além disso, o sensor foi testado num período de 30 dias para avaliação da sua resposta analítica. Estes estudos foram realizados empregando-se as condições experimentais e operacionais otimizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

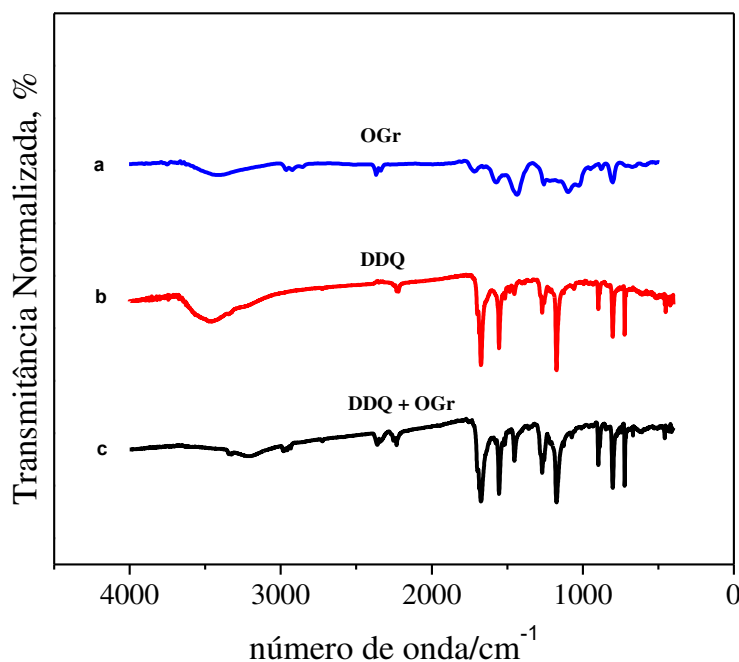
Os resultados a serem discutidos são referentes à caracterização do compósito OGr/DDQ/Náfiion® empregando a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, à caracterização eletroquímica do sensor proposto, à otimização de parâmetros experimentais e operacionais, à caracterização analítica do sensor, aplicação do sensor em amostras farmacêuticas e à validação do método analítico proposto através da análise das figuras de mérito pertinentes.

5.1 Caracterização do compósito por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Estudos por FTIR foram realizados a fim de analisar as possíveis interações entre o OGr e o DDQ. Neste sentido, obteve-se espectros do óxido de grafeno reduzido (OGr) (Figura 11a) que mostram uma banda de pico em 3500 cm^{-1} na região de alta frequência e um pico em 1600 cm^{-1} correspondendo à deformação de grupos OH das moléculas de água adsorvidas sobre o OGr (GUO *et al.*, 2009). Os picos de absorção em 2930 e 2859 cm^{-1} representam o estiramento de vibrações correspondentes à grupos de CH_2 , enquanto que os dois picos observados na região de frequência em 1630 cm^{-1} e 740 cm^{-1} podem ser atribuídos ao estiramento da vibração de grupos $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos e grupos carbonila presentes no grafeno (SHAHRIARY; ATHAWALE, 2014). Finalmente, os picos em 1385 e 1110 cm^{-1} são correspondentes aos estiramentos de vibração $\text{C}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{OH}$, respectivamente.

A presença destes grupos contendo oxigênio revela que o grafite foi realmente oxidado e que mesmo após a redução do óxido de grafeno com a hidrazina ainda há permanência de grupos oxigenados na superfície do mesmo. Os grupos polares, especialmente os grupos hidroxila, resultam da formação de ligações do hidrogênio com as moléculas de água e do grafite; isto explica ainda mais a natureza hidrofílica do óxido de grafeno (SHAHRIARY; ATHAWALE, 2014). As bandas observadas no espectro para o DDQ (Figura 11b) correspondem às vibrações dos grupos específicos presentes na estrutura molecular do DDQ (REFAT *et al.*, 2013).

Figura 11 - Espectros FTIR do OGr (a- linha azul), o DDQ (b- linha vermelha) e o compósito OGr/DDQ (c- linha preta).



O espectro obtido para o compósito OGr/DDQ (Figura 11c) indica que a modificação do grafeno pelo DDQ ocorreu por meio de um processo físico de adsorção, uma vez que as bandas características de compostos observados na Figura 11a e 11b foram novamente observadas após a modificação do grafeno sem o aparecimento de novas bandas no espectro do compósito.

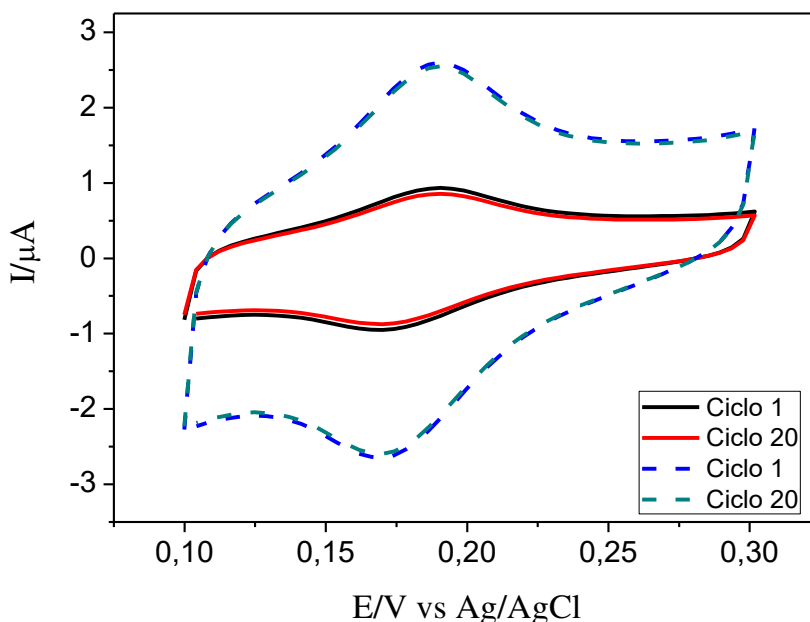
5.2 Comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com o compósito OGr/DDQ/Náfion[®]

Inicialmente, foram preparados dois eletrodos: o primeiro foi um ECV modificado com OGr/DDQ denominado ECV/OGr/DDQ e o segundo foi um ECV modificado com OGr/DDQ imobilizado em um filme de Náfion[®], o qual foi denominado ECV/OGr/DDQ/Náfion[®]. Após a preparação dos sensores, cada eletrodo foi lavado para remover as moléculas não-adsorvidas. Após esta etapa, 20 sucessivos voltamogramas cíclicos (VCs) foram realizados num intervalo de potencial entre 0,1 e

0,3 V v_s Ag/AgCl, utilizando-se uma solução tampão fosfato (STF), pH 7,0 e foi verificado que ambos os eletrodos apresentaram boa estabilidade.

A Figura 12 mostra os VCs referentes ao primeiro e ao vigésimo ciclo do ECV/OGr/DDQ realizado na presença (- - -) e ausência (—) do filme de Náfion[®]. O eletrodo que continha o filme de Náfion[®] (ECV/OGr/DDQ/Náfion[®]) apresentou correntes de pico de cerca de 10 vezes maiores que as correntes de pico observada para o eletrodo modificado sem o filme de Náfion[®] (ECV/OGr/DDQ) (Figura 12), o que indica que o filme é muito importante para fixar uma quantidade maior do material compósito OGr/DDQ na superfície do eletrodo de uma forma estável. Neste sentido, para todos os outros estudos realizados com o sensor utilizou-se o filme de Náfion[®] sobre o material compósito OGr/DDQ.

Figura 12 - VCs referentes ao ECV/DDQ/OGr/Nafion[®] (- - -) e do ECV/OGr/DDQ (-----) em 0,1 mol L⁻¹ de STF, pH 7,0. $v = 0,05$ V s⁻¹.



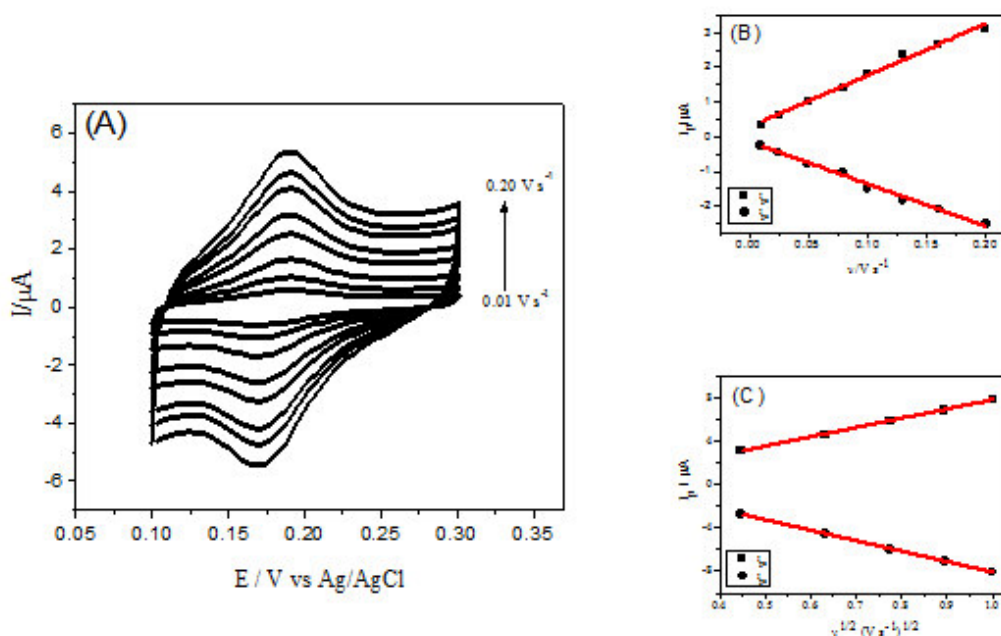
Como pode ser observado, os VCs exibem picos referentes aos processos de oxidação ($E_{pa} = 190$ mV) e redução do DDQ ($E_{pc} = 170$ mV), ou seja, a forma reduzida do DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) passa para a forma oxidada (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-hidroquinona) com uma diferença de potencial entre o pico anódico e catódico ($\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$) de 20 mV caracterizando um processo que apresenta alta reversibilidade.

Para o cálculo da área do eletrodo realizou-se voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em diferentes velocidades de varredura (de 10 a 100 mV s⁻¹) utilizando-se o KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte contendo ferricianeto 0,5 mol cm⁻³ e, a partir desses voltamogramas cíclicos obteve-se o gráfico de I_p versus $v^{1/2}$ cuja equação da reta foi $Y(\mu A) = 2,5 + 92,67 X(\mu mol L^{-1})$ com $r^2=0,999$. Substituindo-se o coeficiente angular dessa reta na equação 7 ($I_p=2,69 \times 10^5 n^{3/2}ACD_o^{1/2}v^{1/2}$) foi possível calcular o valor da área efetiva do eletrodo a qual foi de 0,25 cm².

5.3 Estudo da influência da velocidade de varredura do ECV/OGr/DDQ/Náfon®

A Figura 13A mostra os VCs obtidos com o ECV/OGr/DDQ/Náfon® em STF, pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura de potencial (0,01 a 0,1 V s⁻¹). Como pode ser observado, os VCs exibem picos anódicos relacionados à oxidação/redução do DDQ. As correntes de pico (anódicas e catódicas) obtidas a partir da Figura 13A, foram diretamente proporcionais à velocidade de varredura de 0,01 V s⁻¹ a 0,20 V s⁻¹, conforme mostrado na Figura 13B, caracterizando um sistema adsortivo. Em velocidades de varredura superiores à 0,20 V s⁻¹, as correntes de pico foram proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 13C), indicando um processo redox controlado por difusão, o qual pode estar relacionado com a limitação da difusão dos contra-íons dentro do eletrodo modificado para manter a eletroneutralidade do eletrodo.

Figura 13 - (A) VCs referentes ao ECV/OGr/DDQ/Náfon® em 0,1 mol L⁻¹ de STF em pH 7,0 para velocidades de varreduras de potencial de 0,01 – 0,20 V s⁻¹; (B) gráfico de $I_p - \nu$ obtido a partir de (A), e (C) gráfico de $I_p - \nu^{1/2}$ para velocidades de varredura de 0,20 – 1,0 V s⁻¹.



5.4 Eletrooxidação catalítica de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfon® e influência da velocidade de varredura

O comportamento voltamétrico de INH foi verificada em diferentes eletrodos na faixa de potencial de 0,1 a 1,1 V *vs* Ag/AgCl em 0,1 mol L⁻¹ de STF, pH 7,0. Neste sentido, a fim de estudar a atividade electrocatalítica do ECV/OGr/DDQ/Náfon®, VCs foram obtidos na ausência (Figura 14A, curva 1) e presença de 0,1 mmol L⁻¹ de INH (Figura 14A, a curva 2) e comparados com os voltamogramas do eletrodo não modificado na ausência (Figura 14A, curva 3) e presença de 0,1 mmol L⁻¹ de INH (Figura 14A, curva 4). Na Figura 14A, curva 1, um par redox bem definido pode ser observado referente ao processo redox do DDQ_(oxi) /DDQ_(red). Após a adição de 0,1 mmol L⁻¹ de INH, é possível observar que ocorre um aumento significativo da corrente de pico anódica e desaparecimento, quase que completo, da corrente de pico catódica (Figura 14A, curva 2), o que é muito característico de um processo de oxidação electrocatalítico (LUZ *et al.*, 2008).

O potencial de pico anódico para a oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfon® ocorre em cerca de 320 mV (Figura 14A, curva 2) e sobre o

eletrodo não modificado, sob condições idênticas, a oxidação do analito ocorre em 980 mV (Figura 14A, curva 4). Portanto, uma grande diminuição no sobrepotencial de oxidação e um aumento da corrente de pico são alcançados com o ECV/OGr/DDQ/Náfion®.

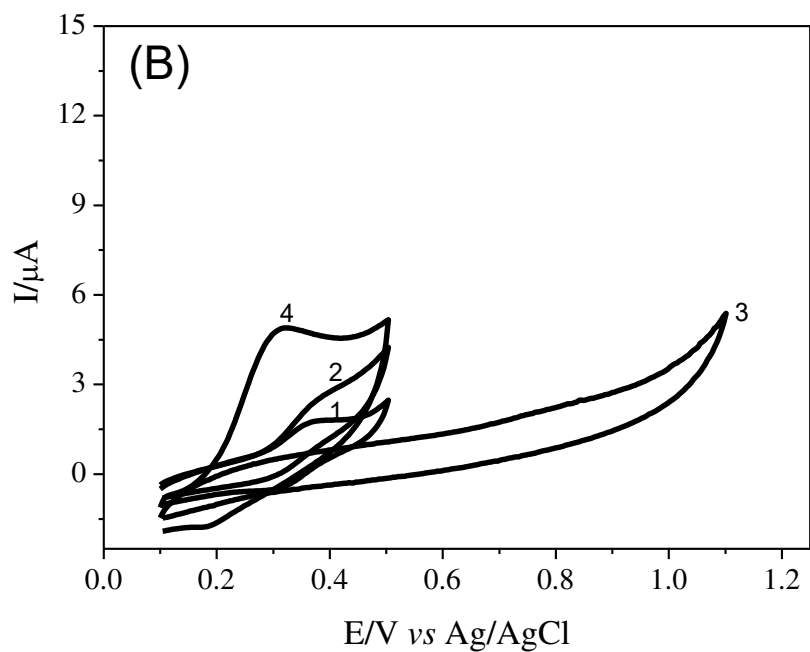
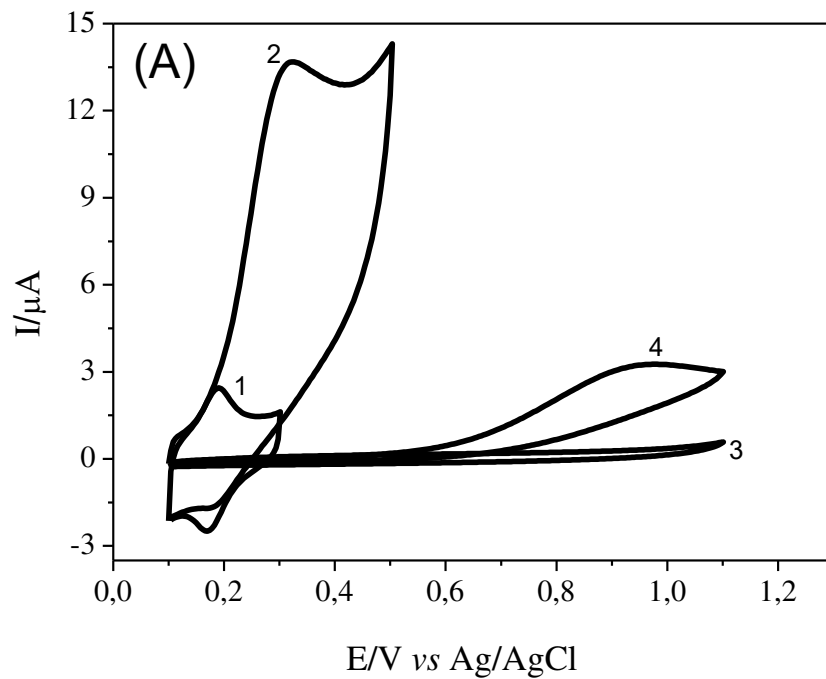
Na ausência de INH não foi observado nenhum pico redox deste (Figura 14A, a curva 3) empregando o ECV não modificado. Após a adição de 0,1 mmol L⁻¹ de INH (Figura 14A, curva 4), há o aparecimento de um pico de corrente anódica menor quando comparado ao voltamograma do ECV/OGr/DDQ/Náfion® (Figura 14A, a curva 2). O potencial de oxidação de INH na presença do ECV/OGr/DDQ/Náfion® foi deslocado cerca de 660 mV (*vs* Ag/AgCl) para valores menos positivos, com uma corrente de pico muito maior em comparação ao ECV não modificado.

