

# Determinação de cloroquina utilizando método alternativo simples a base de eletrodos modificados com *Carbon Black*

DOI: 10.5281/zenodo.14775871

Pedro Henrique Carvalho Lima <sup>a\*</sup>

Chloroquine is a drug used to treat a variety of diseases that, despite being effective, has several side effects, from insomnia to heart problems, or even death. There are different methods for detecting this substance, but most of them are expensive and require qualified professionals to perform them. This article presents an alternative method that is relatively simple and as effective as those that already exist in the world today, which has advantages over existing methods, and which shows promise in determining chloroquine in different analyses.

A cloroquina é um medicamento utilizado para o tratamento de diversas doenças que, apesar de eficaz, apresenta vários efeitos colaterais, desde insônia a problemas cardíacos, ou até mesmo a morte. Existem diferentes métodos que detectam essa substância, porém, a grande maioria deles é caro e necessita de profissionais qualificados para sua realização. Este artigo apresenta um método alternativo relativamente simples e tão eficaz quanto os que já existem no mundo atualmente, que apresenta benefícios em relação aos métodos já existentes e que se mostra promissor na determinação de cloroquina em diferentes análises.

<sup>a</sup>Universidade de Brasília (UnB). Campus Darcy Ribeiro. Instituto de Química (IQ/UnB).

\*E-mail: phclima3101@gmail.com

**Palavras-chave:** Cloroquina; *carbon black*; eletrodos; quimioluminescência; eletroquimioluminescência.

Recebido em 03 de janeiro de 2025,

Aprovado em 15 de janeiro de 2025,

Publicado em 31 de janeiro de 2025.

## Introdução

Sintetizada pela primeira vez em 1934, a cloroquina é um fármaco derivado da 4-aminoquinolina.<sup>1</sup> Esse medicamento é utilizado principalmente no tratamento de Malária, uma doença infecciosa causada pelo protozoário parasita do gênero *Plasmodium*.<sup>2,3</sup> Apesar da sua eficácia, o medicamento apresenta diversos efeitos adversos que, dependendo do caso, podem até levar o usuário a morte.<sup>4</sup>

Atualmente, existem diferentes métodos para a determinação desse fármaco, métodos estes que são bastante eficazes, como o de cromatografia líquida. Porém, quase todos eles apresentam características que aumentam seu valor, como a necessidade de profissionais qualificados para fazer as análises e instrumentação de ponta. Além disso, a grande maioria deles utiliza uma grande quantidade de reagentes, passam por uma complicada etapa de preparo de amostras e as análises demoram um tempo considerável.

Por isso, alternativas mais baratas e viáveis vêm sendo estudadas para contribuir com a ciência na determinação desse fármaco, alternativas essas que não possuem todas as necessidades específicas que os outros métodos apresentam e entregam a mesma qualidade de análise, senão até melhores.

A eletroquimioluminescência (ECL, sigla em inglês para *electrogenerated chemiluminescence*) é um método promissor que apresenta ótimos resultados. Ele junta o melhor da eletroquímica com os benefícios da quimioluminescência. Os métodos eletroquímicos são bem mais baratos que os outros métodos e tão sensíveis e precisos quanto eles, sem contar que são mais simples e demoram menos. Eles geralmente funcionam a partir da indução de um processo de oxidação ou redução em um sistema a partir da aplicação de uma diferença de potencial. Além disso, alterando essa diferença de potencial, também pode ser induzida a quimioluminescência em alguns sistemas. Fazendo isso, há um melhor controle do começo, meio e fim da reação.<sup>5</sup>

Logo, os métodos baseados em ECL funcionam a partir da excitação dos elétrons do composto a ser analisado por uma diferença de potencial, gerando a emissão de luz.<sup>6</sup> Além de barato e simples, esse método apresenta poucos problemas que afetam seu desempenho, problemas estes que podem ser resolvidos facilmente.

