

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

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ANALITOS DE
INTERESSE FARMACÊUTICO UTILIZANDO UM ELETRODO
DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Elen Julciléia Romão Sartori*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

***Bolsista CAPES**

SÃO CARLOS – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S251dv

Sartori, Elen Julciléia Romão.

Determinação voltamétrica de analitos de interesse farmacêutico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro / Elen Julciléia Romão Sartori. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
98 f.

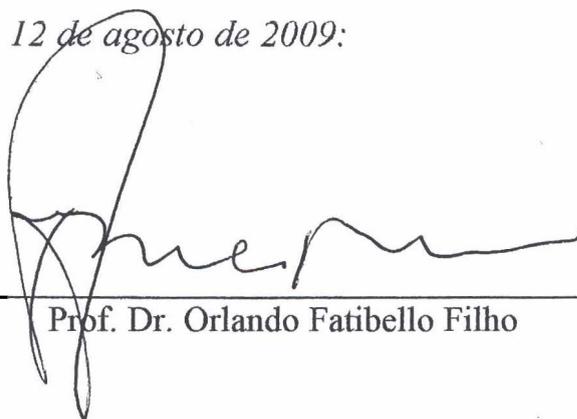
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Métodos eletroanalíticos. 2. Ácido acetilsalicílico. 3. Propranolol. 4. Atenolol. 5. Sildenafil. I. Título.

CDD: 543.0871 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

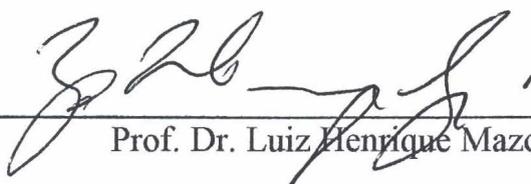
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Elen Julciléia Romão Sartori realizada em 12 de agosto de 2009:



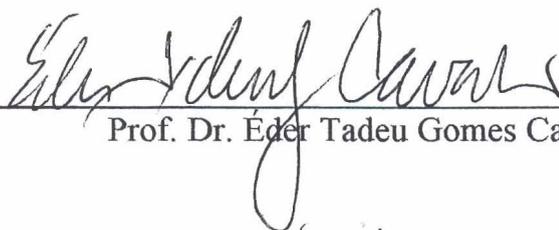
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



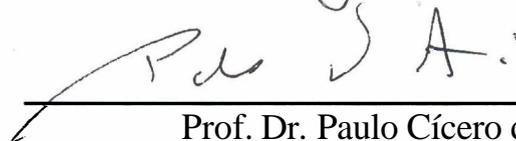
Prof. Dr. Mauro Bertotti



Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo



Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro



Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Aos meus pais João e Helena, pelo exemplo de retidão e princípios.

Suporte que me movimenta.

Amo vocês!

*À minha irmã Cássia,
meu irmão Adalberto e a minha cunhada Adriana,
sempre presentes, o meu amor.*

*Ao Professor Dr. Eduardo Almeida Neves,
pela orientação preciosa, acolhimento afetuoso, confiança e
acima de tudo, pela amizade. Pelo sábio ensinamento de que a humildade e o
conhecimento podem andar de mãos dadas.
Conhecê-lo foi um acontecimento especial.
Foi um privilégio tê-lo tido como orientador e amigo.
Saudades!*

*À Maria Inês Neves. Por tudo!
A amizade, a confiança e o apoio foram imprescindíveis,
na dose certa, no momento certo!*

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(Fernando Pessoa)

Agradeço,

A Deus, pelas oportunidades que surgiram em minha vida e por ter sempre conduzido meus passos em toda a minha caminhada, iluminando e dando-me forças para seguir em frente.

Ao Professor Dr. Orlando Fatibello Filho, para o qual o prof. Eduardo transmitiu o prosseguimento do meu doutorado. Meu especial agradecimento pelos ensinamentos, discussões, confiança e apoio nestes últimos três anos de convivência.

Ao Professor Dr. Romeu C. Rocha Filho, à Djenaine e à Roberta, pela disposição na discussão de alguns resultados que aprimoraram este trabalho.

Ao pessoal do LABBES. Em especial ao Willian (Cabelo) e a Érica, pela amizade.

Ao Professor Dr. Ronaldo Censi Faria e ao seu grupo de trabalho, no qual permaneci até a conclusão desta tese.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-graduação em Química.