Para distinguirmos a contribuição individual dos componentes do compósito (OGr/DDQ) e o efeito sinérgico entre eles, experimentos de controle envolvendo o ECV modificado apenas com o DDQ/Náfion® e o ECV modificado com o OGr/Náfion® foram realizados. Para tanto, a Figura 14B, curva 1, mostra os VCs referentes ao ECV/DDQ/Náfion® na ausência e presença de INH (Figura 14B, curva 2), bem como o ECV/OGr/Náfion® na ausência (Figura 14B, curva 3) e presença de 0,1 mmol L⁻¹ de INH (Figura 14B, curva 4).

Na Figura 14B, curva 1 (na ausência de INH) um par redox em cerca de 380 mV (potencial anódico) e 300 mV (potencial catódico) foi observado para o VC do ECV/DDQ/Náfion®. Após a adição de 0,1 mmol L⁻¹ de INH (Figura 14B, curva 2), há um pequeno aumento da corrente de pico anódico em 380 mV no mesmo potencial de pico do ECV/DDQ/Náfion® quando o mesmo se encontra na ausência do analito. Também não foi observado nenhum pico redox referente ao ECV/OGr/Náfion® na ausência do analito (Figura 14B, curva 3). Entretanto, após a adição de 0,1 mmol L⁻¹ de INH um aumento na corrente de pico é observado em cerca de 320 mV (Figura 14B, curva 4). Quando este último é comparado com o VC da Figura 14B, curva 2, observa-se que o VC da Figura 14B, curva 4, apresenta maior valor para a corrente de pico. O alto valor de corrente anódica obtida com o ECV/OGr/Náfion® pode estar relacionada com a alta condutividade do grafeno o qual facilita a transferência eletrônica entre o analito e a superfície do eletrodo (CHEEMALAPATI, *et al.*, 2013). Entretanto, a corrente observada na Figura 14B, curva 4 foi menor que a corrente observada para o ECV/OGr/DDQ/Náfion® na presença do analito (Figura 14A, curva 4). Neste sentido, a presença de óxido de grafeno reduzido é muito importante para uma melhor resposta

do analito em um baixo potencial. Como pode ser observado na Figura 14B, curvas 2 e 4, quando o DDQ e o OGr foram utilizados individualmente, cada um deles exibiu uma corrente de pico com intensidade inferior a observada com o ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] (Figura 14A, curva 2). Portanto, o aumento da corrente anódica de INH com o ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] não pode ser unicamente atribuído à quantidade de DDQ imobilizada na superfície do eletrodo, mas também pode ser devido a uma melhor distribuição do DDQ sobre o OGr, à boa atividade eletrocatalítica do DDQ distribuído no OGr e à elevada condutividade elétrica/estabilidade do filme de Náfion[®] e grafeno para a eletrooxidação de isoniazida. A integração do OGr com o DDQ promove um efeito sinérgico desses dois materiais em relação à INH aumentando assim a sensibilidade analítica do sistema, bem como reduzindo a quantidade de energia necessária para a oxidação do analito.

Figura 14 - (A) VCs do: ECV/OGr/DDQ/Náfi^o na ausê^oncia (1) e presen^oa (2) de INH, ECV n^o modificado na ausê^oncia (3) e presen^oa (4) de INH. (B) VCs do: ECV/DDQ/Náfi^o na ausê^oncia (1) e presen^oa (2) de INH; ECV/OGr/Náfi^o na ausê^oncia (3) e presen^oa (4) de INH. Experimentos realizados em 0,1 mol L⁻¹ de STF, pH 7,0.



A fim de se determinar o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação de INH empregando o ECV/OGr/DDQ/Náfion[®], experimentos voltamétricos foram realizados em diferentes velocidades de varredura. A Figura 15 mostra os VCs referentes ao ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] em 0,1 mol L⁻¹ de STF, pH 7,0, contendo 0,1 mmol L⁻¹ de INH. Um gráfico da corrente de pico anódica (I_{pa}) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura $v^{1/2}$ (inserção da Figura 15) foi construído resultando em uma linha reta de equação $Y/A = 1,2 \times 10^{-6} + 25,9 \times 10^{-6} X$ ($V s^{-1}$)^{1/2}, com $r^2 = 0,997$. A corrente de pico anódica (I_{pa}) foi dependente de $v^{1/2}$, tal como esperado para um processo totalmente irreversível e controlado por difusão. O que sugere que o processo de oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] é controlado pelo transporte de massa. Assim, o número de elétrons n envolvidos na reação global pode ser obtido a partir do coeficiente angular do gráfico de I_{pa} vs $v^{1/2}$ e, de acordo com a equação a seguir (BARD; FALKNER, 2001):

$$I_p = (2,99 \times 10^5)[(1 - \alpha)n\alpha]^{1/2}nAC_0^*D_0^{1/2}v^{1/2} \quad (8)$$

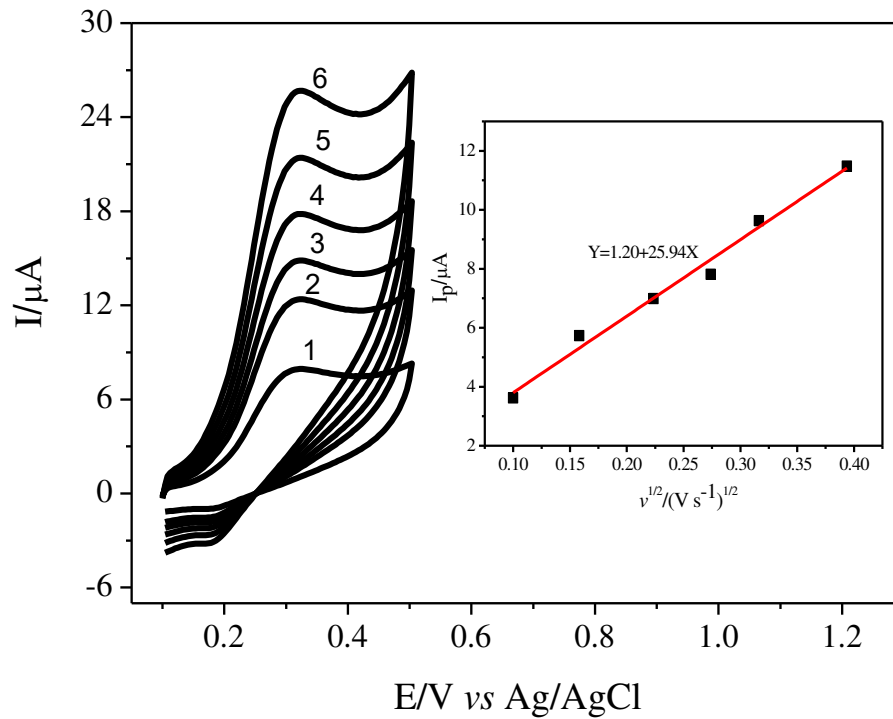
Onde I_p é a corrente de pico, n é o número total de elétrons envolvidos na reação, α é o coeficiente de transferência eletrônica, n_α , o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação, D_0 , o coeficiente de difusão de INH. O valor do coeficiente de difusão utilizado neste trabalho foi de $3,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (MAJIDI *et al.*, 2006; KARIMI *et al.*, 2010), A , é a área do eletrodo, C , a concentração da espécie eletroativa no seio da solução (mol cm^{-3}) e v , a velocidade de varredura. Entretanto, para a obtenção do número total de elétrons envolvidos na reação de oxidação de INH, foi necessário calcular o valor de $[(1 - \alpha)n_\alpha]$, a partir da seguinte equação (BARD, FALKNER, 2001).

$$(1 - \alpha)n_\alpha = \frac{47.7 \text{ mV}}{E_p - E_{p/2}} \quad (9)$$

Onde E_p representa o potencial de pico, $E_{p/2}$ o potencial de pico à meia altura, α é o coeficiente de transferência eletrônica e n_α é o número de elétrons envolvidos na etapa determinante (BARD, FAULKNER, 2001; LUZ *et al.*, 2015). O valor encontrado para $(1 - \alpha)n_\alpha$ foi igual a 0,892. Neste sentido, substituindo-se esse valor na equação (8) foi possível encontrar um valor para $n = 2,05$, o qual sugere que o número total de elétrons envolvidos no processo de transferência eletrônica entre o analito e o eletrodo modificado é de 2 elétrons. O número de elétrons encontrado neste

trabalho foi similar ao número de elétrons determinados em outro trabalho envolvendo um eletrodo modificado (ZHU *et al.*, 2015).

Figura 15 - VCs referentes ao ECV/OGr/DDQ/Náfon® na presença de 0,1 mmol L⁻¹ de INH em diferentes velocidades de varredura (0,01 – 0,2 V s⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ de STF (pH 7,0). Figura inserida: Gráfico de I_p versus $v^{1/2}$.



5.5 Otimização dos parâmetros experimentais

5.5.1 Estudo da influência das quantidades de OGr/DDQ, do pH, tipo e concentração da solução tampão sobre a oxidação eletrocatalítica de INH

Inicialmente verificou-se a influência das quantidades de OGr/DDQ sobre a corrente de pico anódica (I_{pa}) do sensor utilizando-se $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução tampão fosfato (STF), pH 7,0 contendo INH. De acordo com a Tabela 2 observa-se que as proporções de OGr/DDQ (m/m) de 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4 apresentaram menores valores para as correntes de pico de INH. Esses resultados podem estar associados ao fato de se ter uma maior concentração de DDQ em relação ao OGr. Supostamente as concentrações 2, 3 ou 4 mg mL^{-1} de DDQ não adsorveram numa quantidade suficiente de grafeno contido na superfície do eletrodo, fazendo com que ocorresse a lixiviação do DDQ. Com isso a resposta analítica observada para as proporções 1:2; 1:3 e 1:4 foram praticamente próximas à corrente observada para a proporção 1:1. Sendo assim, para garantir a não lixiviação do DDQ da superfície do ECV resolveu-se aumentar a quantidade de OGr em relação à 1 mg mL^{-1} do DDQ e observou-se que houve uma melhora significativa da resposta do sensor nas proporções de OGr/DDQ de 2:1; 3:1 e 4:1. Entretanto, nas duas últimas proporções as correntes de pico de INH foram muito próximas, sendo assim, considerando-se que foi observado um sinal analítico praticamente igual para a INH quando as proporções 3:1 e 4:1 foram utilizadas, e considerando que mesmo aumentando-se a quantidade de OGr para 4 mg a resposta não variou significativamente optou-se pelo uso da proporção 3:1 de OGr/DDQ nos estudos posteriores.

Tabela 2 - Quantidades de OGr e DDQ imobilizadas no filme de Náfion® estudados no preparo do sensor para 1 mL de água. Medidas conduzidas em STF 0,1 mol L⁻¹ contendo INH (0,1 mmol L⁻¹); $\nu = 0,05$ V s⁻¹.

Proporção (m/m)	I_{pa}
OGr/DDQ	(μA)
1:1	3,34 ($\pm 0,12$)
1:2	3,35 ($\pm 0,11$)
1:3	3,31 ($\pm 0,14$)
1:4	3,30 ($\pm 0,16$)
2:1	4,57 ($\pm 0,10$)
3:1	5,25 ($\pm 0,12$)
4:1	5,28 ($\pm 0,15$)

O estudo da influência do pH da solução eletrolítica em relação ao sinal analítico de INH foi realizado nos pHs 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 em solução tampão fosfato (STF) 0,1 mol L⁻¹. Os resultados experimentais indicam que o pH da solução possui influência significativa sobre os valores da corrente e potencial de pico de INH (Figuras 16A e 16B).

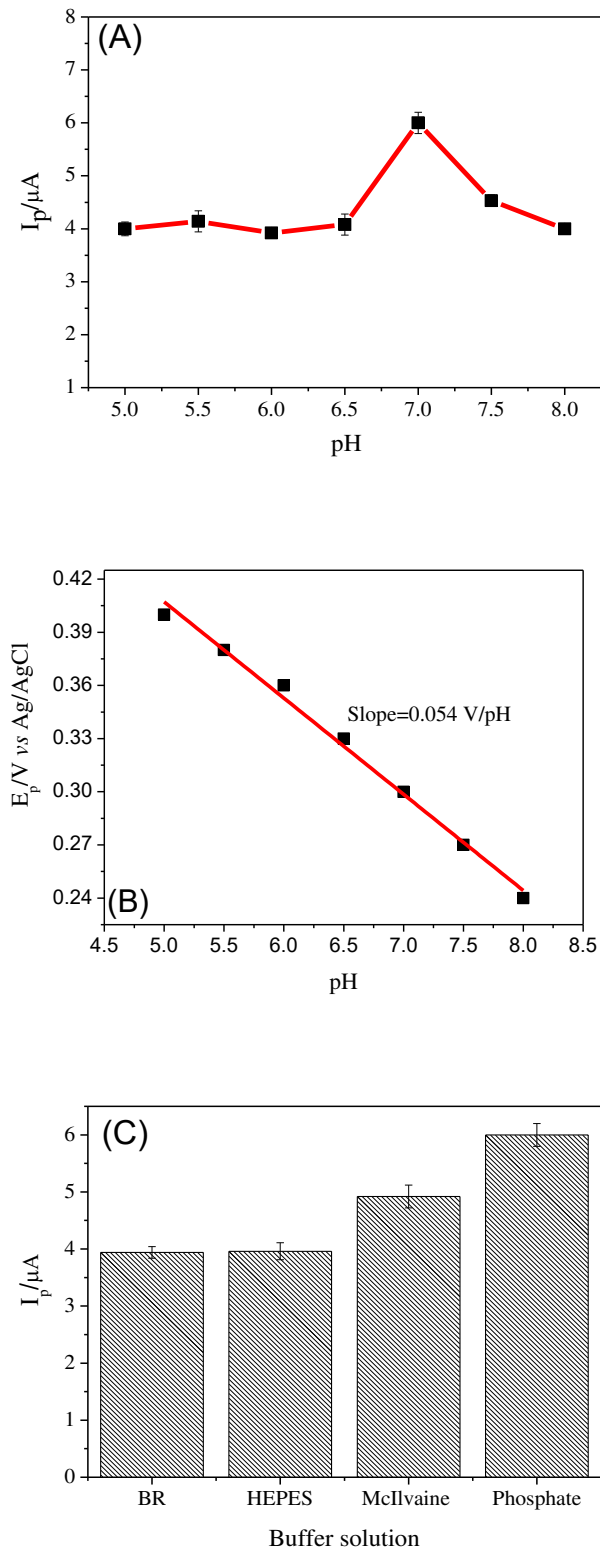
De acordo com a Figura 16A observa-se que as correntes de pico apresentam um valor máximo em pH 7,0 devido supostamente ao fato de o material compósito OGr/DDQ proporcionar menor resistência à transferência de carga em relação à oxidação do analito em solução, facilitando assim a transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e o analito em solução. Além disso, observou-se que neste valor de pH o material compósito OGr/DDQ apresenta maior estabilidade, e, conseqüentemente, o sinal analítico de INH também apresentou maior estabilidade neste meio, então o pH ótimo da solução eletrolítica para os futuros estudos foi fixado em 7,0.