Outro fator que contribuiu para que o método criado por Pacheco e colaboradores fosse mais barato e eficiente foi a utilização de eletrodos serigrafados modificados com *Carbon Black* (CB), que proporciona uma alta e efetiva performance

em análises eletroquímicas.<sup>7,8</sup> De acordo com as pesquisas de Pacheco e colaboradores, esse é o primeiro método baseado na utilização da ECL para determinação de cloroquina utilizando eletrodos serigrafados modificados com *Carbon Black*.<sup>7</sup>

Metodologia

O método funciona a partir da interação da cloroquina com o luminóforo de cloreto de tris(2,2'-bipiridina)rutênio(II) hexahidratado ([Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). A detecção é feita utilizando um eletrodo serigrafado modificado com CB.<sup>7</sup>

A Tabela 1 mostra os reagentes utilizados durante o processo. Diariamente, Pacheco e colaboradores preparavam soluções de difosfato de cloroquina em uma solução tampão de fosfato a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em pH = 7. O tampão McIlvaine (também conhecido como tampão citrato-fosfato<sup>9</sup>) utilizado foi preparado utilizando fosfato dissódico e ácido cítrico, ambos a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Todas as soluções utilizadas foram preparadas utilizando água deionizada, assim como as dispersões de CB.<sup>7</sup>

Tabela 1. Reagentes utilizados durante o procedimento. Extraído da referência 7.

| Reagentes   |   |
|---|---|
| Difosfato de cloroquina                                   | Creatinina  |
| Ofloxacina  | Ureia   |
| Cloreto de tris(2,2'-bipiridina)rutênio(II) hexahidratado | Ácido Cítrico   |
| Fosfato monopotássico                                     | Sulfato de amônio   |
| Fosfato dissódico   | Sulfato de sódio  |
| Cloreto de sódio  | Carbon Black  |
| Hexacianoferrato(III) e Hexacianoferrato(IV)              | Cloreto de cálcio   |
| PIPES (ácido 1,4-piperazinedietanosulfônico)              | HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico) |

A caracterização do CB nos eletrodos serigrafados modificados foi feita utilizando um microscópio de varredura eletrônica (MEV) e as imagens foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico da marca Zeiss, modelo EVO HD. Também foram feitas análises utilizando espectroscopia Raman por um espectroscópio da empresa Horiba-Jobin-Yvon, modelo T64000. As amostras de eletrodos foram analisadas a partir de sua excitação utilizando um laser com uma resolução espectral de 2 cm<sup>-1</sup> com número de onda igual a 532 nm.<sup>7</sup>

Para as medidas eletroquímicas e de ECL, Pacheco e colaboradores modificaram os eletrodos serigrafados utilizando 10 µL de uma dispersão de CB, que foi preparada dispersando 5 mg de CB em 500 µL de água deionizada. Os eletrodos modificados foram secos a temperatura ambiente antes do processo de medição por ECL.<sup>7</sup> A área de superfície ativa desses eletrodos foi determinada utilizando a Equação 1, conhecida como uma fórmula geral da equação de Randles-Sevcik.<sup>7,10</sup> Pacheco e colaboradores utilizaram hexacianoferrato(III) e hexacianoferrato(IV) a 5 mmol.L<sup>-1</sup> para a reação redox em cloreto de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

j\_{max}^{ox,red} = j\_0 + A \cdot \left( \frac{scan\ rate}{mv/s} \right)^x \tag{1}

As curvas de potencial ECL de Pacheco e colaboradores foram feitas utilizando voltametria cíclica e voltametria de varredura linear. Elas foram obtidas em uma faixa de potencial de 0,1 a 1,6 V a uma taxa de varredura de 0,1 V.s<sup>-1</sup>, utilizando um eletrólito de suporte constituído por uma mistura da solução de difosfato de cloroquina com a solução de [Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, usando 20 µL de cada.<sup>7</sup>

Pacheco e colaboradores avaliaram os efeitos das concentrações de [Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1,5 a 25,0 mmol.L<sup>-1</sup>) e do CB (1,0 a 10,0 mg.mL<sup>-1</sup>) na resposta de ECL, bem como o impacto do pH (6,0 a 9,0) em solução tampão de fosfato a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Também foram comparados diferentes tampões (HEPES, PIPES, MacIlvaine e fosfato) na determinação da cloroquina. Para a construção da curva analítica, 20 µL do luminóforo foram misturados com 20 µL de difosfato de cloroquina em diversas concentrações. Após isso, essas misturas foram aplicadas a uma célula de ECL com eletrodo modificado por CB, medindo-se o sinal de ECL correspondente.<sup>7</sup>