Aos amigos, colegas e demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Considerações gerais.....	2
1.2. Ácido acetilsalicílico.....	5
1.2.1. Métodos para a determinação de ácido acetilsalicílico.....	6
1.3. Antihipertensivos: propranolol e atenolol.....	9
1.3.1. Métodos para a determinação de propranolol.....	10
1.3.2. Métodos para a determinação de atenolol.....	12
1.4. Citrato de sildenafila.....	14
1.4.1. Métodos para a determinação de sildenafila em formulações farmacêuticas.....	15
1.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	17
1.6. Objetivos.....	21
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
2.1. Reagentes utilizados e preparo das soluções de trabalho.....	23
2.2. Preparo das amostras.....	24
2.3. Instrumentação.....	24
2.3.1. Sistema de eletrodos.....	26
2.4. Procedimentos Experimentais.....	27
2.4.1. Voltametria cíclica, de onda quadrada e de pulso diferencial.....	27
2.4.2. Determinação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas.....	28
2.4.3. Determinação de propranolol em formulações farmacêuticas.....	29
2.4.4. Determinação de atenolol em formulações farmacêuticas.....	29
2.4.5. Determinação de sildenafila em formulações farmacêuticas.....	30
2.4.6. Estudo de interferentes e teste de recuperação.....	30

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1. Determinação de ácido acetilsalicílico sem a necessidade da hidrólise alcalina.....	32
3.1.1. Voltametria cíclica.....	32
3.1.2. Voltametria de onda quadrada.....	37
3.1.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	38
3.1.2.2. Curva analítica.....	41
3.1.2.3. Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade.....	43
3.1.2.4. Estudo de interferentes.....	44
3.1.2.5. Teste de adição e recuperação.....	44
3.1.2.6. Aplicação analítica.....	45
3.2. Determinação de propranolol.....	47
3.2.1. Voltametria cíclica.....	47
3.2.2. Voltametria de onda quadrada.....	51
3.2.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	52
3.2.2.2. Curva analítica.....	55
3.2.2.3. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade.....	57
3.2.2.4. Estudo de interferentes.....	57
3.2.2.5. Teste de adição e recuperação.....	57
3.2.2.6. Aplicação analítica.....	58
3.3. Determinação de atenolol.....	60
3.3.1. Voltametria cíclica.....	60
3.3.2. Voltametria de onda quadrada.....	65
3.3.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	66
3.3.2.2. Curva analítica.....	68
3.3.2.3. Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade.....	70
3.3.2.4. Estudo de interferentes.....	70
3.3.2.5. Teste de adição e recuperação.....	70
3.3.2.6. Aplicação analítica.....	71
3.4. Determinação de sildenafila.....	73
3.4.1. Voltametria cíclica.....	73
3.4.2. Voltametria de pulso diferencial.....	76
3.4.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial.....	77
3.4.3.2. Curva analítica.....	79

3.4.3.3. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade.....	81
3.4.3.4. Estudo de interferentes.....	81
3.4.3.5. Teste de adição e recuperação.....	82
3.3.2.6. Aplicação analítica.....	83
CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES.....	85
CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de AAS utilizando um eletrodo de BDD.....	43
TABELA 3.2. Estudo de adição e recuperação de AAS em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada.....	45
TABELA 3.3. Determinação de AAS em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método volumétrico.....	46
TABELA 3.4. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de PROP.....	56
TABELA 3.5. Estudo de adição e recuperação de PROP em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada.....	58
TABELA 3.6. Determinação de PROP em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método espectrofotométrico.....	59
TABELA 3.7. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de atenolol utilizando um eletrodo de BDD.....	69
TABELA 3.8. Estudo de adição e recuperação de atenolol em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada.....	71
TABELA 3.9. Determinação de atenolol em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método espectrofotométrico.....	72
TABELA 3.10. Parâmetros investigados na DPV em comparação à SWV para a determinação de sildenafil utilizando um eletrodo de BDD.....	80

TABELA 3.11. Estudo de adição e recuperação de sildenafil em formulações de Viagra[®] empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada.....82

TABELA 3.12. Determinação de sildenafil em formulações de Viagra[®] de diferentes dosagens empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método comparativo.....83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Reação de formação do ácido acetilsalicílico.....	6
FIGURA 1.2. Fórmula estrutural do (a) cloridrato de propranolol e (b) cloridrato de atenolol.....	9
FIGURA 1.3. Fórmula estrutural do citrato de sildenafil.....	14
FIGURA 2.1. Foto do Potenciostato/Galvanostato EGG&PAR 273A utilizado nas medidas voltamétricas.....	25
FIGURA 2.2. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizados nas medidas voltamétricas.....	26
FIGURA 2.3. Foto do eletrodo de diamante dopado com boro.....	27
FIGURA 3.1. Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência e na presença de AAS em H ₂ SO ₄	32
FIGURA 3.2. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do AAS empregando o eletrodo de BDD em diferentes eletrólitos suporte.....	33
FIGURA 3.3. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do AAS em diferentes concentrações de H ₂ SO ₄	33
FIGURA 3.4. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do AS e AAS.....	34
FIGURA 3.5. Proposta de possíveis etapas de hidroxilação do AAS.....	35
FIGURA 3.6. Variação da velocidade de varredura nos voltamogramas do AAS.....	36
FIGURA 3.7. Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e dependência do logaritmo da variação de corrente de pico	