A Figura 16B mostra o gráfico do potencial de pico anódico (E_{pa}) em função do pH. Os potenciais de pico anódico deslocaram-se linearmente para potenciais mais negativos com o aumento do pH do meio, com um coeficiente de correlação linear de 0,998 (Figura 16B). A correlação obtida de E_{pa} vs pH entre 5,0 e 8,0 forneceu um coeficiente angular para o gráfico de -0,054 V/pH. Este valor do coeficiente angular

está próximo ao coeficiente esperado para uma reação de eletrodo em que o número de prótons, n_p , é igual ao número de elétrons, n_e , (0,059 V/pH à 25°C). Adicionalmente, como o n_e determinado para a oxidação de INH neste trabalho foi 2, então há apenas uma possibilidade para o pH entre 5,0 e 8,0, ou seja, o n_p envolvidos no processo de oxidação de INH sobre o sensor deve ser 2 ou 0,059 (n_p/n_e) V/pH onde $n_p=n_e=2$.

O efeito do tipo de solução tampão sobre a corrente de pico do sensor para a INH também foi investigado. A Figura 16C mostra a resposta do ECV/OGr/DDQ/Náfion® em diferentes tipos de soluções tampão, tais como: Britton - Robinson (BR), Hepes, MacIlvaine e STF, em concentrações de 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. A melhor resposta para INH em STF pode estar associada à alta mobilidade iônica dos íons fosfato, tornando possível uma melhor transferência eletrônica entre o eletrodo e o analito em solução. Neste sentido, a STF foi escolhida para as etapas futuras do trabalho.

Figura 16 - Influência do pH sobre a corrente de pico (A) e sobre o potencial de pico (B) para a oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®. Medidas conduzidas em STF 0,1 mol L⁻¹ contendo INH (0,1 mmol L⁻¹); $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

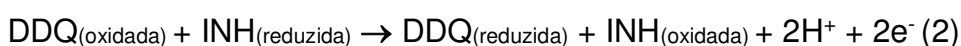
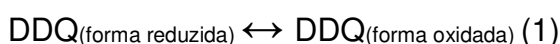


Finalmente estudou-se a influência de diferentes concentrações da solução tampão escolhida sobre a corrente de pico de INH. As concentrações estudadas foram: 0,025, 0,050, 0,10, 0,15 e 0,20 mol L⁻¹ (Tabela 3). Os resultados mostraram que concentrações de STF entre 0,1 e 0,20 mol L⁻¹ apresentaram valores de correntes quase que constantes (entre 5,27 e 5,28 μA), supostamente por garantirem uma total eletroneutralidade ao eletrodo de trabalho, o que não ocorreu abaixo de 0,1 mol L⁻¹ (entre 2,89 e 4,58 μA). Neste sentido, a concentração de 0,1 mol L⁻¹ foi escolhida para os futuros experimentos.

Tabela 3 - Influência da concentração da solução tampão sobre a corrente de pico do sensor proposto. Medidas conduzidas em solução 0,1 mmol L⁻¹ de INH em STF, pH 7,0.

[Solução tampão]/mol L ⁻¹	I _p /μA
0,025	2,89 (±0,05)
0,05	4,58 (±0,03)
0,10	5,27 (±0,01)
0,15	5,26 (±0,05)
0,20	5,28 (±0,02)

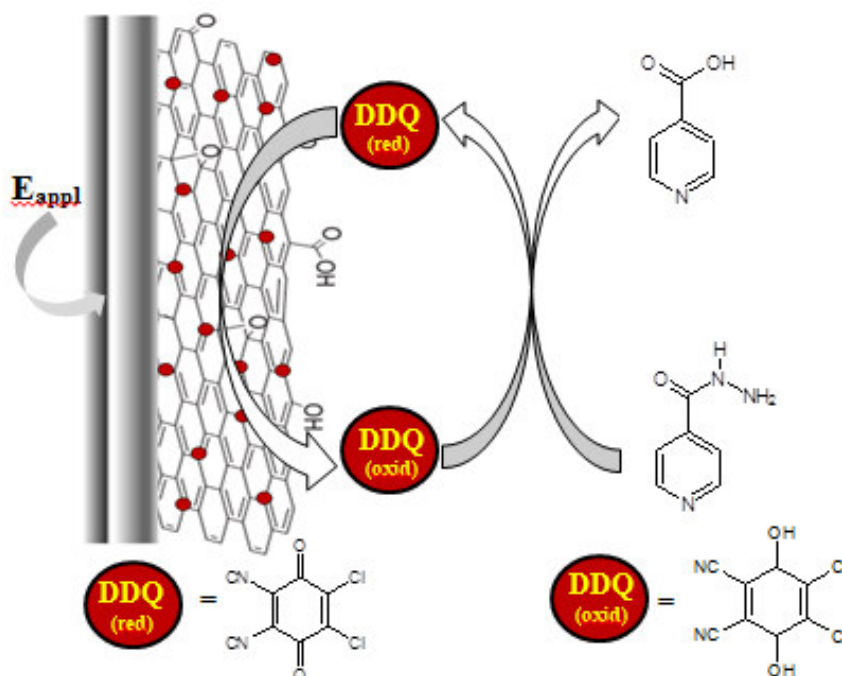
Como exposto, a oxidação catalítica de INH na presença do ECV/OGr/DDQ/Náfiom[®] pode ser claramente observada na resposta eletroquímica do sensor. Os experimentos mostraram que o material compósito OGr/DDQ pode atuar como um mediador adequado para melhorar a transferência eletrônica para a oxidação de INH. A corrente de pico do sensor aumentou acentuadamente na presença de INH em baixo potencial. Portanto, o mecanismo sugerido para a determinação de INH no material à base de grafeno baseia-se nas seguintes reações:



A primeira reação ocorre na superfície do eletrodo de carbono vítreo e, em seguida na presença de INH. O mediador na forma oxidada oxida a INH e é convertido em sua forma inicial. A corrente de pico de oxidação do DDQ aumenta na presença

de INH. As velocidades dessas duas reações, no entanto, não são independentes e a predição da eficiência catalítica depende da relação entre a superfície do eletrodo e o analito em solução. O esquema 1 mostra as reações de oxidação/redução de INH sobre o sensor.

Esquema 1 - Mecanismo proposto para a oxidação de INH sobre a superfície do sensor.



5.6 Parâmetros operacionais da amperometria

Em amperometria, o potencial aplicado (E_{apl}) ao sistema é um parâmetro relevante, uma vez que sua magnitude está diretamente relacionada à sensibilidade do sistema analítico. Sendo assim, uma ampla faixa de potencial, com valores de potenciais que antecedem e sucedem o potencial de oxidação de INH foi avaliada de modo a determinar o potencial em que o sistema apresentaria maior sensibilidade. A variação da corrente referente à oxidação do analito (ΔI) foi obtida subtraindo-se a corrente máxima pela corrente do branco, ou seja, corrente obtida na ausência do analito.

A dependência de E_{apl} sobre a resposta do sensor foi analisada utilizando-se solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de INH mantida em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH

7,0), empregando o ECV/OGr/DDQ/Náfion® sob as condições experimentais otimizadas. O objetivo deste estudo foi determinar o melhor potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, por isso o mesmo foi variado nos seguintes potenciais: 0,28; 0,30; 0,32; 0,34; 0,36; e 0,38 V *vs* Ag/AgCl.

A corrente máxima foi atingida quando se aplicou um potencial fixo entre 0,32 e 0,34 V *vs* Ag/AgCl (Tabela 4), sendo assim, o valor de potencial de 0,32 V *vs* Ag/AgCl foi escolhido como potencial ótimo de trabalho afim de utilizá-lo na construção da curva amperométrica para a determinação de INH.

Tabela 4 - Influência de E_{apl} sobre a resposta amperométrica do sensor proposto. Medidas conduzidas em solução 0,1 mmol L⁻¹ de INH contida em 0,1 mol L⁻¹ de STF (pH 7,0).

E_{apl}/V	$\Delta I/\mu A$
0,28	13,98 ($\pm 0,05$)
0,30	14,06 ($\pm 0,02$)
0,32	14,52 ($\pm 0,03$)
0,34	14,50 ($\pm 0,08$)
0,36	14,47 ($\pm 0,11$)
0,38	14,45 ($\pm 0,05$)

5.7 Caracterização analítica do sensor para a determinação de INH

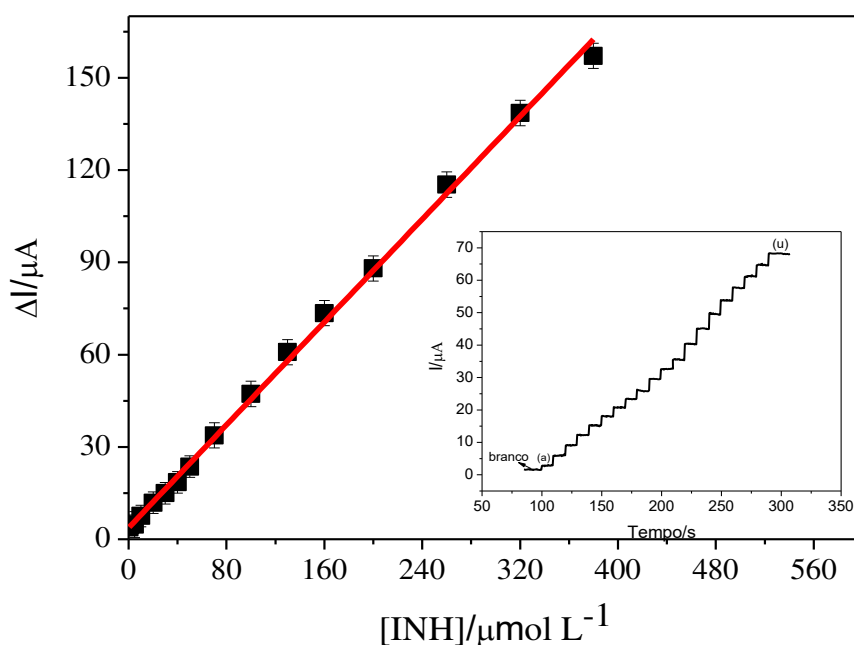
Após a otimização das condições experimentais e operacionais, as características analíticas do ECV/OGr/DDQ/Náfion® foram avaliadas. A Figura 17 mostra a curva analítica e a curva amperométrica (I *vs* t) (inserção da Figura 17) registrados para o sensor a um potencial de trabalho de 0,32 V com adições sucessivas de INH em STF. Com a adição de INH na célula eletroquímica, a resposta do sensor aumenta rapidamente num tempo de resposta inferior a 1s. Essa rápida resposta pode ser atribuída ao fato de que a INH pode difundir facilmente no eletrodo modificado oxidando-se facilmente sobre este material. Com o aumento da concentração de INH as correntes de pico anódicas aumentaram linearmente com a concentração de INH de 0,5 - 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com $r^2 = 0,999$.

A equação de regressão linear pode ser expressa na equação seguinte:

$$\Delta I/\mu A = 3,921 (\pm 0,750) + 0,420 (\pm 0,004) [\text{INH}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (10)$$

De acordo com as recomendações da IUPAC, os LOD e LOQ foram determinados utilizando-se $3 s/b$ e $10 s/b$, respectivamente, onde s corresponde ao desvio padrão para dez voltamogramas do branco e b , ao coeficiente de regressão linear da curva analítica. O valor obtido para o desvio padrão s foi de $0,0028 \mu\text{A}$, possibilitando LOD e LOQ iguais a $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A curva analítica para a determinação de INH por amperometria apresentou sensibilidade igual a $0,42 \mu\text{A L mol}^{-1}$.

Figura 17 - Curva analítica para oxidação de INH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ STF em pH 7,0 nas seguintes concentrações: (a) 0,5, (b) 1, (c) 5, (d) 10, (e) 20, (f) 30, (g) 40, (h) 50, (i) 70, (j) 100, (k) 130, (l) 160, (m) 200, (n) 260, (o) 320, (p) 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de INH, Figura Inserida: Curva Amperométrica para a determinação de INH no eletrodo modificado com OGr/DDQ/Náfion[®]. $E_{ap} = 0,32 \text{ V}$.



Para fins de comparação, a Tabela 5 foi elaborada com trabalhos que abordam a detecção de INH utilizando diferentes eletrodos. Com base nessa tabela observa-se que a sensibilidade, o LD e a linearidade obtidos neste estudo foram melhores ou próximos aos valores relatados na literatura. A boa sensibilidade pode ser justificada pela facilidade de transferência eletrônica entre o complexo ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] e a INH, favorecendo o processo catalítico na superfície do eletrodo.

Tabela 5 - Comparação do desempenho analítico utilizando diferentes eletrodos para determinação de INH.

Eletrodo	E_{ox} (V)	Eletrólito /PH	Sensibilidade ($\mu A \mu mol^{-1} L$)	Faixa Linear ($\mu mol L^{-1}$)	LOD ($\mu mol L^{-1}$)	Ref.
GCE	0.15 (SCE)	NaOH	0.17	0.025 - 1000	0.004	Quintino; Angnes, 2006
SPCE/NPAg-HCF	0.45 (Ag/AgCl)	KNO ₃ /3.0	-	5 - 500	2.6	Oliveira <i>et al.</i> , 2012
CNT - TCPE	1.00 (Ag/AgCl)	AcetatO/4	0.08	1 - 100	0.5	Shahrokian; Asadian, 2010
RGO-Au/GCE	0.32 (SCE)	STF/7	0.045	100 - 1000	0.01	Guo <i>et al.</i> , 2015
Nafion-OMC/GCE	0.20 (Ag/AgCl)	STF/7	0.031	0.1 - 370	0.084	Yan <i>et al.</i> , 2011
GC/Na+ -bt /Fe(dmbpy) ₃ ²⁺ c	0.80 (SCE)	Na ₂ SO ₄	0.009	10 - 1000	0.8	Azad <i>et al.</i> , 2015
Rh/GCE	0.70 (Ag/AgCl)	STF/7	0.011	70 - 1300	13	Cheemalapati <i>et al.</i> , 2014
FTO/Co(OH) ₂	0.40 (Ag/AgCl)	KOH	0.091	1 - 1000	0.445	Martins <i>et al.</i> , 2014
Au nanoparticle	0.01 (Ag/AgCl)	STF/9.8	0.004	10 - 100	0.1	Jena; Raj, 2010
RGO/GCE	0.307 (Ag/AgCl)	STF/7	0.31	2 - 70	0.17	Cheemalapati <i>et al.</i> , 2013
DDQ/rGO/Nafion®/GCE	0.32 (Ag/AgCl)	STF/7	0.42	0.5 - 380	0.15	Este trabalho

5.8 Determinação de INH em formulações farmacêuticas e estudos de recuperação

A determinação de INH em amostras de medicamentos foi realizada utilizando-se tanto a curva de calibração como o método de adição de padrão. Os resultados obtidos para ambos os métodos foram os mesmos. A determinação de INH nas amostras foi realizada em 5,0 mL de STF 0,1 mol L⁻¹, pH 7 contendo 10 μ L de amostra. Assim, adições sucessivas de solução padrão de INH no eletrólito foram realizadas para determinação do analito na amostra. As concentrações de INH nas amostras são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da determinação de INH por amperometria empregando-se o ECV/OGGr/DDQ/Náfion®

Amostras (n=5)	[INH] ($\mu mol L^{-1}$)	[INH]* (mol L ⁻¹)	[INH]* (mg L ⁻¹)	Valor Rotulado (mg)
A	2,90 ($\pm 0,12$)	1,45 x 10 ⁻³ ($\pm 0,06$)	198,80($\pm 0,01$)	200,00
B	3,19 ($\pm 0,09$)	1,60x10 ⁻³ ($\pm 0,004$)	218,74($\pm 0,02$)	200,00

*valores obtidos considerando o fator de diluição para as amostras.