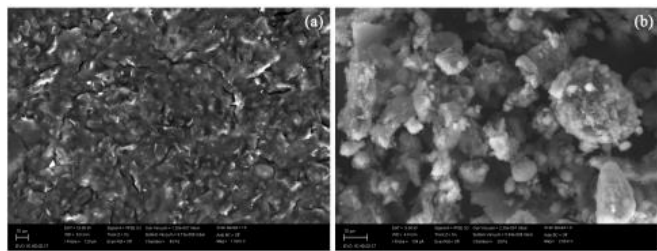
O grupo também analisou amostras de cloroquina utilizadas no tratamento de malária e amostras de urina artificial preparadas por eles. Quatro comprimidos contendo 150 mg de cloroquina foram macerados, divididos em quatro porções e diluídos em tampão fosfato com pH igual a 7. As soluções resultantes foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e completadas até a marca com tampão fosfato para análise de ECL. Pacheco e colaboradores realizaram estudos de adição e recuperação de cloroquina misturando 10 µL das soluções feitas anteriormente com mais 10 µL de uma solução padrão do fármaco e 20 µL da solução do luminóforo, obtendo diferentes concentrações para análise.<sup>7</sup> Já as amostras de urina artificial, com pH ajustado para 6,6 (±

0,1), foram preparadas e diluídas em água deionizada (10 mL de água para cada 1 mL de urina artificial). Pacheco e colaboradores prepararam uma solução contendo 10 µL da solução de cloroquina e 50 µL da solução diluída de urina. Após isso, pipetou-se 20 µL dessa solução em 20 µL da solução do complexo de rutênio. Essa amostra foi analisada utilizando os eletrodos serigrafados de CB.<sup>7</sup>

Resultados e discussão

Analisando as imagens obtidas por MEV na caracterização do CB nos eletrodos modificados e comparando com imagens de eletrodos não-modificados, Pacheco e colaboradores concluíram que a superfície do eletrodo modificado com CB é mais rugosa que a superfície do eletrodo comum. A Figura 1 mostra as duas imagens dos eletrodos lado a lado. Percebe-se que as partículas de CB no eletrodo modificado (Figura 1b) formam agregados na superfície do eletrodo, com uma boa distribuição.<sup>7</sup>

Figura 1. Imagens obtidas no MEV dos eletrodos modificados com CB e de eletrodos comuns. Extraído da referência 7.



O espectro Raman feito por Pacheco e colaboradores apresenta bandas em 1325 e 1577 cm<sup>-1</sup>, correspondendo às bandas D e G do *Carbon Black* utilizado, respectivamente. A banda D está associada a átomos de carbono com hibridização sp<sup>3</sup>, indicando defeitos estruturais no CB.<sup>7</sup>

Analisando agora a banda G, que corresponde aos átomos de carbono sp<sup>2</sup> em uma rede hexagonal típica do grafite, associada ao modo de tensão da ligação C=C. A intensidade das bandas D e G varia conforme o tipo de material, refletindo o grau de grafitização, que pode ser avaliado pela razão integral I<sub>d</sub>/I<sub>g</sub>. No CB, um valor de aproximadamente 1,75 indica alto grau de grafitização, favorecendo a exposição de planos de borda, enquanto o eletrodo não modificado apresentou I<sub>d</sub>/I<sub>g</sub> em torno de 1,23, sugerindo menor grafitização.<sup>7</sup>

Além disso, duas bandas adicionais (~1200 cm<sup>-1</sup> e ~1500 cm<sup>-1</sup>) foram atribuídas a defeitos na estrutura do CB. A banda em ~1200 cm<sup>-1</sup> está associada a componentes hidrocarbonetos ou grupos alifáticos, enquanto a de ~1500 cm<sup>-1</sup> reflete uma mistura de carbonos sp<sup>3</sup> em anéis sp<sup>2</sup>. O grau de amorfismo do CB pode ser estimado pela razão de intensidade entre a banda de ~1500 cm<sup>-1</sup> e a banda G.