com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de AAS.....	36
FIGURA 3.8. Voltamogramas de onda quadrada para o AAS em H ₂ SO ₄ : corrente direta, corrente reversa e corrente resultante.....	37
FIGURA 3.9. Voltamogramas de onda quadrada para o AAS em H ₂ SO ₄ empregando-se o eletrodo de BDD: sem pré-tratamento, com pré-tratamento catódico e com pré-tratamento anódico.....	38
FIGURA 3.10. Variação da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do AAS; Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial.....	39
FIGURA 3.11. Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do AAS; Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial.....	40
FIGURA 3.12. Variação do incremento de varredura nos voltamogramas do AAS...41	
FIGURA 3.13. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de AAS; Curva analítica.....	42
FIGURA 3.14. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de AAS. A figura inserida corresponde a curva analítica.....	43
FIGURA 3.15. Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD na ausência e na presença de PROP.....	47
FIGURA 3.16. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do PROP em diferentes eletrólitos suporte.....	48
FIGURA 3.17. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do PROP.....	49

FIGURA 3.18. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do PROP empregando-se o eletrodo de BDD com pré-tratamento anódico e com pré-tratamento catódico.....	50
FIGURA 3.19. Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de PROP.....	51
FIGURA 3.20. Voltamogramas de onda quadrada para o PROP: corrente direta, corrente reversa e corrente resultante.....	52
FIGURA 3.21. Variação da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do PROP em diferentes freqüências; Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial.....	53
FIGURA 3.22. Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do PROP; Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial.....	54
FIGURA 3.23. Variação do incremento de varredura nos voltamogramas do PROP.....	54
FIGURA 3.24. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de PROP empregando-se o eletrodo de BDD; Curva analítica.....	55
FIGURA 3.25. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de PROP; (b) Curva analítica.....	56
FIGURA 3.26. Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD na ausência e na presença de atenolol.....	60
FIGURA 3.27. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do atenolol em diferentes eletrólitos suporte.....	61

- FIGURA 3.28. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de atenolol em diferentes concentrações de NaNO_362
- FIGURA 3.29. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de atenolol em diferentes valores de pH.....62
- FIGURA 3.30. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do atenolol empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes tempos de pré-tratamento catódico.....63
- FIGURA 3.31. Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de atenolol.....64
- FIGURA 3.32. Voltamogramas de onda quadrada para o atenolol: corrente direta, corrente reversa e corrente resultante.....65
- FIGURA 3.33. Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do atenolol; Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos.....66
- FIGURA 3.34. Variação da amplitude de pulso de potencial no aspecto dos voltamogramas do atenolol; Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial.....67
- FIGURA 3.35. Variação do incremento de varredura no aspecto dos voltamogramas do atenolol.....67
- FIGURA 3.36. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de atenolol; Curva analítica.....68
- FIGURA 3.37. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de atenolol. A figura inserida corresponde a curva analítica.....69

FIGURA 3.38. Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência e na presença de sildenafil.....	73
FIGURA 3.39. Voltamogramas cíclicos para a oxidação do sildenafil em diferentes eletrólitos suporte.....	74
FIGURA 3.40. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de sildenafil em diferentes concentrações de H ₂ SO ₄	75
FIGURA 3.41. Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para o primeiro processo anódico e dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de sildenafil.....	76
FIGURA 3.42. Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do sildenafil.....	77
FIGURA 3.43. Influência da variação da velocidade de varredura nos voltamogramas de pulso diferencial do sildenafil.....	78
FIGURA 3.44. Influência da variação do tempo de duração do pulso nos voltamogramas do sildenafil.....	79
FIGURA 3.45. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de sildenafil; Curva analítica.....	80
FIGURA 3.46. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de sildenafil; Curva analítica.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>a</i>	amplitude de pulso de potencial
AAS	ácido acetilsalicílico
AA	ácido ascórbico
Aliquat [®] 336 S	cloreto de salicilato de tricaprililmetilamônio
<i>b</i>	coeficiente angular da curva analítica
BDD	diamante dopado com boro (do inglês, <i>Boron-Doped Diamond</i>)
BIA	análise por injeção em batelada
C ₁₈	octadecilsilano
C ₆₀	fulereno
CSEM	Centro Suíço de Eletrônica e Microtécnica (sigla francesa, <i>Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA</i>)
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
DPV	voltametria de pulso diferencial (do inglês, <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
ΔE_s	incremento de varredura
<i>E_p</i>	potencial de pico
EVA	membrana de acetato de etilenovinila
FIA	análise por injeção em fluxo (do inglês, <i>Flow Injection Analysis</i>)
<i>f</i>	frequência de aplicação dos pulsos de potencial
<i>f^{1/2}</i>	raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos de potencial
HFCVD	<i>Hot Filament Chemical Vapor Deposition</i>
HMDE	eletrodo de mercúrio de gota pendente (do inglês, <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPHT	<i>High Pressure/High Temperature</i>
<i>I_p</i>	corrente de pico
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MFE	eletrodo de filme de mercúrio
m/v	concentração massa/volume
NBS	N-bromosuccinamida