A fim de se avaliar a aplicação do sensor para a determinação de INH, os efeitos da matriz foram avaliados utilizando-se testes de recuperação efetuados com amostras farmacêuticas. Às amostras que continham duas diferentes concentrações de INH foram fortificadas com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito, contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de vários possíveis interferentes. A Tabela 6 mostra as recuperações de INH obtidas com o método proposto. Os resultados mostram que não há nenhuma influência da matriz sobre a resposta do sensor. As recuperações obtidas variaram entre 98,46 e 101,0%, o que indica claramente a aplicabilidade do método proposto.

Tabela 7 - Estudo da adição e recuperação do analito nas amostras farmacêuticas contendo isoniazida.

Amostras (N=5)	[INH] Adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[INH] Esperada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[INH] Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resposta relativa (%)	
A	1,00	3,90	3,86 ($\pm 0,05$)	99,00	
	1,00	3,90	3,94 ($\pm 0,01$)	101,00	
	*[INH]=2,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,00	3,90	3,86 ($\pm 0,02$)	99,00
	1,00	3,90	3,84 ($\pm 0,04$)	98,46	
	1,00	3,90	3,87 ($\pm 0,03$)	99,23	
B	1,00	4,19	4,18 ($\pm 0,02$)	99,76	
	1,00	4,19	4,19 ($\pm 0,04$)	100,00	
	*[INH]=3,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,00	4,19	4,17 ($\pm 0,01$)	99,52
	1,00	4,19	4,13 ($\pm 0,03$)	98,60	
	1,00	4,19	4,16 ($\pm 0,02$)	99,28	

*valores obtidos não considerando o fator de diluição para as amostras.

A porcentagem de recuperação do analito foi obtida pela seguinte equação:

$$\% Rec, = \left(\frac{[INH]_{encontrada}}{[INH]_{esperada}} \right) \times 100 \quad (11)$$

Os resultados dos testes de adição e recuperação, como observados na Tabela 6, deixam evidente que o método proposto apresentou uma boa exatidão, pois foram obtidas porcentagens de recuperação próximas a 100 %, atestando que o sensor permitiu uma boa recuperação para o analito nas amostras avaliadas.

5.9 Análise da precisão do sensor

A precisão do sensor foi avaliada através do estudo da repetibilidade das medidas voltamétricas, sendo a mesma avaliada por meio dos desvios-padrão relativos (DPR) para oito determinações de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INH (Tabela 8). O DPR médio para INH foi 4,65% mostrando que o sensor apresenta uma boa repetibilidade para as medidas.

Tabela 8 - Avaliação da repetibilidade das medidas obtidas com o sensor ECV/Grafeno/DDQ/Náfion® imerso em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução de tampão fosfato (pH 7,0) contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INH. $E_{\text{apl.}}=0,32 \text{ V}$.

Medida	1	2	3	4	5	6	7
$I_p (\mu\text{A})$	0,88	0,88	0,88	0,95	0,96	0,96	0,96
	Média das medidas 0,92					DPR 4,65%	

Adicionalmente, uma série de 4 sensores foram preparados do mesmo modo e testados em STF, pH 7,0, contendo INH (Tabela 9). Os resultados apresentados nesta tabela mostram que o sensor proposto forneceu um DPR inferior a 5%, sugerindo que o mesmo apresenta uma boa estabilidade do material na superfície do eletrodo, devido, provavelmente à boa adsorção do óxido de grafeno reduzido na superfície do sensor, bem como à capacidade de fixação do mesmo frente ao DDQ. Adicionalmente, verificou-se a estabilidade da resposta do sensor por um período de trinta dias medindo-se o valor da corrente de pico para $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de INH à cada uma semana, sendo verificado uma diminuição também inferior à 5% na resposta do sensor indicando que o mesmo apresenta excelente estabilidade.

Tabela 9 - Avaliação da repetibilidade das medidas obtidas com quatro sensores à base de OGr/DDQ/Náfion® imerso em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução de tampão fosfato (pH 7,0) contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INH. $E_{\text{apl.}}=0,32 \text{ V}$.

Medida	1	2	3	4
$I_p (\mu\text{A})$	1,297	1,297	1,366	1,434
	Média das medidas 1,35			DPR 4,87%

5.10 Estudo de interferentes

A seletividade do eletrodo modificado foi avaliada examinando-se a influência de possíveis substâncias interferentes sobre a detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INH presentes em STF, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Os resultados indicaram que concentrações 100 vezes maiores das espécies avaliadas não interferem na determinação de INH (Tabela 10). O menor valor de recuperação obtida para o analito neste estudo foi de 98%, sendo, portanto, evidente que através da exploração da oxidação de INH, o sensor eletroquímico foi capaz de fornecer boa seletividade para detecção deste sem qualquer interferência de substâncias comumente coexistentes. Estes resultados indicaram que a determinação deste composto não foi significativamente afetada por esses possíveis interferentes.

Tabela 10 - Avaliação da seletividade do sensor proposto em relação a possíveis interferentes encontrados em amostras farmacêuticas contendo $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ INH (n = 3).

Interferente ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)	[Isoniazida] Esperada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[Isoniazida] encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resposta Relativa (%)
Ácido ascórbico	1,00	0,99 ($\pm 0,05$)	99,00
Hidrazina	1,00	1,01 ($\pm 0,01$)	101,00
Tiosulfato	1,00	0,99 ($\pm 0,02$)	99,00
Rifampicina	1,00	0,98 ($\pm 0,04$)	98,00
Estereato de magnésio	1,00	1,00 ($\pm 0,03$)	100,00

5.11 Avaliação das figuras de mérito obtidas com o sensor proposto e considerações finais sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion®

As figuras de mérito avaliadas foram: exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade, conforme pode ser observado na Tabela 11.

A exatidão do sensor proposto foi atestada pelos satisfatórios resultados dos estudos de adição e recuperação do analito obtidas em todas as amostras analisadas. A precisão foi considerada satisfatória após a verificação da repetibilidade de medidas e da reprodutibilidade do preparo do sensor. Os desvios padrão relativos entre as correntes de pico encontrados em ambos os testes foram inferiores a 5%, sendo este o valor máximo recomendado pela Resolução nº 899 da ANVISA (2003).

O sensor ECV/OGr/DDQ/Náfion® mostrou-se altamente seletivo já que o estudo de interferentes demonstrou que compostos químicos que geralmente estão presentes em formulações farmacêuticas não afetaram a determinação do teor de INH nas amostras analisadas.

Os valores apresentados de LOD, LOQ, sensibilidade e linearidade foram satisfatórios, mostrando-se melhores ou similares que muitos trabalhos encontrados na literatura para a determinação de INH utilizando outros eletrodos, aspectos que, aliados à simplicidade de modificação, tornam o sensor interessante para a determinação deste analito.

Analisando a linearidade obtida entre a I_p e a concentração de INH, observa-se que o valor de r obtido resulta em um valor de r^2 igual a 0,999, o que significa que 99,9% das correntes de pico determinadas podem ser explicadas pela relação linear entre I_p e a concentração de INH. Portanto, o método é linear em concentrações compreendidas entre 0,5 e 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Outra característica desejável apresentada pelo ECV/OGr/DDQ/Náfion® e que merece destaque é a sua estabilidade verificada por trinta dias sem que, nesse período, houvesse perda de sua resposta analítica, quando o sensor foi mantido em temperatura ambiente.

Estes resultados comprovam que o sensor proposto foi validado e, portanto, é adequado para a determinação de INH. Os resultados referentes às avaliações são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - - Figuras de mérito obtidas com o método analítico proposto.

Figura de mérito	Teste realizado	Resultado
Exatidão	Adição e Recuperação	Satisfatório
Precisão	Repetibilidade de medidas	DPR = 4,65 %
	Reprodutibilidade do sensor	DPR = 4,87 %
Seletividade	Estudo de interferentes	Satisfatório
LOD	–	0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$
LOQ	–	0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Linearidade	–	0,5 a 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o sensor à base de OGr/DDQ/Náfion[®] proporcionou uma excelente resposta eletrocatalítica para a determinação de Isoniazida, sendo possível observar um aumento significativo na corrente anódica do analito e diminuição significativa no seu sobrepotencial de oxidação, em relação às demais modificações, bem como em relação ao eletrodo não modificado.

Constatou-se que a utilização simultânea de OGr e DDQ foi necessária para que ocorresse a eletrocatalise de INH, uma vez que as espécies que compõem o material proposto, quando utilizadas separadamente, não promoveram uma oxidação eletrocatalítica tão expressiva para o analito. Tal resposta pode ser atribuída à baixa resistência à transferência de carga do compósito OGr/DDQ, à boa dispersão do DDQ frente ao OGr, à boa condutividade de cada material que compõe o filme, bem como à excelente fixação do compósito pelo filme de Náfion[®] na superfície do eletrodo.

Os espectros de FTIR confirmaram a presença dos grupos funcionais que constituem tanto o OGr quanto o DDQ conforme estabelecido na literatura, bem como também sugerem que as moléculas de DDQ adsorveram sobre a superfície do grafeno sem que houvesse o aparecimento de novos picos no espectro.

Os estudos voltamétricos demonstraram que o processo de oxidação de INH sobre o ECV/OGr/DDQ/Náfion[®] é controlado por difusão, sendo o transporte de massa o fator limitante do processo e que se trata de uma reação eletrocatalítica que envolve 2 elétrons e 2 prótons.

Uma curva analítica com ampla faixa de resposta foi obtida com alta sensibilidade, bem como obteve-se um baixo limite de detecção para a determinação de INH cujos resultados foram próximos ou ainda melhores que muitos trabalhos descritos na literatura.

O sensor proposto apresentou boa precisão, a qual foi observada através do baixo desvio padrão das medidas realizadas com o sensor, sendo estas obtidas no mesmo dia ou em dias diferentes, e boa exatidão através dos estudos de adição e recuperação.

O estudo de interferentes comprovou a boa seletividade do sensor desenvolvido para a determinação de INH, já que não foi possível observar interferências significativas na resposta do analito frente às espécies químicas

comumente encontradas em formulações farmacêuticas que contém INH como princípio ativo.

Por fim, a avaliação das figuras de mérito permite classificar o sensor à base de OGr/DDQ/Náfion® como satisfatório por este apresentar-se como uma ferramenta analítica promissora para a detecção e quantificação de INH em formulações farmacêuticas de modo simples, rápido e eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JÚNIOR, O. P., CALDAS, E. P. A., BRITO, N. M., DOS SANTOS, T. C. R., VALE, M. L. B. F., Validação de métodos analíticos: Uma breve revisão. **Cad. Pesquisa UFMA**, 12 (2001) 116-131.

ACOSTA, L. M. W. **O mapa de Porto Alegre e a Tuberculose: Distribuição espacial e determinantes sociais**. 2008. 74F. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARBEX, M. A., VARELLA, M. C. L., SIQUEIRA, H. R., DE MELO, F. A. F., Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **J. Bras. Pneumol.** 2010; 36(5): 626-640.

AZAD, U. P., PRAJAPATI, N., GANESAN, V., Selective determination of isoniazid using bentonite clay modified electrodes. **Bioelectrochem.** 101 (2015) 120-125.

BARD, A. J., MIRKIN, M. V., **Scanning Electrochemical Microscopy**, Second Edition, 2012 by CRC Press, 660p.

BARD, A. J., FAULKNER, L. R., **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications** (second ed.) John Wiley & Sons; Hoboken, NJ (2001).

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U., Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova**, 25 (5) (2002), 856-865.

BRITO, N. M., AMARANTE JUNIOR, O. P., POLESE, L., RIBEIRO, M. L., Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão, Pesticidas: **Rev. Ecotoxicol. E Meio Ambiente** 13 (2003) 129-146.

CAVALCANTI, A. C., **Avaliação da qualidade e caracterização dos insumos isoniazida e rifampicina utilizados na preparação de cápsulas dose fixa**

combinada, 2009 104F., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco.

CHANG, K. C., LEUNG, C. C., YEW, W. W., CHAN, S. L., TAM, C. M., Dosing Schedules of 6-Month Regimens and Relapse for Pulmonary Tuberculosis, **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 174 (2006) 1153-1158.

CHEEMALAPATI, S., PALANISAMY, S., CHEN, S.M., Electrochemical Determination of Isoniazid at Electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, **Int. J. Electrochem. Sci.** 8 (2013) 3953-3962.

CHEEMALAPATI, S., CHEN, S. M., ALI, M. A., AL-HEMAID, F. M. A., Enhanced electrocatalytic oxidation of isoniazid at electrochemically modified rhodium electrode for biological and pharmaceutical analysis, **Colloids Surf. B** 121 (2014) 444-450.

COCA, M. N. S. S. M. **Hepatotoxicidade ao esquema rifampicina, isoniazida e pirazinamida no tratamento da tuberculose em pacientes com e sem a síndrome da imunodeficiência humana adquirida.** 2009. 90F. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure and Appl. Chem.**, 67 (1995) 1699-1723.

DA ROCHA, J. L.; SILVA, C. H. L.; CYRIACO, C. S. S.; CURY, M. E. C.; OLIVEIRA, M. G.; GASPAROTTO, F. S.; PENIDO, C. S.; DA SILVA, L. R.; DAVID, C. A.; BARTHOLOMAY, P.; JOHANSEN, F. K.; COSTA, F. D.; DE LIMA, J. N.; BARREIRA, D.; TRAJMAN, A.; Farmacovigilância em tuberculose: relato de uma experiência no Brasil, **Vigil. Sanit. Debate** 3(2) (2015) 131-135.

DA SILVA, H. F. F., **Detecção eletroquímica da norffloxacin e trimetoprim em amostras de urina utilizando polímero molecularmente impresso modificado e grafeno**, 2012 92F. Dissertação (Mestrado), Instituto Superior de Engenharia do Porto.

DA SILVA, E. P., **Filmes de grafeno para aplicação como óxido condutor transparente**, 2014 104F. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

DE FREITAS, L. V., **Grafeno/Co(SALOFEN) e DNA como uma nova plataforma para a oxidação eletrocatalítica de hidrazina: Aplicação em amostras farmacêuticas**, 2015 104F., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri.

DE JESUS, K. A., FREIRE, E., GUIMARÃES, M. J. O. C., **Grafeno: Aplicações e Tendências Tecnológicas**, Artigo Técnico, RQI 4º Semestre 2012.

DEEPAK, M. P., MAMATHA, G. P., SHERIGARA, B. S. Electrochemical Investigation of uric acid at poly(Isoniazid) film modified carbon past electrode. **Int. J. Pharm. Chem.** 4 (2004) 122-129.

DE LIMA, P. C., **Desenvolvimento de um método de análise para a determinação do teor de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da tuberculose**, 2014 111F., Dissertação (Mestrado), Fundação Oswaldo Cruz

FEIJÓ, T., **Projeto e montagem de um reator para produção de grafeno**, 2014 50F., TCC (Monografia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERREIRA, G. M. M., F.M. Oliveira, F.R.F. Leite, C.M. Maroneze, L.T. Kubota, F.S. Damos, R.C.S. Luz, DNA and graphene as a new eficiente platform for entrapment of methylene blue (MB): Studies of the electrocatalytic oxidation of b-nicotinamide adenine dinucleotide, **Electrochim. Acta** 111 (2013) 543-551.

GEIM, A. K., NOVOSELOV, K. S., The rise of graphene, **Nature mater.**, 6 (2007) 183-191.

GUIA PARA O DIGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA TUBERCULOSE, Hospital das Clínicas, MERCK SHARP & DOHME, São Paulo 2006.

GUO, Z., WANG, Z. Y., WANG, H. H., HUANG, G. Q., LI, M. M., Electrochemical sensor for isoniazid based on the glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide-Au nanomaterials, **Mater. Sci. Eng. C** 57 (2015) 197-204.