A Figura 2 mostra os resultados das análises voltamétricas feitas com as soluções de cloroquina e a mistura de cloroquina com o luminóforo de cloreto de tris(2,2'-bipiridina)rutênio(II) hexahidratado utilizando os eletrodos modificados com CB e eletrodos não-modificados. A Tabela 2 especifica os resultados obtidos.

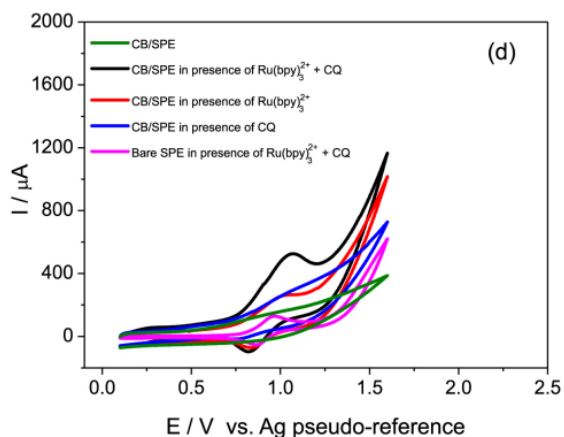
Tabela 2. Resultados das análises voltamétricas. Extraído da referência 7.

| Amostra  | Cor      | Potenciais redox (em Volts)                            |
|--|----------|--|
| Eletrodo modificado com CB   | Verde    | -  |
| Eletrodo modificado com CB na presença do luminóforo e de cloroquina | Preto    | 1,06 e 0,83  |
| Eletrodo modificado com CB na presença do luminóforo                 | Vermelho | 0,97 (oxidação do luminóforo) e 0,87 (redução)         |
| Eletrodo modificado com CB na presença de cloroquina                 | Azul     | Entre 0,9 e 1,2 (oxidação da cloroquina)               |
| Eletrodo não-modificado na presença do luminóforo e de cloroquina    | Rosa     | Resultados parecidos com o segundo analito (cor preta) |

A corrente anódica obtida na análise voltamétrica utilizando o eletrodo modificado com CB na presença de cloroquina foi de aproximadamente 20 µA. Para a análise voltamétrica utilizando o eletrodo modificado com CB na presença somente do luminóforo de rutênio, a corrente anódica obtida resultou em valores entre 62 e -64 µA. Já para o eletrodo

modificado com CB na presença do luminóforo e de cloroquina, os resultados foram de cerca de 180 e -45  $\mu\text{A}$  para as correntes de pico anódicas e catódicas, respectivamente.<sup>7</sup>

**Figura 2.** Resultado das análises voltamétricas. Extraído da referência 7.



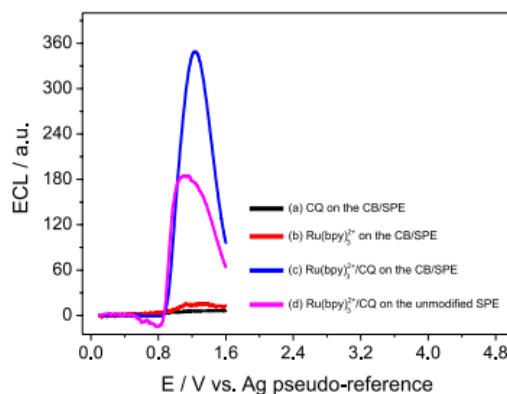
Pacheco e colaboradores também fizeram uma análise voltamétrica de um eletrodo não modificado na presença do luminóforo e de cloroquina, para comparar a efetividade. Os resultados obtidos foram bem parecidos com o resultado da análise feita com o eletrodo modificado com CB na presença do luminóforo e de cloroquina. Apesar disso, a curva anódica e catódica desse analito foram de -35 e 80  $\mu\text{A}$ , resultados mais baixos do que o eletrodo modificado na presença da mesma solução. De acordo com os pesquisadores, pode-se inferir que a interação entre os reagentes e o luminóforo é favorecida graças ao CB, aumentando assim a detecção de cloroquina.<sup>7</sup>