pH_{cond}	pH condicional
PROP	propranolol
PVC	cloreto de polivinila
r	coeficiente de correlação
RSD	desvio padrão relativo
SCE	eletrodo de calomelano saturado
S_B	desvio padrão da média aritmética de 10 brancos
SIA	análise por injeção seqüencial
SWAdSV	voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada (do inglês, <i>Square-Wave Adsorptive-Stripping Voltammetry</i>)
SWV	voltametria de onda quadrada (do inglês, <i>Square Wave Voltammetry</i>)
t	tempo de duração do pulso
tampão BR	tampão Britton-Robinson
UV	ultravioleta
VC	voltametria cíclica
v/v	volume/volume
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação
v	velocidade de varredura
$v^{1/2}$	raiz quadrada da velocidade de varredura

RESUMO

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ANALITOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO UTILIZANDO UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO. Neste trabalho, descreve-se o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de ácido acetilsalicílico (AAS), propranolol (PROP), atenolol e sildenafil (Viagra[®]) em formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) e as técnicas voltamétricas de onda quadrada e pulso diferencial. O AAS foi determinado diretamente em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, sem a necessidade da etapa de hidrólise alcalina, com um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada (SWV). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Na sequência, a determinação do propranolol foi realizada em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ sobre o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente empregando a SWV. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de propranolol de $2,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Ademais, a determinação do atenolol foi realizada em NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH_{cond} 1,1 ajustado com HNO₃ concentrado) sobre o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente empregando a SWV. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de atenolol de $2,0 \times 10^{-6}$ a $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $9,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Finalmente, foi desenvolvido um procedimento para a determinação do sildenafil em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ sobre o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente empregando a voltametria de pulso diferencial. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de sildenafil de $7,3 \times 10^{-7}$ a $7,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $4,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

ABSTRACT

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF ANALYTES OF PHARMACEUTICAL INTEREST USING A BORON DOPED DIAMOND ELECTRODE. The development of electroanalytical procedures for acetylsalicylic acid (ASA), propranolol (PROP), atenolol and sildenafil (Viagra[®]) in pharmaceutical formulations using a boron doped diamond (BDD) electrode, square wave and differential pulse voltammetric techniques are described. ASA was directly determined in a 0.01 mol L⁻¹ H₂SO₄ solution without the need of a previous alkaline hydrolysis step with the BDD electrode and square wave voltammetry (SWV). The analytical curve was linear in the ASA concentration range 2.5 × 10⁻⁶ to 1.0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ with a detection limit of 2.0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹. Then, the analytical determination of PROP was carried out in a 0.1 mol L⁻¹ H₂SO₄ solution using a cathodically pre-treated BDD electrode employing SWV. The analytical curve was linear in the PROP concentration range 2.0 × 10⁻⁷ to 9.0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ with a detection limit of 1.8 × 10⁻⁷ mol L⁻¹. The determination of atenolol was accomplished in 0.5 mol L⁻¹ NaNO₃ (pH_{cond} 1.1 adjusted with concentrated HNO₃) on a cathodically pre-treated BDD electrode employing SWV. The analytical curve was linear in the atenolol concentration range from 2.0 × 10⁻⁶ to 4.1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ with a detection limit of 9.3 × 10⁻⁷ mol L⁻¹. Finally, a procedure for the determination of sildenafil in 0.1 mol L⁻¹ H₂SO₄ on a cathodically pre-treated BDD electrode employing differential pulse voltammetry was developed. The analytical curve was linear in the sildenafil concentration range 7.3 × 10⁻⁷ to 7.3 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ with a detection limit of 4.8 × 10⁻⁷ mol L⁻¹.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Os fármacos são substâncias responsáveis desde o alívio de dores e ou sintomas, até a cura de doenças crônicas e, também, pelas reações adversas dos medicamentos. A demanda por produtos farmacêuticos tem aumentado e uma das consequências deste aumento é a crescente necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados que forneçam resultados de maneira rápida, simples, limpa (sem o emprego de solventes orgânicos, muitas vezes de média ou alta toxicidade) e de baixo custo para o controle de qualidade dos fármacos lançados no mercado para o consumo da população. Quando usados em doses excessivas ou abaixo da dosagem, os fármacos podem ser nocivos à saúde, levando até a morte do paciente. Por isso, o controle do teor do fármaco no medicamento administrado é importante para o sucesso do tratamento e minimização dos efeitos colaterais.

A determinação de fármacos em um laboratório de uma indústria farmacêutica ou uma farmácia de manipulação é realizada rotineiramente, para garantir a qualidade de cada medicamento produzido e uma maior segurança aos seus usuários, que consiste nos principais aspectos para o sucesso da empresa no mercado.