GUO, H. L., WANG, X. F., QIAN, Q. Y., WANG, F. B., XIA, X. H., A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets, **J. Am. Chem. Soc.** 3 (2009) 2653-2659.

GRANJEIRO JUNIOR, S., GALINDO BEDOR, D. C., SOARES SOBRINHO, J. L., STRATTMAN, R., ROLIM NETO, P. J., ALBUQUERQUE, M. M., Validação da metodologia analítica de comprimido à base de nevirapina. **Controle de Contaminação** 7 (2004) 25-28.

HABEEB, M. M., AL-ATTAS, A. S., AL-RAIMI, D. S., Spectroscopic studies and molecular orbital calculations of charge transfer complexation between 3,5-dimethylpyrazole with DDQ in acetonitrile, **Spectrochim. Acta A** 142 (2015) 196-203.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, rev. 2, 2007.

JENA, B.K., RAJ, C.R., Au nanoparticle decorated silicate network for the amperometric sensing of isoniazid, **Talanta** 80 (2010) 1653-1656.

KAMEL, M.S., Spectrophotometric Determination of Isoniazid in Pure Form and Pharmaceutical Preparation, **World J. Chem.** 3 (2008) 11-16.

KARIMI, M. A., HATEFI-MEHRJARDI, A., MAZLOUM-ARDAKANI, M., BEHJATMANESH-ARDAKANI, R., MASHHADIZADEH, M. H., SARGAZI, S., Study of Electrocatalytic Oxidation of Isoniazid Drug Using Alizarin Red S a Mediator on the Glassy Carbon Electrode, **Int. J. Electrochem. Sci.** 5 (2010) 1634-1648.

LAPA, R. A. S., LIMA, J. L. F. C., SANTOS, J. L. M., Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium (IV) in a multicommutated flow system, **Anal. Chim. Acta** 419 (2000) 17-23.

LEMOS, L. A., FEIJÃO, A. R., GIR, E., GALVÃO, M. T. G. Aspectos da qualidade de vida de pacientes com coinfeção HIV/tuberculose. **Acta Paul Enferm.** 25 (2012) 41-47.

LIMA, K. C. M. S., SANTOS, A. C. F., FERNANDES, R. N., DAMOS, S. F., LUZ, R. C. S., Development of a novel sensor for isoniazid based on 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone and graphene: Application in drug samples utilized in the treatment of tuberculosis, **Microchem. J.** 128 (2016) 226-234.

LIU, W. W., CHAI, S. P., MOHAMED, A. R., HASHIM, U., Synthesis and characterization of graphene and carbon nanotubes: A review on the past and recent developments, **J. Ind. Eng. Chem.** 20 (2014) 1171-1185.

LIU, J., LIU, Z., BARROW, C. J., YANG, W., Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: A review, **Anal. Chim. Acta** 859 (2015) 1-19.

LOPES, D. M. A., PINHEIRO, V. G. F., MONTEIRO, H. S. A., QUEIROZ, J. A. N., MADEIRA, L. S., LOPES, M. M. A., Diagnóstico e tratamento da tuberculose latente em pacientes com doenças inflamatórias crônicas e uso de imunobiológicos inibidores do TNF- α . **J. Bras. Pneumol.** 37 (2011) 308-316.

LUZ, R. C. S., DAMOS, F.S., TANAKA, A. A., KUBOTA, L. T., GUSHIKEM, Y., Electrocatalytic activity of 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone/multiwalled carbon nanotubes composite on edge plane pyrolytic graphite electrode for oxidation NADH, **Electrochim. Acta** 53 (2008) 4706-4714.

MAJIDI, M. R., JOUYBAN, A., ASADPOUR-ZEYNALI, K., Voltammetric behavior and determination of isoniazid in pharmaceuticals by using overoxidized polypyrrole glassy carbon modified electrode, **J. Electroanal. Chem.** 589 (2006) 32-37.

MARTINS, P.R., FERREIRA, L.M.C., ARAKI, K., ANGNES, L., Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid, **Sens. Actuators B** 192 (2014) 601-606.

MASHHADI S.M.A. Mashhadi, U. Yunus, M.H. Bhatti, M.N. Tahir, Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids, **J. Mol. Struct.** 1076 (2014) 446-452.

MEHL, H., MATOS, C. F., NEIVA, E. G. C., DOMINGUES, S. H., ZARBIN, A. J. G., Efeito da variação de parâmetros reacionais na preparação de grafeno via oxidação e redução do grafite, **Quim. Nova**, 37 (2014) 1639-1645.

MOHAMED, G. G., EL-DIEN, F. A. N., FARAG, E. U., Spectrophotometric study of the reaction mechanism between DDQ as π -acceptor and potassium iodate and flucloxacillin and dicloxacillin drugs and their determination in pure and in dosage forms. **Spectrochim. Acta A** 65 (2006) 11-19

NOGUEIRA, A. F., FACCHINETTI, V., DE SOUZA, M. V. N., VASCONCELOS, T. R. A., Tuberculose: Uma abordagem geral dos principais aspectos, **Revista Brasileira de Farmácia** 93 (2012) 3-9.

NOVOSELOV, K. S., GEIM, A. K., MOROZOV, S. V., JIANG, D., ZHANG, Y., DUBONOS, S. V., GRIGORIEVA, I. V., FIRSOV, A. A., Electric Field Effect in Atomically thin carbon films, **Science** 306 (2004) 666-669.

NUNES, L.O., **Síntese, caracterização e aplicação do óxido de grafite e grafeno em estudos eletroquímicos envolvendo ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina e epinefrina**, 2013 104F., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri.

OLIVEIRA, R. M., SANTOS, N. G., ALVES, L.A., LIMA, K. C. M. S., KUBOTA, L. T., DAMOS, F. S., LUZ, R. C. S., Highly sensitive p-nitrophenol determination employing a new sensor based on *N*-Methylphenazonium methyl sulfate and graphene: Analysis in natural and treated waters, **Sens. Actuators B** 221 (2015) 740-749

OLIVEIRA, P. R., OLIVEIRA, M. M., ZARBIN, A. J. G., MARCOLINO JUNIOR, L. H., BERGAMINI, M. F., Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles, **Sens. Actuators B** 171-172 (2012) 795-802.

PINEDA, N. I. S., PEREIRA, S. M., MATOS, E. D., BARRETO, M., Quimioprofilaxia na prevenção da tuberculose, **J. Bras. Pneumol.**, 30 (2004) 485-495.

PORTAL DA SAÚDE SUS, 2016. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 03 de julho de 2016.

PRAJAPATI, P., AGRAWAL, Y. K., SFC-MS/MS for identification and simultaneous estimation of the isoniazid and pyrazinamide in its dosage form, **J. Supercrit. Fluids** 95 (2014) 597-602.

PUMERA, M., Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review, **Electrochem. Commun.** 36 (2013) 14-18.

QUINTINO, M. S. M., ANGNES, L., Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 42 (2006) 400-404.

RADOI, A., COMPAGNONE, D., Recent advances in NADH electrochemical sensing design. **Bioelectrochemistry**, v. 76, p. 126 – 134, 2009.).

RASTOGI, P. K., GANESAN, V., AZAD, P. U., Electrochemical determination of nanomolar levels of isoniazid in pharmaceutical formulation using silver nanoparticles decorated copolymer. **Electrochimica Acta**, 188 (2016) 818-824.

RAY, S. C., **Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials**, Elsevier, Micro & Nano Technologies Series, 2015.

REFAT, M. S., MOHAMED, G. G., FATHI, A., Spectrophotometric determination of sildenafil citrate drug in tablets. Spectroscopic characterization of the solid charge transfer complexes, **Bulg. Chem. Commun.** 45 (2013) 250-262.

RIBANI M.; Bottoli C. B. G.; Collins C. H.; Jardim I. C. S. F.; MELO L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, vol. 27, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím Nova**. 31 (2008) 164-171.

SHAHRIARY, L., ATHAWALE, A. A., Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach, **Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.** 2 (2014) 58-63.

SATYANARAYANA, M., REDDY, K. K., GOBI, K. V., Multiwall carbon nanotube ensemble biopolymer electrode for selective determination of isoniazid in vitro, *Anal. Methods*, 6 (2014) 3772-3778.

SHAHROKIAN, S., ASADIAN, E., Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode, **Electrochim. Acta** 55 (2010) 666-672.

SISWANA, M. P., OZOEMENA, K. I., NYOKONG, T., Electrocatalysis of asulam on cobalto phthalocyanine modified multi-walled carbon nanotubes immobilized on a basal plane pyrolytic graphite electrode, **Electrochim. Acta** 52 (2006) 114-122.

SOARES SOBRINHO, J. L., NUNES, L. C. C., GRANJEIRO JÚNIOR, S., ROCA, M.F. De La, ROLIM NETO, P. J., Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: caso paracetamol. **Controle de Contaminação** 7 (2005) 35-41.

SOUSA, E. T., **Quinonas no ar atmosférico: Determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada**, 2012 117F., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia.

SMANIOTTO, A., **Obtenção, caracterização e funcionalização seletiva de óxido de grafeno com espécies sulfuradas e fragmentos orgânicos**, 2015 158F., Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina.

STANKOVICH, S., PINER, R. D., CHEN, X., WU, N., NGUYEN, S. T., RUOFF, R. S., Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets *via* the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly(sodium 4- styrenesulfonate). **J. Mater. Chem.**, 16 (2006) 155-158.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, 2 (1998) 12-20.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, ISO, IUPAC and AOAC International Technical report, **Pure Appl. Chem.**, 71 (1999) 337-348.

VALENTINI, S. R., SOMMER, W. A., MATIOLI, G., Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. 11 (2007) 26-31.

VESSMAN, J.; STEFAN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 73 (2001) 1381-1386.

VIANA, I. M. O; CHELLINI, P. R., Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de rifampicina e isoniazida em comprimidos de dose fixa combinada. PUC-GOIÁS. Disponível em< <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/8mostra/Artigos>>. Acesso em 05 de julho de 2016.

YAN, X., BO, X., GUO, L., Electrochemical behaviors and determination of isoniazid at ordered mesoporous carbon modified electrode. **Sens. Actuators B** 155 (2011) 837-842.

WANG, J., Analytical Electrochemistry, VHC Publishers Inc., New York (1994)

ZARBIN, A. J. G., OLIVEIRA, M. M., Nanoestruturas de carbono (Nanotubos, grafeno): *Quo Vadis?* **Quim. Nova** 36 (2013) 1533-1539.

ZHU, X., XU, J., DUAN, X., LU, L., ZHANG, Y., YU, Y., XING, H., GAO, Y., DONG, L., SUN, H., YANG, T, Controlled synthesis of partially reduced graphene oxide: Enhance electrochemical determination of isoniazid with high sensitivity and stability, **J. Electroanal. Chem.** 757 (2015) 183-191.

ANEXOS



Development of a novel sensor for isoniazid based on 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone and graphene: Application in drug samples utilized in the treatment of tuberculosis



Kayni Cássea Moreira Soares Lima, Ana Caroline Ferreira Santos, Ridvan Nunes Fernandes, Flávio Santos Damos, Rita de Cássia Silva Luz *

Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2016

Received in revised form 27 April 2016

Accepted 27 April 2016

Available online 7 May 2016

Keywords:

Isoniazid

Tuberculosis

Sensor

2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone

Reduced graphene oxide

ABSTRACT

A novel platform for electrocatalysis of isoniazid (INH) based on 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (DDQ) and reduced graphene oxide (rGO) immobilized in a Nafion® membrane was developed. The composite (DDQ/rGO) was characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and the sensor response for the analyte was studied by cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry techniques. The DDQ/rGO/Nafion® modified electrode showed an excellent electrocatalytic activity toward INH oxidation with a decrease of the overpotential of about 660 mV vs Ag/AgCl, compared to the process at an unmodified electrode. Under optimized conditions, the sensor showed a wide linear range for isoniazid from 0.5 up to 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with r^2 of 0.999. The sensor was applied for the INH determination in drug samples utilized in the tuberculosis treatment and the results were satisfactory. The detection limit, repeatability, long-term stability, time of response and linear response range were also investigated.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

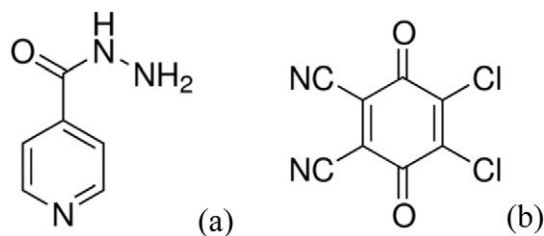
Isoniazid or isonicotinyl hydrazine (see Scheme 1a) is the drug most widely used for treatment of tuberculosis (TB). It is highly active against *Mycobacterium tuberculosis* and it is the primary constituent of “triple therapy” used to effectively treat tuberculosis since 1952 [1]. Tuberculosis is a potentially serious infectious disease that mainly affects the lungs. The bacteria that cause tuberculosis are spread from one person to another through tiny droplets released into the air via coughs and sneezes. The standard 6-month treatment for drug-susceptible TB consists of a 2-month intensive phase followed by a 4-month continuation phase [2]. Then, the regular use of the drugs based on INH by the patient is extremely important for an effective treatment of the disease. However, the quality control in the dosage of the active principles in the pharmaceutical formulations is also necessary because drugs must be marketed as safe and therapeutically active formulations whose performance should be consistent and predictable. New and better medicinal agents are being produced at an accelerated rate, therefore several analytical methods have been developed for the INH determination, such as titrimetry [3], chromatographic methods [4–5] fluorimetry [6], injection analysis systems [7–9], spectrophotometry [10–11] and electrochemical methods [12–14].

Electrochemical methods can be simple, fast, inexpensive, however the direct oxidation of INH at bare GCE occurs at high overpotentials (>900 mV) and consequently a low sensitivity and selectivity are observed. To overcome this limitation, many research groups have studied the development of electrochemical methods for the INH determination [13–18] and new materials have been used to modify electrodes to electrocatalysing the oxidation of INH and facilitate the electronic transfer, including: screen-printed-silver hexacyanoferrates nanoparticles [8], thionine immobilized multi-walled carbon nanotube [12], glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide–Au nanomaterials [13], Fe(tmphen)₃²⁺ [14], PEDOT electrode [15], mesoporous carbon [17], bentonite clay [19], rhodium [20], nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes [21], Au-silicate [22], and poly(sulfosalicylic acid)/electroreduced carboxylated graphene modified glassy carbon electrode [23]. However, in most papers, the oxidation of INH at modified electrodes requires a high overpotential, acidic or alkaline supporting electrolyte, which brought great inconvenience to the analytical procedure being unsuitable for the detection [17]. Therefore, there is the need to develop a method with a fast response and sensitive to detection of INH at a low oxidation potential, and consequently, higher selectivity.

Graphene has attracted the attention of many scientists due to its unique electrical, mechanical and thermal properties having very interesting features to the development of electrochemical devices [24–25]. This material has been utilized combined with electron transfer catalysts [13,26–28] and it has opened a new and interesting area in

* Corresponding author.

E-mail address: rita.luz@ufma.br (R. de Cássia Silva Luz).



Scheme 1. Chemical structure of INH (a) and DDQ (b).

materials science in recent years. The simultaneous use of graphene and other compounds may lead to new features, as high conductivity and good stability to the composite material. These kinds of composite films may generate synergy on electrocatalytic activity and thus enhance the sensitivity of the sensors or biosensors.

In this work, DDQ or 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (see Scheme 1b), a stronger oxidant, was adsorbed on reduced graphene oxide and then immobilized in a nafion membrane to obtain a novel platform for the electrocatalytic oxidation of the analyte. The interaction of DDQ with drugs has been studied by spectrophotometry and it is a research topic of significant interest [29–31].

Additionally, although many studies on the electrochemical oxidation of INH using various modified electrodes have been reported, to the best of our knowledge there are no reports about the modification of an electrode with DDQ/graphene/Nafion® for electrochemical oxidation of INH. The present modification aims to increase the electron transfer rate between the electrode surface and the analyte in solution exploiting the electrocatalytic properties of the DDQ/rGO for INH oxidation.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All chemicals were of analytical grade. The graphite powder, isoniazid, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (DDQ), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were acquired from Sigma, St. Louis, USA. Heparic acid, citric acid, phosphoric acid, disodium and monosodium phosphates (Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4), were acquired from Synth, São Paulo, Brazil.