A Figura 3 apresenta curvas de potencial ECL para o eletrodo modificado com CB em uma solução de cloroquina (3a); para o eletrodo modificado em solução contendo o luminóforo de Rutênio (3b); para o eletrodo modificado na mistura de luminóforo e cloroquina (3c); e para um eletrodo não-modificado na mistura de luminóforo e cloroquina (3d). As curvas (a) e (b) mostram sinais de ECL de 2 e 8 a.u., respectivamente, para o eletrodo modificado em soluções de cloroquina e do complexo de rutênio.<sup>7</sup>

O sinal de ECL para o eletrodo modificado na mistura do luminóforo de rutênio e cloroquina foi de aproximadamente 295 a.u. a 1,3 V, enquanto no eletrodo não-modificado foi de 164 a.u. a 1,13 V. Isso indica que o CB é essencial para a detecção mais sensível de cloroquina, pois melhora a transferência eletrônica do eletrodo, aumentando a eficiência da reação entre o complexo de rutênio e o analito estudado.<sup>7</sup>

O mecanismo da reação no ECL envolve a oxidação inicial do luminóforo de rutênio e do correagente, que é a cloroquina. A cloroquina, quando oxidada, libera  $\text{H}^+$ , formando uma cloroquina com um elétron livre, uma espécie reativa, que interage com o luminóforo oxidado, gerando luz quando este retorna ao estado fundamental. Para uma emissão eficiente, é essencial que a cloroquina e o luminóforo tenham afinidade, caso contrário, não há sinal de ECL, inviabilizando a detecção.<sup>7</sup>

**Figura 3.** Curvas de potencial obtidas pelo ECL. Extraído da referência 7.



Pacheco e colaboradores também analisaram o efeito de diferentes concentrações do luminóforo (0.5; 1.5; 2.5; 5.0; 15.0 e 25.0  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) em uma amostra de cloroquina a 300  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  diluída em uma solução tampão de fosfato 0.1  $\text{mol.L}^{-1}$  com pH igual a 7.0 na análise de ECL, a uma taxa de varredura de 0.1  $\text{V.s}^{-1}$ . Em resumo, o sinal foi mais alto entre as concentrações de 0.5, 1.5 e 2.5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , atingindo o maior pico na concentração de 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , após isso, o sinal caiu drasticamente em concentrações maiores. Isso mostra que, em uma amostra com alta concentração de luminóforo, o complexo atrapalha a interação entre o eletrodo modificado e o correagente.<sup>7</sup>

Seguindo a mesma ideia anterior, Pacheco e colaboradores também analisaram o efeito do aumento da concentração de CB (1.0; 3.0; 5.0; 7.0; e 10.0  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) nos eletrodos modificados. Aqui, o resultado segue a mesma lógica do que foi visto anteriormente: o sinal aumenta entre as concentrações de 1.0 e 3.0  $\text{mg.mL}^{-1}$ , atingindo pico máximo na concentração de 5.0  $\text{mg.mL}^{-1}$ , e diminuindo o sinal em concentrações acima disso. Isso pode ser explicado pelo fato de que o aumento exagerado da concentração de CB dificulta a transferência eletrônica entre o eletrodo modificado e a solução analisada, diminuindo a intensidade do sinal.<sup>7</sup>

Por fim, os pesquisadores também analisaram em qual pH e em qual solução tampão a análise de ECL entrega o melhor resultado (sinal mais intenso). Pacheco e colaboradores concluíram que o pH do meio deve ser entre 6.0 e 7.0, quando há equilíbrio entre as concentrações de íons hidróxido e íons hidrônio; e que o melhor tampão a ser utilizado é o de fosfato, pois o tamanho pequeno do íon pode facilitar a interação da cloroquina com o eletrodo modificado.<sup>7</sup>