Os procedimentos que normalmente são adotados para o controle de qualidade em uma indústria farmacêutica são os métodos oficiais descritos pelas farmacopéias, que servem de referência para os diversos parâmetros de controle de qualidade, tanto para a matéria prima, como para o produto acabado¹. Cada substância descrita em uma farmacopéia possui metodologias específicas para sua caracterização e determinação. A maioria dos métodos utilizados para a dosagem do princípio ativo nas formulações farmacêuticas se mostra pouco prático, visto que necessitam de etapas de pré-tratamento e extração da amostra, que aumentam o custo do processo e demandam uma grande quantidade de tempo, além de empregarem solventes orgânicos de média ou alta toxicidade. Nesse sentido, torna-se importante o desenvolvimento de um procedimento simples, rápido e de baixo custo para a identificação, caracterização e quantificação de analitos de interesse farmacêutico.

Em química analítica, vários métodos têm sido aplicados na determinação de espécies químicas presentes em formulações farmacêuticas, alguns dos quais baseados em medidas espectrofotométricas, que se caracterizam por serem simples e robustos, além de envolverem instrumentação de baixo custo. Entretanto, para algumas aplicações, a seletividade é insuficiente e ou utilizam reagentes de alta toxicidade, que terminam por contaminar o meio ambiente, caso não sejam tratados adequadamente.

Como se sabe, o uso de técnicas analíticas bastante sensíveis é imprescindível para o controle de qualidade de medicamentos em qualquer segmento do mercado farmacêutico. Sob esses aspectos, as técnicas eletroquímicas estão se difundindo cada vez mais, pois são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas. As medidas são normalmente específicas para um estado de oxidação particular de um elemento e a sua instrumentação é relativamente barata, quando comparada a outros equipamentos, como os utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou na eletroforese capilar. Essas vantagens levaram a um aumento substancial da popularidade da eletroanálise. Porém, a principal vantagem das técnicas eletroanalíticas frente às técnicas tradicionais é a possibilidade de análise direta da amostra sem a necessidade de etapa de separação ou de um tratamento prévio das amostras e dessa forma, sem demandar um alto tempo de análise e o gasto excessivo de solventes orgânicos. Além disto, a aplicação de métodos eletroanalíticos possibilita a análise de soluções coloridas ou com partículas sólidas suspensas².

Algumas limitações das técnicas eletroquímicas podem ser observadas quando se trabalha com eletrodos sólidos. De um modo geral, o eletrodo de carbono vítreo, pasta de carbono, grafite pirolítico, ouro e platina apresentam problemas de adsorção, seja ela por compostos constituintes das soluções de análise ou dos produtos das reações redox, provocando o envenenamento da superfície eletródica, limitando a região de potencial de trabalho e aumentando a corrente residual²⁻⁴. A renovação da superfície por polimento não é trabalhosa, mas podem ocorrer inevitáveis mudanças na área ativa do eletrodo.

O eletrodo de mercúrio (HMDE – gotejante e de gota pendente) mostra algumas características interessantes em relação aos eletrodos sólidos. A ação do

gotejamento é reprodutível e a superfície é continuamente renovada, não sendo modificado permanentemente por reações que ocorrem na interface eletrodo solução, contrário ao eletrodo de filme de mercúrio (MFE) que pode ocorrer formação de amálgama ou processo de adsorção³. Quando comparados ao HMDE, os eletrodos metálicos sólidos apresentam maior corrente residual, menor reprodutibilidade e homogeneidade de superfície, além de menor potencial de sobretensão de hidrogênio e maior dificuldade de serem oxidados. No entanto, podem ser utilizados para determinações de espécie com potencial redox positivo³⁻⁵. Apesar do número ainda significativo de trabalhos empregando o HMDE, há uma tendência crescente de se trabalhar com eletrodos alternativos que causem menor impacto ao meio ambiente, ou menor preocupação e cautela durante a execução das análises.

Os eletrodos de carbono, no geral, são bastante utilizados. Possuem propriedades mecânicas e eletroquímicas que os tornam atraentes, ao mesmo tempo apresentam faixa ampla de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e mostram facilidade de modificação. No entanto, principalmente o eletrodo de carbono vítreo, o mais utilizado dentre os eletrodos de carbono, possui corrente de fundo muito alta, o que dificulta a diminuição do limite de detecção no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos, além de ser passível a efeitos de adsorção superficial, especialmente de espécies orgânicas, ocasionando problemas de bloqueio de resposta e dificuldade de renovação superficial⁴.

Com o avanço nas técnicas eletroanalíticas, a pesquisa por materiais eletródicos mais eficientes passou a ser feita, visto a importância de melhorar ainda mais o desempenho das técnicas desenvolvidas. Dentre as mais recentes descobertas de materiais com aplicabilidade eletroanalítica, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) surgiu como uma alternativa aos eletrodos convencionais, principalmente na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, em diversas matrizes⁶. Adicionalmente, há outros trabalhos na literatura que mostram a utilização do eletrodo de BDD para a determinação de diversos compostos orgânicos⁷⁻²⁰, inclusive neste grupo de trabalho²¹⁻²³.