Standard solutions were prepared daily with appropriate dilution of the stock solutions with deionized water. All solutions were prepared with water purified in an OS100LXE system from GEHAKA Company (Gehaka Ltd., São Paulo, SP, Brazil), and the actual pH of the buffer solutions was determined with a Quimis pH/Ion Analyser Q400AS model. Phosphate buffer solutions (PBS) were prepared from 0.1 mol L^{-1} Na_2HPO_4 , and the pH was adjusted with 0.6 mol L^{-1} HCl.

2.2. Spectroscopic and electrochemical measurements

Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were obtained using a Shimadzu IR Prestige-21 spectrometer, in the region of $4000\text{--}500 \text{ cm}^{-1}$. 1% KBr tablets were prepared for analysis of each material (rGO, DDQ compound and DDQ/rGO composite).

Electrochemical measurements were performed with an Autolab PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Eco Chemie) coupled to a microcomputer and controlled with GPES software.

2.3. Graphite oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO)

GO was prepared using a modification of Hummers and Offeman's method from graphite powders (Bay carbon, SP-1) [32–33]. Briefly, 500 mg of graphite, 500 mg of NaNO_3 , and 23 mL of H_2SO_4 were kept under stirring in an ice bath. Next, 3 g of KMnO_4 was slowly added to

previously prepared dispersion. After that, the solution was transferred to a 35°C water bath and stirred for 60 min to give a thick paste. 40 mL of water was added to reactional mixture and it was stirred for 30 min while the temperature was increased to 90°C . Finally, 0.1 L of water was added to mixture, followed by dropwise addition of 3 mL of H_2O_2 (30%), which changed the color of the solution from dark brown to yellow. The dispersion was then filtered and the solid was washed with 0.1 L of water. The filter cake was dispersed in water by mechanical agitation and it was centrifugated at low-speed for 2 min. The previous process was repeated until that all visible particles were removed from the solution. The supernatant underwent a high-speed centrifugation step at 8000 rpm for 15 min to remove small GO pieces and water-soluble byproduct. The final sediment was re-dispersed in water with mechanical agitation or mild sonication using a table-top ultrasonic cleaner, giving a solution of exfoliated GO. The obtained graphite oxide (0.5 g) dispersed in 500 mL deionized water was exfoliated to graphene oxide under ultrasonic treatment for 1 h. The resulting homogeneous dispersion was mixed with 10 mL of water, 10 mg of hydrazine solution (35 wt% in water, containing 2.8 mg hydrazine) and 35.0 μL of ammonia solution (28 wt% in water). After being vigorously stirred for 30 min, it was kept in a water bath (95°C) for 1 h. The resulting mixture was filtered and washed to get the reduced graphene oxide [32].

2.4. Sensor construction

Prior to the electrode modification, the glassy carbon electrode surface was polished to remove any adsorbed matter. After cleaning the electrode, a suspension was prepared by mixing 3.0 mg reduced graphene oxide and 1 mg DDQ in 1 mL DMSO. Then, 10 μL of this suspension was placed directly onto the glassy carbon electrode surface and allowed to dry at 70°C for 30 min. After drying the electrode 10 μL of Nafion® was placed on the electrode surface. The modified electrode was denoted as DDQ/rGO/Nafion®. The effective surface area of the DDQ/graphene/Nafion® modified electrode was estimated as described by Siswana et al. [34] using $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, applying the Randles Sevcik theory [35–36]. The effective area was about of 0.25 cm^2 . Finally, the modified electrode was thoroughly rinsed with distilled water and placed into the electrochemical cell.

2.5. Preparation and electrochemical determination of INH in pharmaceutical samples for electrochemical measurements

Drug samples containing INH produced by Laboratory A and B, were purchased at local drugstores. According to these laboratories, each

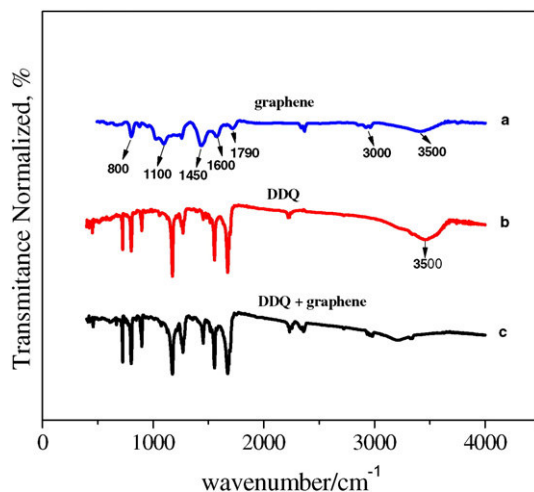


Fig. 1. FT-IR analyses of rGO (a, blue line), the DDQ (b, red line) and the DDQ/rGO composite (c, black line).

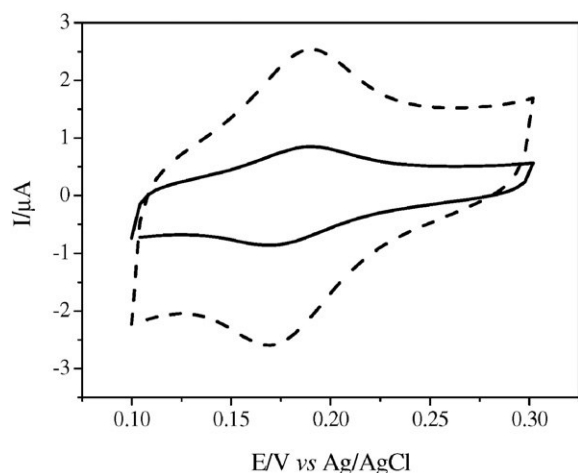


Fig. 2. CVs of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode (—) and DDQ/rGO modified electrode (---) in 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7.0. $v = 0.05$ V s⁻¹.

capsule contained 200 mg of INH and 300 mg of rifampicin. Analyses of the capsules were made as follows: the contents of 5 capsules were weighed and mixed. A portion of powder corresponding to 500 mg was weighed and solubilized in water. The solution was filtered and transferred quantitatively to a 500 mL flask and the volume was completed with the same solvent. The procedure was done in triplicate. An aliquot of 10 μ L of each sample was added to the electrochemical cell containing 5 mL of a 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7.0 for analysis. The same procedure was also done in triplicate, with the diluted sample 500 times (10 μ L of sample/5 mL of electrolyte).

3. Results and discussion

3.1. Composite characterization

The FTIR spectrum of reduced graphene oxide (rGO) (Fig. 1a) shows a broad peak at 3500 cm⁻¹ in the high frequency region and a sharp peak at 1600 cm⁻¹ corresponding to the stretching and bending

vibration of OH groups of water molecules adsorbed on rGO [37]. The absorption peaks at 2930 and 2859 cm⁻¹ represent the symmetric and anti-symmetric stretching vibrations of CH₂, while the presence of two peaks observed in the medium frequency region, at 1630 cm⁻¹ and 740 cm⁻¹ can be attributed to the stretching vibration of C=O of carboxylic acid and carbonyl groups present at the edges of graphene [38]. Finally, the peaks at 1385 and 1110 cm⁻¹ correspond to the stretching vibration of C—C of carboxylic acid and C—OH of alcohol, respectively. The presence of these oxygen-containing groups reveals that the graphite has been oxidized. The polar groups, especially the surface hydroxyl groups, result in the formation of hydrogen bonds between graphite and water molecules; this further explains the hydrophilic nature of graphene oxide [38]. The bands observed in the spectrum for the DDQ (Fig. 1b) correspond to vibrations of specific groups found in the molecular structure of the DDQ compound [39].

The spectrum obtained for the DDQ/rGO composite (Fig. 1c) indicates that modification of the graphene by the DDQ occurred through a process of physical adsorption, since the characteristic bands of compounds observed in Fig. 1a and 1b were again observed after modification of the graphene without the appearance of new bands in the spectrum of the composite.

3.2. Electrochemical behavior of the DDQ/rGO modified electrode

Initially, two electrodes were prepared: the first was a DDQ/rGO modified electrode and the other was a DDQ/rGO/Nafion® modified electrode. After the preparation, the electrodes were washed to remove the non-adsorbed molecules. After this step, successive cyclic voltammograms (CVs) were performed in a potential range between 0.1 and 0.3 V vs Ag/AgCl and both electrodes presented good stability. However, the electrode containing the Nafion® membrane (DDQ/rGO/Nafion® modified electrode) presented peak currents about 10-fold higher than the peak current observed for the modified electrode without the Nafion® membrane (DDQ/rGO modified electrode) (Fig. 2), indicating that membrane is very important to fix a larger amount of the DDQ/rGO composite material on the electrode surface in a stable way. In this sense, for all further studies a Nafion® membrane was used.

As can be seen in Fig. 2, the cyclic voltammograms exhibit anodic and cathodic peaks related to the redox process of 2,3-dichloro-5,6-

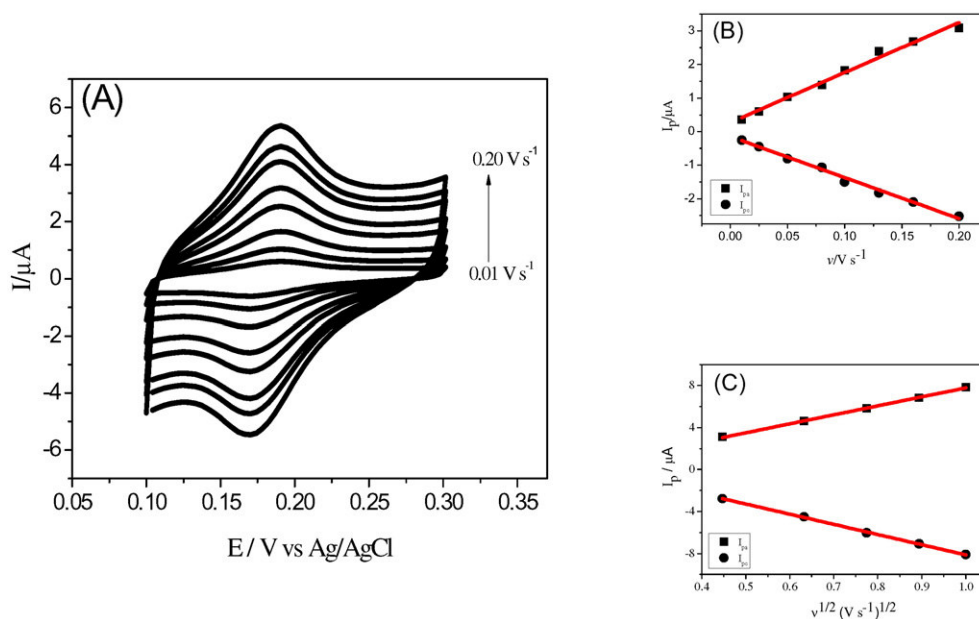


Fig. 3. (A) CVs of DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in 0.1 mol L⁻¹ PBS at pH 7.0 for potential scan rates of 0.01–0.20 V s⁻¹; (B) plot of $I_p - v$ obtained from (A), and (C) plot of $I_p - v^{1/2}$ for potential scan rates of 0.20–1.0 V s⁻¹.

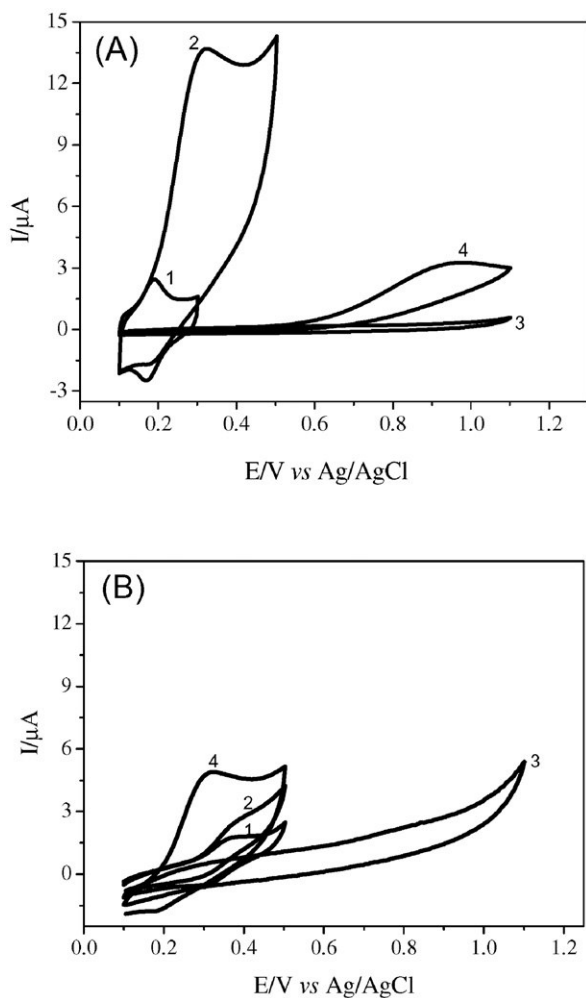


Fig. 4. (A) CVs of the: DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in absence (1) and presence (2) of INH, bare electrode in absence (3) and presence (4) of INH. (B) CVs of the: DDQ/Nafion® modified electrode in absence (1) and presence (2) of INH; rGO/Nafion® modified electrode in absence (3) and presence (4) of INH. Experiments carried out in 0.1 mol L^{-1} PBS at pH 7.0.

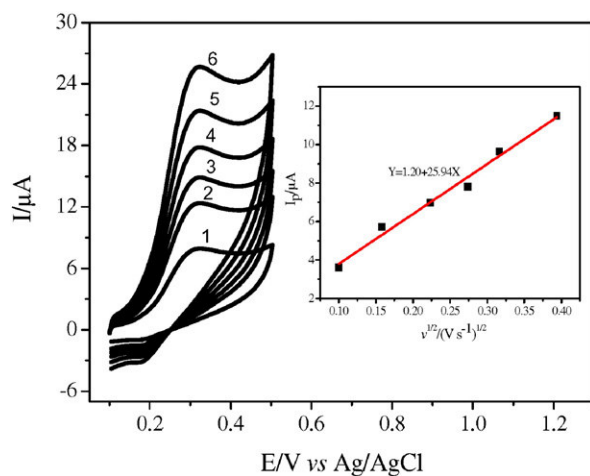


Fig. 5. CVs of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in the presence of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ INH at several scan rates (0.01 to 0.2 V s^{-1}) in 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 7.0). Inset: the linear relationship between the peak currents and the square roots of scan rates.

dicyano-1,4-benzoquinone, $\text{DDQ}_{(\text{oxi})}$ ($E_{\text{anodic}} = 190 \text{ mV vs Ag/AgCl}$) to 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-hydroquinone, $\text{DDQ}_{(\text{red})}$ ($E_{\text{cathodic}} = 170 \text{ mV vs Ag/AgCl}$) with $\Delta E(E_{\text{anodic}} - E_{\text{cathodic}}) = 20 \text{ mV}$ characterizing a process with high reversibility.