Com todos esses resultados em mãos, Pacheco e colaboradores otimizaram todos os parâmetros experimentais e iniciaram análise das amostras de tabletes de cloroquina e da urina artificial, para comprovar a eficiência do método proposto. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) das medições de ECL para a mistura de luminóforo e cloroquina usando o eletrodo modificado. As medições feitas no mesmo dia da preparação das soluções apresentaram um RSD de 0,92%, indicando boa precisão, enquanto medições em dias diferentes aos da preparação das soluções mostraram boa reprodutibilidade, com RSD de 2,12%.<sup>7</sup>

O método proposto foi aplicado a amostras dos tabletes de cloroquina com concentrações que variaram de 1 a 200 mg.L<sup>-1</sup> e a amostra de urina artificial preparadas no início do experimento. Os resultados mostraram porcentagens de concentração entre 100% e 103% para os comprimidos e entre 99% e 103% para as amostras de urina artificial, comprovando a boa precisão do método.<sup>7</sup>

## Conclusões

Pacheco e colaboradores apresentaram um método simples baseado em eletroquimioluminescência (ECL) para determinação de cloroquina em amostras de fármacos e fluidos biológicos. O eletrodo serigrafado modificado de *Carbon Black* (CB) mostrou boa precisão e exatidão. A espectroscopia Raman revelou alto grau de grafitização no carbono. Isso melhorou significativamente o desempenho eletroquímico do eletrodo modificado. O método demonstrou ampla faixa linear, precisão e exatidão em amostras de medicamentos para malária e urina artificial.

Conclui-se que o método de Pacheco e colaboradores baseado em ECL utilizando eletrodos modificados com CB é relativamente simples que utiliza materiais de baixo custo e que entrega resultados tão bons e precisos quanto os métodos que já existem atualmente.

## Contribuições por Autor

O artigo e a inclusão de algumas observações são de Pedro Henrique Carvalho Lima.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

## Agradecimentos

Ao grupo PET-Química/IQ/UnB/MEC, à Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SeSU/MEC) e ao Decanato de Ensino de Graduação (DEG/UnB) pelo apoio ao Programa de Educação Tutorial pela bolsa concedida. Ao Instituto de Química (IQ/UnB) e à Universidade de Brasília pelo suporte e espaço fornecidos.

## Notas e referências

- 1 Como árvore dos Andes levou à cloroquina, ao gín tônica e ao tratamento contra a malária, <https://www.bbc.com/portuguese/articles/cyrpj1d68n5o>, (acessado em 1 de janeiro de 2025).
- 2 M. K. Bhattacharjee, *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*, Springer International Publishing Imprint: Springer, Cham, 1st ed., 2016.
- 3 Malária, <https://portal.fiocruz.br/doenca/malaria>, (acessado em 1 de janeiro de 2025).
- 4 Chloroquine Oral, <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-8633/chloroquine-oral/details>, (acessado em 1 de janeiro de 2025).
- 5 A. J. Bard, L. R. Faulkner and H. S. White, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2022.
- 6 H. Ma, Y. Zhao, Y. Liu, Y. Zhang, D. Wu, H. Li and Q. Wei, A Compatible Sensitivity Enhancement Strategy for Electrochemiluminescence Immunosensors Based on the Biomimetic Melanin-Like Deposition, *Analytical Chemistry*, 2017, **89**, 13049–13053.
- 7 J. Pacheco, J. Brito, C. Dos Santos, C. Bezerra, F. Damos and R. Luz, A Simple Method for Determination of Chloroquine Based on Electrogenenerated Chemiluminescence, *Journal of the*



*Brazilian Chemical Society*, 10.21577/0103-5053.20230053.

- 8 V. Mazzaracchio, M. R. Tomei, I. Cacciotti, A. Chiodoni, C. Novara, M. Castellino, G. Scordo, A. Amine, D. Moscone and F. Arduini, Inside the different types of carbon black as nanomodifiers for screen-printed electrodes, *Electrochimica Acta*, 2019, **317**, 673–683.
- 9 T. C. McIlvaine, A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON, *Journal of Biological Chemistry*, 1921, **49**, 183–186.
- 10 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, Wiley, New York, 2nd ed., 2001.