SUFFREDINI et al.²⁴ ao estudarem reações de desprendimento de oxigênio e hidrogênio utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro observaram que há dificuldade da superfície deste em adsorver espécies intermediárias de reação. Além da fraca adsorção, o eletrodo de BDD apresenta várias outras características,

dentre elas, amplo intervalo eletroquímico de potencial de trabalho, elevada reprodutibilidade, baixas correntes residuais, alta estabilidade em soluções ácidas ou básicas. Sendo assim, o eletrodo de BDD é um excelente material alternativo para as mais variadas aplicações analíticas, principalmente na análise de compostos que apresentam eletroatividade baixa, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico (AAS), cuja determinação, utilizando eletrodos sólidos convencionais ou modificados, é feita indiretamente após a sua conversão a ácido salicílico (AS) pela hidrólise alcalina, como abordado mais adiante.

Tendo em vista essas características e sua boa interação com diversos compostos orgânicos, promovida principalmente pelas terminações carbono hidrogênio do eletrodo, surge o interesse de se desenvolver procedimentos analíticos para alguns compostos com propriedades farmacológicas, como o ácido acetilsalicílico, o cloridrato de propranolol, o cloridrato de atenolol e o citrato de sildenafil (Viagra[®]), uma vez que são fármacos populares amplamente consumidos pela população.

Nota-se a seguir, na revisão bibliográfica de cada um destes analitos, que a maioria dos procedimentos descritos na literatura requer aquecimento, longo tempo reacional, necessidade de extração com solventes orgânicos e meios reacionais desfavoráveis, que induz à necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos menos agressivos ao meio ambiente, com reduzido consumo de amostra/reagente e sem a necessidade de um tratamento especial da amostra.

1.2. Ácido acetilsalicílico²⁵⁻²⁹

Em 1897 o químico alemão Felix Hoffmann, com base nos trabalhos do químico francês Charles F. Gerhardt, sintetizou o ácido acetilsalicílico (FIGURA 1.1), no intuito de substituir o salicilato de sódio, que era indicado para o tratamento da doença reumática e que provocava irritação e fortes dores estomacais na maioria dos pacientes, além de ter um gosto bastante desagradável. Em 1899, a empresa alemã Bayer patenteou o ácido acetilsalicílico com o nome de Aspirina[®] (A-spirin; *Spiraea ulmaria*) e a introduziu maciçamente na medicina, primeiramente em pó, depois em pequenos comprimidos, já que os grânulos eram pouco solúveis em água.

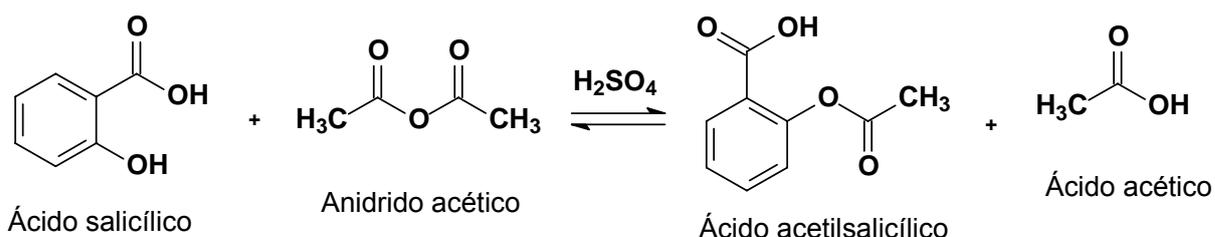


FIGURA 1.1. Reação de formação do ácido acetilsalicílico.

Seu uso mais frequente passou a ser feito para aliviar a dor, particularmente as dores musculares e a dor de cabeça, febres e no tratamento da diferentes formas de artrite. Com o passar dos anos, foi acrescentado indicações para o seu uso. Quando usada regularmente, pode ter papel importante na prevenção do câncer e de algumas doenças degenerativas, como Alzheimer. O ácido acetilsalicílico bloqueia a síntese das prostaglandinas, evitando a formação de plaquetas (responsáveis pelo bloqueio de fluxo de sangue para o coração) e conseqüentemente, impedindo o derrame e o infarto do miocárdio, mostrando uma enorme importância na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

1.2.1. Métodos para a determinação de ácido acetilsalicílico

Em geral, o ácido acetilsalicílico é determinado indiretamente após a sua conversão a ácido salicílico (AS) e ácido acético (AA) por meio da hidrólise alcalina. A maioria destes procedimentos requer diversas etapas de tratamento da amostra em virtude da hidrólise da amostra, o que acarreta um maior tempo de análise e a introdução de erros nas medidas, sendo incompatível para a utilização em análises de rotina.

A Farmacopéia Britânica³⁰ recomenda a determinação de AAS em formulações farmacêuticas após o tratamento de cada amostra em solução aquosa de hidróxido de sódio e aquecimento sobre refluxo por 10 min. Nessas condições, o AAS sofre hidrólise. O excesso de NaOH é então titulado com solução padrão de ácido clorídrico utilizando fenolftaleína como indicador.