Fig. 3A shows the CVs of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in PBS at pH 7.0 at various potential scan rates. As can be seen, the CVs exhibit anodic peaks at forward scans related to the oxidation of DDQ, whereas the reverse scans present cathodic peaks related to reduction of the compound. The peaks' currents for the redox couple were directly proportional to the scan rate in the range of 0.01 V s^{-1} and 0.25 V s^{-1} , as shown in Fig. 3B. At scan rates higher than 0.25 V s^{-1} , the peak currents

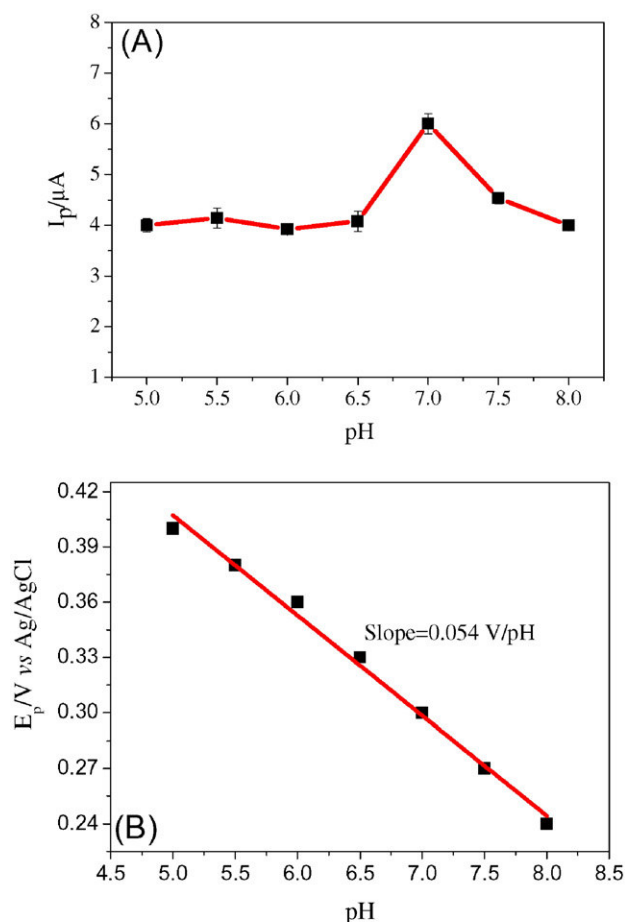


Fig. 6. Influence of the solution pH on the: (A) current peak; (B) peak potential for $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ INH obtained by CV. (C) Plot of I_p vs buffer solution. Measurements carried out in 0.1 mol L^{-1} buffer solution at pH 7.0. $v = 0.05 \text{ V s}^{-1}$.

were proportional to the square root of the scan rate (Fig. 3C) indicating a diffusion-controlled process, which can be related to the limitation of the diffusion of the counter ions into the composite electrode to keep the electrochemical neutrality.

3.3. Electrocatalytic oxidation of INH at the DDQ/rGO/Nafion®/GCE

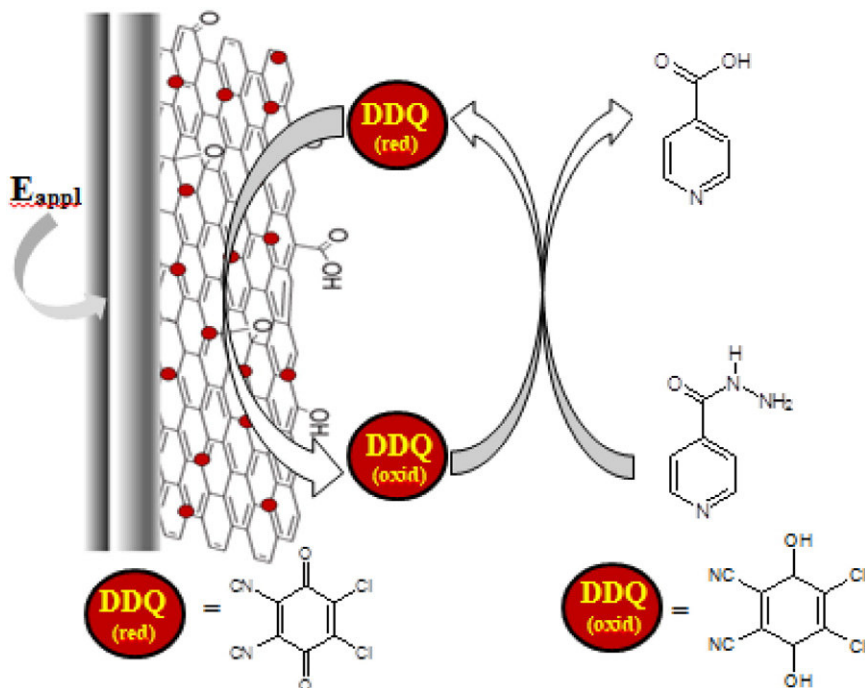
The voltammetric behavior of INH was verified at various electrodes in the potential range of 0.1 to 1.1 V vs Ag/AgCl in 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7.0. Initially, in order to test the electrocatalytic activity of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode, the CVs were obtained in the absence (Fig. 4A, curve 1) and presence of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4A, curve 2) and compared with the voltammogram of the bare electrode in the absence (Fig. 4A, curve 3) and presence of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4A, curve 4). In Fig. 4A, curve 1, a well-behaved redox couple for the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode can be observed referent to the redox process of the DDQ_(oxi)/DDQ_(red). Upon the addition of 0.1 mmol L⁻¹ INH, there is a dramatic enhancement of the anodic peak current and the cathodic peak current disappeared completely (Fig. 4A, curve 2), which is very characteristic of an electrocatalytic oxidation process [40].

The anodic peak potential for oxidation of INH at the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode occurs about 320 mV (Fig. 4A, curve 2) and at bare electrode, under identical conditions, the INH is oxidized at 980 mV (Fig. 4A, curve 4). So, a big decrease in overpotential and an enhancement of peak current are achieved with the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode. In the absence of the INH (Fig. 4A, curve 3) no redox peak was observed for cyclic voltammogram of the bare electrode. Upon the addition of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4A, curve 4), there is a low anodic peak current when compared with the voltammogram of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode (Fig. 4A, curve 2). The oxidation potential of the INH on the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode was shifted about 660 mV vs Ag/AgCl toward less positive values in comparison to unmodified electrode, and presenting a peak current higher than that measured at unmodified electrode.

To distinguish the contribution of individual components of the composite material (DDQ/rGO) and the potential synergistic effects among them, control experiments on the DDQ/Nafion® modified electrode in the absence (Fig. 4B, curve 1) and presence of 0.1 mmol L⁻¹

INH (Fig. 4B, curve 2) and rGO/Nafion® modified electrode in the absence (Fig. 4B, curve 3) and presence of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4B, curve 4) were also carried out. In Fig. 4B, curve 1 (in the absence of INH) a redox couple at about 380 mV (anodic peak) and 300 mV vs Ag/AgCl (cathodic peak) was observed for cyclic voltammogram of the DDQ/Nafion® modified electrode. Upon the addition of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4B, curve 2), there is a poor enhancement of the anodic peak at 380 mV vs Ag/AgCl (same anodic peak potential of the DDQ/Nafion® modified electrode without the analyte), however, the oxidation potential of INH observed in Fig. 4B, curve 2 was about 600 mV vs Ag/AgCl less positive than the oxidation potential observed for the INH on the bare electrode (Fig. 4A, curve 4). Then, a big decrease in overpotential was also observed with the DDQ/Nafion® modified electrode, but with low sensitivity for the analyte. These results suggest that, probably, in the presence of the reduced graphene oxide, the DDQ/Nafion® is better distributed on the electrode by adsorption on the graphene sheets. Fig. 4B shows also the CVs of the rGO/Nafion® modified electrode in the absence (Fig. 4B, curve 3) and presence (Fig. 4B, curve 4) of 0.1 mmol L⁻¹ INH. In the absence of INH any redox process for the rGO/Nafion® modified electrode is not observed. However, upon the addition of 0.1 mmol L⁻¹ INH (Fig. 4B, curve 3), there is a better enhancement in the anodic peak current at about 320 mV vs Ag/AgCl when compared to the anodic peak current of INH obtained with the DDQ/Nafion® modified electrode (Fig. 4B, curve 2). However, this peak current is lower than the current observed with the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode. The high anodic current obtained with rGO/Nafion® can be related with the high conductivity of graphene which facilitates the electronic transfer between the analyte and the electrode surface [41]. In this sense, the presence of reduced graphene oxide is very important for a best response of INH at a low potential. As can be observed in these figures, when the DDQ and rGO were utilized individually (Fig. 4B, curves 2 and 3) each one exhibits a peak current with lower intensity than that observed for DDQ/rGO/Nafion® modified electrode (Fig. 4A, curve 2).

Therefore, the increase of the anodic current to INH on the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode cannot be only attributed to the amount of DDQ immobilized in the electrode surface, but it can also be due to the better distribution of this compound on the rGO in the Nafion®



Scheme 2. Proposed mechanism for the oxidation of INH on the modified electrode.

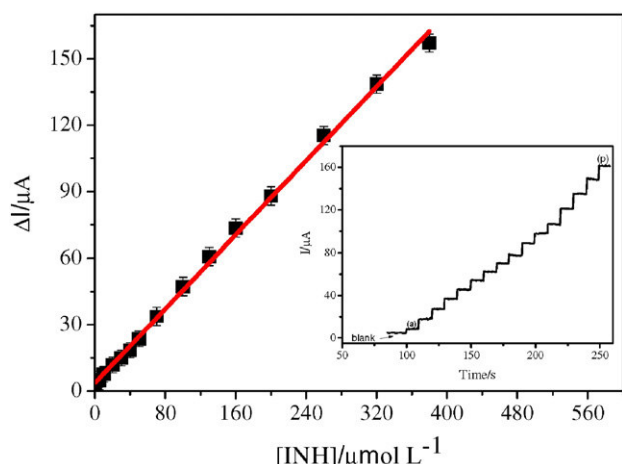


Fig. 7. Analytical curve for the oxidation of INH in 0.1 mol L⁻¹ PBS at pH 7.0 for the concentrations: (a) 0.5, (b) 1, (c) 5, (d) 10, (e) 20, (f) 30, (g) 40, (h) 50, (i) 70, (j) 100, (k) 130, (l) 160, (m) 200, (n) 260, (o) 320, (p) 380 μmol L⁻¹ of INH. Inset in this figure: amperometric i-t curve for the determination of INH at DDQ/rGO/Nafion® modified electrode. $E_{app} = 0.32$ V.

membrane. The integration of rGO and DDQ with the Nafion® membrane promotes a synergistic effect by using the good thermal/electron conductivity of graphene, the good electrocatalytic activity of DDQ distributed on the rGO, and the high stability/ionic conductivity of the Nafion® and graphene, toward the electrooxidation of isoniazid.

In order to check the number of electrons involved in INH oxidation on the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode cyclic voltametric experiments were carried out at several scan rates. Fig. 5 shows the CVs to DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7, containing 0.1 mmol L⁻¹ of INH at different scan rates. The INH peak current depends on the scan rate, as expected for a totally irreversible process. Therefore, a plot of cathodic peak current I_{pa} versus the square root of the potential scan rate $v^{1/2}$ (inset of Fig. 5) was constructed, and it resulted in a straight line ($Y/A = 1.2 \times 10^{-6} + 25.9 \times 10^{-6} \times (V s^{-1})^{1/2}$, $r^2 = 0.997$), suggesting that the process is controlled by mass transport. Hence, the number of electrons n involved in the overall reaction can be obtained from the slope of the I_{pc} versus $v^{1/2}$ plot according to the following equation for a totally irreversible process controlled by diffusion [36]:

$$I_p = (2.99 \times 10^5) [(1-\alpha)na]^{1/2} nAC_0^* D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

where I_p is the peak current in A, n_a represents the number of electrons involved in the rate-determining step (in this case the n_a value used was 1), n the number of total electrons involved in the reaction of the electroactive specie in $cm^2 s^{-1}$, A , the area in cm^2 , C_0^* in mol cm^{-3} is the concentration of the electroactive specie, and v is the potential scan rate in $V s^{-1}$. The numerical value 2.99×10^5 is given in $C mol V^{1/2}$. The diffusion coefficient to INH used was $3.6 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ [42,43].

The approach utilized to get the value of α for INH oxidation was based on the difference between the peak potential (E_p) and the potential where the current is at half the peak value ($E_{p/2}$), according to the following equation [36]:

$$1-\alpha = \frac{47.7 \text{ mV}}{E_p - E_{p/2}} \quad (2)$$

In this sense, the value of α calculated was 0.892 and the value of n determined was 2.05 suggesting an electron transfer mechanism of two electrons for the electrocatalytic oxidation of INH. This value is according to those determined by other researches [16,20].

The influence of the solution pH on the electrochemical response of INH using 0.1 mol L⁻¹ PBS buffer at pH 5, 5.5, 6, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 was also investigated (Fig. 6). The experimental results indicate that pH has a significant influence on the values of the anodic peak current (Fig. 6A) and peak potential (Fig. 6B). According to Fig. 6A, at pH 7.0 the peak current gives a maximum due, supposedly, to the better charge transfer of the DDQ/rGO material on the electrode surface facilitating the electron transfer between the electrode surface and the analyte in solution, thus the optimum pH for further studies was fixed at 7.0.

The anodic peak potential (E_{pa}) shifted to negative potentials with an increase of pH values (Fig. 6B). The E_{pa} values shift linearly with changes in pH values with a correlation coefficient of 0.998. The linear correlation obtained between the pH 5.0 and 8.0 showed a slope of -0.054 V/pH. This slope is close to that expected for an electrode reaction which is 0.059 V/pH at 25 °C. In addition, the number of electrons determined in the oxidation of isoniazid in this work was two electrons. In this sense, there is only one possibility for pH between 5.0 and 8.0. The number of proton involved in this process should be two, or 0.059 (n_p/n_e) V/pH where n_p and n_e involved in the electrode process ($n_p = n_e = 2$).

The effect of the buffer solution on the peak current with the sensor for INH was also investigated. Fig. 6C shows the response of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode in different buffer solutions, such as: Britton-Robinson (BR), Hepes, MacIlvaine and Phosphate (PBS) at

Table 1

Comparison of analytical parameters of isoniazid at DQ/rGO/Nafion®/GCE with other modified electrodes.

Electrode	E_{ox} (V)	Electrolyte/pH	Sensibility ($\mu A \mu mol^{-1} L$)	Linear range ($\mu mol L^{-1}$)	LOD ($\mu mol L^{-1}$)	Ref.
GCE	0.15 (SCE)	NaOH/13.0	0.17	0.025–1000	0.0041	[7]
SPCE/NPAg-HCF	0.45 (Ag/AgCl)	KNO ₃ /3.0	–	5–500	2.6	[8]
CNT-TCPE	1.00 (Ag/AgCl)	Acetate/4	0.0847	1–100	0.5	[12]
RGO-Au/GCE	0.195 (SCE)	PBS/7	0.135	0.1–100	0.01	[13]
RGO-Au/GCE	0.195 (SCE)	PBS/7	0.045	100–1000	0.01	[13]
Nafion-OMC/GCE	0.20 (Ag/AgCl)	PBS/7	0.031	0.1–370	0.084	[17]
GC/Na ⁺ -bt/Fe(dmbpy) ^{3/2+}	0.80 (SCE)	Na ₂ SO ₄	0.009	10–1000	0.8	[19]
Rh/GCE	0.70 (Ag/AgCl)	PBS/7	0.011	70–1300	13	[20]
FTO/Co(OH) ₂	0.40 (Ag/AgCl)	KOH	0.091	1–1000	0.445	[21]
Au nanoparticle	0.01 (Ag/AgCl)	PBS/9.8	0.004	10–100	0.1	[22]
RGO/GCE	0.307 (Ag/AgCl)	PBS/7	0.31	2–70	0.17	[41]
DDQ/rGO/Nafion®/GCE	0.32 (Ag/AgCl)	PBS/7	0.420	0.5–380	0.15	This work

OMC = ordered mesoporous (amperometry).

Rh/GCE = rhodium modified glassy carbon electrode (linear sweep voltammetry – LSV).

GC/Na⁺-bt/Fe(dmbpy)^{3/2+} = bentonite clay film coating on a glassy carbon electrode (chronoamperometry).

FTO/Co(OH)₂ = fluorine doped tin oxide electrodes modified with nanostructured alpha nickel hydroxide, cobalt oxihydroxide and mixed alpha nickel/cobalt hydroxide electrodes (amperometry).

CNT/TCPE = thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode (differential pulse voltammetry).

RGO/Au = glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide–Au nanomaterials (differential pulse voltammetry).

SPCE/NPAg-HCF = screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates (FIA with amperometric detection).

Table 2
Determination result of isoniazid in capsules by chronoamperometry employing the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode.

Samples (<i>n</i> = 5)	[Isoniazid] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[Isoniazid] ^a (mol L^{-1})	[Isoniazid] ^a (mg L^{-1})	Labeled value
A	2.90 (± 0.12)	1.45×10^{-3} (± 0.06)	198.80 (± 0.01)	200.00
B	3.19 (± 0.09)	1.60×10^{-3} (± 0.004)	218.74 (± 0.02)	200.00

^a Values obtained after considering the dilution factor for samples.

concentration of 0.1 mol L^{-1} , pH 7. The best response to INH at PBS may be associated to the high ionic mobility of the phosphate ions, making a possible better electronic transfer between the electrode and the solution. In this sense, the PBS was chosen for further experiments. In addition, the peak current was obtained by cyclic voltammetry in different concentrations of PBS: 0.025, 0.050, 0.10, 0.15 and 0.20 mol L^{-1} (data not showed). PBS concentrations from 0.1 up to 0.20 mol L^{-1} presented almost constant current. In this sense, the concentration of 0.1 mol L^{-1} was chosen for the further experiments.

As exposed, the catalytic oxidation of INH in the presence of DDQ/rGO can be clearly observed in the electrochemical response. The experiments showed that the DDQ/rGO composite material can act as a suitable mediator of the electron transfer during the oxidation of INH. The peak current of DDQ/rGO increased sharply in the presence of INH at low potential. Therefore, the mechanism suggested for the determination of INH is based on the following sequence of reactions:



The first reaction has occurred at the surface of glassy carbon electrode, then in the presence of INH, the oxidized mediator can oxidize INH and it is converted to its initial form, such as the peak current of DDQ oxidation increases in the presence of isoniazid. The rates of these two reactions are, however, not independent from each one and the prediction of the catalytic efficiency relies upon the relationship between them. The Scheme 2 shows the reduction and oxidation reactions of the analyte.

After optimization of experimental conditions, the analytical characteristics of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode were verified by amperometry. As the applied potential in the amperometric measurements contributes to the sensitivity of the system, an initial study was performed in order to determine the best potential to be applied to the electrode (0.28; 0.30; 0.32; 0.34; 0.36; and 0.38 V vs Ag/AgCl). The sensor response time was less than 1 s and the values of the currents observed for these potentials were respectively, $13.98 (\pm 0.05)$; $14.06 (\pm 0.02)$; $14.52 (\pm 0.03)$; $14.50 (\pm 0.08)$; $14.47 (\pm 0.11)$; and $14.45 (\pm 0.05)$ V. According to these results, high current values were

obtained between 0.32 and 0.38 V, such as the potential was set at 0.32 V (vs Ag/AgCl) for the further experiments.

The Fig. 7 shows the analytical curve and amperometric curve (*i* vs *t*) (inset of Fig. 7) recorded for the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode at a working potential of 0.32 V with successive additions of INH into the PBS. With the addition of INH, the current response quickly increases (time < 1 s). The fast response could be attributed to the fact that INH could diffuse into the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode and become easily oxidized on this material. With the increase of INH concentration, the anodic peak currents increase linearly with the INH concentration from 0.5 to $380 \mu\text{mol L}^{-1}$, with $r^2 = 0.999$. The linear regression equations can be expressed in the following equation:

$$\Delta I/\mu\text{A} = 3.921(\pm 0.750) + 0.420(\pm 0.004)[\text{INH}] (\mu\text{mol L}^{-1}). \quad (5)$$

Additionally, the chronoamperometric method resulted in limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values of $0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, with a signal-to-noise ratio (S/N) of 3.

Table 1 provides some analytical parameters obtained with different modified electrodes which appears in the recent literature applied to the determination of isoniazid. As shown in Table 1, the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode shows a wide linear range, excellent sensitivity and low LOD to INH determination at neutral pH conditions in comparison to earlier reports.

The relative standard deviation (R.S.D.) for seven determinations of 0.1 mmol L^{-1} INH was 4.65%. Additionally, a series of four sensors was prepared in the same manner and tested at PBS, pH 7.0, containing 0.1 mmol L^{-1} INH and gave responses with a relative standard deviation of 4.87%. These results indicate that the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode has good stability and repeatability, probably due to the ability of graphene in fixing DDQ compound on the electrode surface in a stable and reproducible way.

The stability of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode was checked in the presence of 0.1 mmol L^{-1} INH performing successive voltammetric measurements in 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 7.0). After 100 voltammetric measurements no change was observed in the response of the modified electrode. When the modified electrode was stored at room temperature no significant change in the response was observed for more than one month.

Table 3
Study of the selectivity of the proposed sensor with possible interfering in pharmaceutical samples containing isoniazid.

Samples (<i>n</i> = 5)	[Interfering compound] ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)	[INH] added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[INH] expected ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[INH] found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Relative response (%)
A ^a [INH] = $2.90 \mu\text{mol L}^{-1}$	Ascorbic acid	1.00	3.90	$3.86 (\pm 0.05)$	99.00
	Hydrazine	1.00	3.90	$3.94 (\pm 0.01)$	101.00
	Thiosulfate	1.00	3.90	$3.86 (\pm 0.02)$	99.00
	Rifampicin	1.00	3.90	$3.84 (\pm 0.04)$	98.46
	Magnesium stearate	1.00	3.90	$3.87 (\pm 0.03)$	99.23
B ^a [INH] = $3.19 \mu\text{mol L}^{-1}$	Ascorbic acid	1.00	4.19	$4.18 (\pm 0.02)$	99.76
	Hydrazine	1.00	4.19	$4.19 (\pm 0.04)$	100.00
	Thiosulfate	1.00	4.19	$4.17 (\pm 0.01)$	99.52
	Rifampicin	1.00	4.19	$4.13 (\pm 0.03)$	98.60
	Magnesium stearate	1.00	4.19	$4.16 (\pm 0.02)$	99.28

^a Values obtained without considering the dilution factor for samples.

3.4. Determination of INH in drug samples, selectivity and recovery studies

The determination of INH in drug samples was realized using both the calibration curve and standard addition method. The results obtained for both methods were the same. The determination of INH in the samples was taken in 5.0 mL of 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7 containing 10 µL sample. Thus, successive injections of INH standard solution into PBS were realized for determination of the analyte in the samples. The concentrations of INH in the drug samples are presented in Table 2. This table also shows a comparison between the proposed and the labeled value for drug samples. Applying a paired Student's-t test to compare these methods, we could observe that, at the 95% confidence level, there was no statistical difference between the reference and the results.

In addition, to investigate the possibility of applying amperometric detection to the determination of INH in pharmaceutical formulations, a study was carried out for determining the matrix effect on the amperometric response. The concentration of isoniazid in the pharmaceutical formulations was determined from the calibration curves. The quantified sample values are found to be in close agreement with the claimed amounts as summarized in Table 3. The recoveries obtained were 99.0–101.0% for INH, which clearly indicated the applicability and reliability of the proposed method.

The good recovery results clearly show that excipients presented in capsules do not significantly interfere with the analysis. Thus the proposed method might be a promising tool for the detection of isoniazid in real samples.

4. Conclusions

The results obtained in the present study demonstrate a proficient catalytic activity and excellent performance of the DDQ/rGO/Nafion® modified electrode for the electrochemical determination of isoniazid, including good repeatability, high selectivity, excellent sensitivity and low detection limit. Besides, it is a promising analytical tool, which can be used as a sensor for detecting isoniazid in pharmaceutical applications, a simple and rapid way in comparison to other electroanalytical methods proposed in the literature.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCTBio and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA).

References

- [1] S.M.A. Mashhadi, U. Yunus, M.H. Bhatti, M.N. Tahir, Isoniazid cocrystals with anti-oxidant hydroxy benzoic acids, *J. Mol. Struct.* 1076 (2014) 446–452.
- [2] K.C. Chang, C.C. Leung, W.W. Yew, S.L. Chan, C.M. Tam, Dosing schedules of 6-month regimens and relapse for pulmonary tuberculosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174 (2006) 1153–1158.
- [3] A.M. El-Brash, S.M. El-Ashry, Colorimetric and titrimetric assay of isoniazid, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 421–426.
- [4] H.I. Seifart, W.L. Gent, D.P. Parkin, P.P. van Jaarsveld, P.R. Donald, High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids, *J. Chromatogr. B* 674 (1995) 269–275.
- [5] P. Prajapati, Y.K. Agrawal, SFC-MS/MS for identification and simultaneous estimation of the isoniazid and pyrazinamide in its dosage form, *J. Supercrit. Fluids* 95 (2014) 597–602.
- [6] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium (IV) in a multicommutated flow system, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 17–23.
- [7] M.S.M. Quintino, L. Angnes, Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 400–404.
- [8] P.R. Oliveira, M.M. Oliveira, A.J.G. Zarbin, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles, *Sensors Actuators B Chem.* 171–172 (2012) 795–802.
- [9] J. Mendiskaia, S. Garmonov, J. Kozak, M. Wiecek, V. Andrich, P. Kóscielniak, A. Bulatov, Stepwise injection determination of isoniazid in human urine samples coupled with generalized calibration method, *Microchem. J.* 123 (2015) 111–117.
- [10] H. Zhang, L. Wu, Q. Li, X. Du, Determination of isoniazid among pharmaceutical samples and the patients' saliva samples by using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent, *Anal. Chim. Acta* 628 (2008) 67–72.
- [11] M.S. Kamel, Spectrophotometric determination of isoniazid in pure form and pharmaceutical preparation, *World J. Chem.* 3 (2008) 11–16.
- [12] S. Shahrokhian, E. Asadian, Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 666–672.
- [13] Z. Guo, Z.Y. Wang, H.H. Wang, G.Q. Huang, M.M. Li, Electrochemical sensor for isoniazid based on the glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide-Au nanomaterials, *Mater. Sci. Eng. C* 57 (2015) 197–204.
- [14] U.P. Azad, V. Ganesan, Efficient electrocatalytic oxidation and selective determination of isoniazid by Fe(tmphen)₃³⁺-exchanged Nafion®-modified electrode, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 2907–2911.
- [15] N.F. Atta, A. Galal, R.A. Ahmed, Voltammetric behavior and determination of isoniazid using PEDOT electrode in presence of surface active agents, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 5097–5113.
- [16] X. Zhu, J. Xu, X. Duan, L. Lu, K. Zhang, Y. Yu, H. Xing, Y. Gao, L. Dong, H. Sun, T. Yang, Controlled synthesis of partially reduced graphene oxide: enhance electrochemical determination of isoniazid with high sensitivity and stability, *J. Electroanal. Chem.* 757 (2015) 183–191.
- [17] X. Yan, X. Bo, L. Guo, Electrochemical behaviors and determination of isoniazid at ordered mesoporous carbon modified electrode, *Sensors Actuators B* 155 (2011) 837–842.
- [18] J. Tong, X.J. Dang, H.L. Li, Electrochemical oxidation of isoniazid catalyzed by the 2,2,6,6-Tetramethyl-4-acetyl-piperidine-1-oxy radical and its analytical application, *Electroanalysis* 9 (1997) 165–168.
- [19] U.P. Azad, N. Prajapati, V. Ganesan, Selective determination of isoniazid using bentonite clay modified electrodes, *Bioelectrochem.* 101 (2015) 120–125.
- [20] S. Cheemalapati, S.M. Chen, M.A. Ali, F.M.A. Al-Hemaid, Enhanced electrocatalytic oxidation of isoniazid at electrochemically modified rhodium electrode for biological and pharmaceutical analysis, *Colloids Surf. B* 121 (2014) 444–450.
- [21] P.R. Martins, L.M.C. Ferreira, K. Araki, L. Angnes, Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid, *Sensors Actuators B* 192 (2014) 601–606.
- [22] B.K. Jena, C.R. Raj, Au nanoparticle decorated silicate network for the amperometric sensing of isoniazid, *Talanta* 80 (2010) 1653–1656.
- [23] H. Yan, H. Xiao, Q. Xie, J. Liu, L. Sun, Y. Zhou, Y. Zhang, L. Chao, C. Chen, S. Yao, Simultaneous electroanalysis of isoniazid and uric acid at poly (sulfosalicylic acid)/electroreduced carboxylated graphene modified glassy carbon electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 207 (2015) 167–176.
- [24] M. Pumera, Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: review, *Electrochem. Commun.* 36 (2013) 14–18.
- [25] A.M. Pinto, I.C. Gonçalves, F.D. Magalhães, Graphene-based materials biocompatibility: a review, *Colloids Surf. B* 111 (2013) 188–202.
- [26] E.T. Vilela Junior, R.C.S. Carvalho, S. Yotsumoto Neto, R.C.S. Luz, F.S. Damos, Exploiting charge/ions compensating processes in PANI/SPANI/reduced graphene oxide composite for development of a high sensitive H₂O₂ sensor, *J. Electroanal. Chem.* 752 (2015) 75–81.
- [27] R.M. Oliveira, N.G. Santos, L.A. Alves, K.C.M.S. Lima, L.T. Kubota, F.S. Damos, R.C.S. Luz, Highly sensitive p-nitrophenol determination employing a new sensor based on N-Methylphenazonium methyl sulfate and graphene: Analysis in natural and treated waters, *Sensors Actuators B* 221 (2015) 740–749.
- [28] J.F. Wu, M.Q. Xu, G.C. Zhao, Graphene-based modified electrode for the direct electron transfer of cytochrome c and biosensing, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 175–177.
- [29] M.A. Zayed, S.M. Khalil, H.M. El-qudaby, Spectrophotometric study of the reaction mechanism between DDQ π- and iodine σ-acceptors and chloroquine and pyrimethamine drugs and their determination in pure and in dosage forms, *Spectrochim. Acta A* 62 (2005) 461–465.
- [30] M. Pandeewaran, K.P. Elango, Spectroscopic and kinetic studies on the interaction of ketoconazole and povidone drugs with DDQ, *Spectrochim. Acta A* 69 (2008) 1082–1088.
- [31] A. Al-Badr, G.A.H. Mostafa, Spectrophotometric determination of trimipramine in tablet dosage form via charge transfer complex formation, *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 1057–1063.
- [32] G.M.M. Ferreira, F.M. Oliveira, F.R.F. Leite, C.M. Maroneze, L.T. Kubota, F.S. Damos, R.C.S. Luz, DNA and graphene as a new efficient platform for entrapment of methylene blue (MB): studies of the electrocatalytic oxidation of b-nicotinamide adenine dinucleotide, *Electrochim. Acta* 111 (2013) 543–551.
- [33] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339.
- [34] M.P. Siswana, K.I. Ozoemena, T. Nyokong, Electrocatalysis of asulam on cobalt phthalocyanine modified multi-walled carbon nanotubes immobilized on a basal plane pyrolytic graphite electrode, *Electrochim. Acta* 52 (2006) 114–122.
- [35] J. Wang, Analytical Electrochemistry, VCH Publishers Inc., New York, 1994.
- [36] J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2001.
- [37] H.L. Guo, X.F. Wang, Q.Y. Qian, F.B. Wang, X.H. Xia, A green approach to the synthesis of graphene nanosheets, *J. Am. Chem. Soc.* 3 (2009) 2653–2659.
- [38] L. Shahriari, A.A. Athawale, Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach, *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.* 2 (2014) 58–63.
- [39] M.S. Refat, G.G. Mohamed, A. Fathi, Spectrophotometric determination of sildenafil citrate drug in tablets. Spectroscopic characterization of the solid charge transfer complexes, *Bulg. Chem. Commun.* 45 (2013) 250–262.
- [40] R.C.S. Luz, F.S. Damos, A.A. Tanaka, L.T. Kubota, Y. Gushikem, Electrocatalytic activity of 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone/multiwalled carbon nanotubes composite

- on edge plane pyrolytic graphite electrode for oxidation NADH, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4706–4714.
- [41] S. Cheemalapati, S. Palanisamy, S.M. Chen, Electrochemical determination of isoniazid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013) 3953–3962.
- [42] M.R. Majidi, A. Jouyban, K. Asadpour-Zeynali, Voltammetric behavior and determination of isoniazid in pharmaceuticals by using overoxidized polypyrrole glassy carbon modified electrode, *J. Electroanal. Chem.* 589 (2006) 32–37.
- [43] M.A. Karimi, A. Hafezi-Mehrjardi, M. Mazloum-Ardakani, R. Behjatmanesh-Ardakani, M.H. Mashhadizadeh, S. Sargazi, Study of electrocatalytic oxidation of isoniazid drug using alizarin red S a mediator on the glassy carbon electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 5 (2010) 1634–1648.