Medidas espectrofotométricas baseadas na reação de Trinder³¹ também são recomendadas como método de referência para a determinação indireta do AAS como AS. Nesse método o AS reage com íons Fe(III) para formar um complexo de coloração roxa. Entretanto, interferências podem ser esperadas para amostras que

apresentem corantes em suas formulações. Essa reação foi adaptada para análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica por PEREIRA et al.³² Os íons AS gerados “*on line*” após a hidrólise alcalina do AAS em microondas reagem com os íons Fe(III) injetados no sistema para formar um complexo colorido que foi monitorado espectrofotometricamente em 525 nm. O limite de detecção encontrado foi de $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com uma frequência de amostragem de 90 determinações por hora. MATIAS et al.³³ empregaram a mesma reação de formação do complexo de cor roxa entre o AS, obtido da hidrólise alcalina do AAS, e íons Fe(III) para proporem um procedimento de quantificação do AAS utilizando “*spot test*” e reflectância difusa. A reflectância da mistura final, colocada sobre um papel de filtro, pode ser medida diretamente.

VERMA e JAIN³⁴ utilizaram a reação de trans-acetilação do 4-aminofenol pelo AAS para a determinação do AAS em amostras comerciais. O produto dessa reação (N-acetil-4-aminofenol) foi oxidado com iodilbenzeno em acetona formando iodilbenzeno e monitorado espectrofotometricamente em 430 nm ou titulado fotometricamente na mistura água/acetona com o 2-iodilbenzoato, em 444 nm.

A fluorimetria e a cromatografia também foram utilizadas para a determinação de AAS em formulações farmacêuticas. A cromatografia é preferida perante os demais métodos, devido a possibilidade de determinar simultaneamente AAS e AS³⁵. Entretanto, esta técnica envolve a utilização de reagentes orgânicos, procedimentos morosos para o tratamento da amostra, além de necessitarem instrumentos de alto custo e/ou sofisticados. MILES e SCHENK³⁶ propuseram a determinação fluorimétrica do AAS na presença de AS. A reação baseia-se na medida da fluorescência do AAS em clorofórmio contendo ácido acético 1% v/v ($\lambda_{exc} = 280$; $\lambda_{em} = 335$ nm). GANDHIMATHI et al.³⁷ desenvolveram um método utilizando HPLC para a determinação simultânea de AAS e mononitrato de isossorbida em uma formulação combinada, em uma coluna de fase reversa de octadecilsilano (C₁₈) com detecção na região do UV, em 215 nm. A fase móvel continha água:metanol (60:40 v/v) pH 3,5 (ajustado com H₃PO₄).

As técnicas eletroquímicas, tais como potenciometria³⁸⁻⁴¹, amperometria⁴² e voltametria^{43,44} foram utilizadas para a determinação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas. Em todos os procedimentos a determinação de AAS foi feita indiretamente, medindo-se o ácido salicílico obtido pela hidrólise alcalina.

FERREIRA et al.³⁸ construíram um eletrodo de segunda espécie, Pt| Hg| Hg₂(AS)₂| grafite, para a determinação de AAS após a sua hidrólise alcalina. Este eletrodo apresentou um coeficiente angular de 58,66 mV/década para o AS no intervalo de concentração de $6,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ em pH 6,0 e força iônica 0,50-3,0 mol L⁻¹, ajustada com NaClO₄.

ROVER Jr et al.³⁹ desenvolveram um sistema FIA com detecção potenciométrica para a quantificação de AAS utilizando um eletrodo constituído do par salicilato-tricaprililmetilamônio (Aliquat[®] 336 S) imobilizado em membrana de acetato de etilenovinila (EVA). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AS de $5,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ em tampão Tris-HCl (pH 7,5) com coeficiente angular de 58,3 mV/década. Posteriormente, KUBOTA et al.⁴⁰ utilizaram este mesmo sistema para a determinação de AAS, porém com a sua hidrólise alcalina "on line". A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $4,0 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e frequência de amostragem de 28 determinações por hora. Outro procedimento empregando este eletrodo foi proposto por FERNANDES et al.⁴¹ adaptando-o em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $7,5 \times 10^{-3}$ a $7,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com uma frequência de amostragem de 90 determinações por hora.

QUINTINO et al.⁴² propuseram a determinação indireta do AAS utilizando um eletrodo de cobre em um sistema BIA, com detecção amperométrica. Foi obtida uma linearidade no intervalo de concentração de AAS de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de 0,48 μmol L⁻¹. MAJDI et al.⁴³ desenvolveram um eletrodo de níquel modificado com hidróxido de níquel para a determinação de AAS em meio alcalino. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $2,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de 48 μmol L⁻¹, utilizando cronoamperometria. SUPALKOVA et al.⁴⁴ usaram voltametria de onda quadrada (SWV) em conjunto com um eletrodo confeccionado com grafite de lápis para a determinação indireta de AAS em amostras comerciais. As condições ideais para a hidrólise foram obtidas em pH 12 a 90° C por 60 min.

Apesar de bons resultados obtidos empregando-se os respectivos métodos supracitados, em todos há necessidade da prévia hidrólise alcalina do AAS.

1.3. Anti-hipertensivos: propranolol e atenolol⁴⁵

A hipertensão arterial é uma das doenças que mais afeta a população. Em muitos casos, é necessário o tratamento com agentes anti-hipertensivos e muitos pacientes fazem uso contínuo destes medicamentos para controlar a pressão arterial.

Diversos tipos de fármacos são disponíveis para o controle da hipertensão, com a finalidade de reduzir a pressão sanguínea a níveis normais. Entre os fármacos mais utilizados no tratamento da hipertensão encontram-se o propranolol (1-(isopropilamino)-3-(1-nafitiloxi)-2-propranol) e o atenolol (4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi) fenilacetamida) (FIGURA 1.2), pertencentes à classe dos β -bloqueadores, geralmente disponíveis na forma de comprimidos, comercializados como medicamentos de referência, genéricos ou similares. Esses medicamentos podem ser empregados individualmente ou em associações, de forma a manter uma redução eficaz da hipertensão.

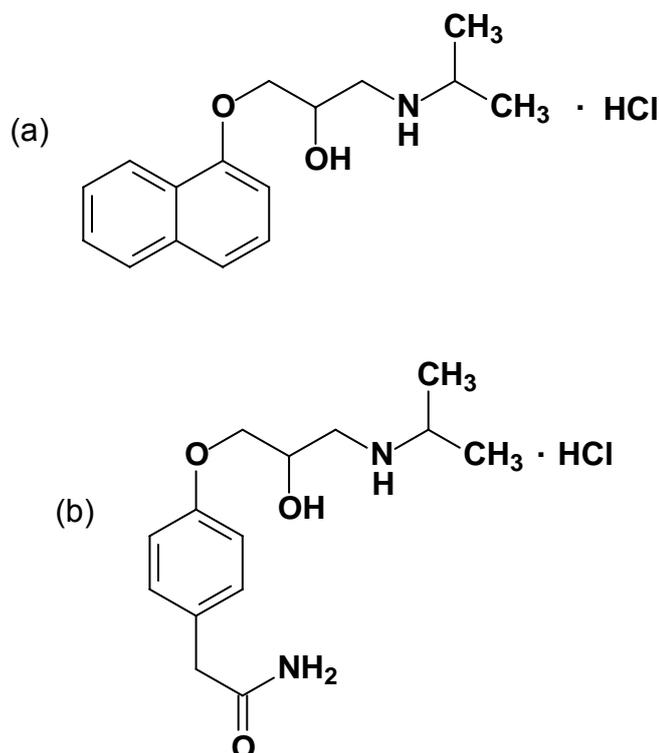


FIGURA 1.2. Fórmula estrutural do (a) cloridrato de propranolol e (b) cloridrato de atenolol.

Em virtude da importância destes anti-hipertensivos no tratamento de algumas doenças cardiovasculares, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos quantitativos para a determinação destes princípios ativos em formulações farmacêuticas, a fim de não comprometer a eficácia terapêutica do medicamento e para garantir que a quantidade que está sendo ingerida pelo paciente seja a recomendada, conseqüentemente garantindo o sucesso do tratamento.

A seguir serão descritos sucintamente os trabalhos mais relevantes para a determinação dos anti-hipertensivos: propranolol e atenolol.

1.3.1. Métodos para a determinação de propranolol

A titulação volumétrica⁴⁶ e condutometria⁴⁷ são alguns dos procedimentos quantitativos mais antigos para a determinação de propranolol em formulações farmacêuticas.

A espectrofotometria também pode ser utilizada para a determinação do propranolol em formulações farmacêuticas, que vão desde procedimentos simples⁴⁸ a trabalhos^{49,50}, que requerem o uso de reagentes prejudiciais ao meio ambiente^{50,51}, quando não tratados de forma adequada. Conforme PASSOS et al.⁵² a utilização de um procedimento espectrofotométrico adaptado para análise por injeção seqüencial (SIA) produz apenas 2,5 mL de efluentes por determinação, enquanto que o método de referência proposto pela Farmacopéia Britânica⁵³ originam 140 mL.

Os métodos luminescentes tais como a espectrofluorimetria⁵⁴⁻⁵⁶ e a quimiluminescência⁵⁷⁻⁵⁹ têm sido utilizados na determinação de propranolol em formulações farmacêuticas.

RAMESH et al.⁵⁴ desenvolveram um procedimento espectrofluorimétrico para a determinação indireta de propranolol. A reação baseia-se na oxidação deste analito com o N-bromosuccinamida (NBS) e a determinação do NBS em excesso pela medida do decréscimo da fluorescência quando este reage com a metdilazina. O produto da reação apresenta fluorescência em 377 nm, após ter sido excitado a 343 nm. Reação similar foi empregada por GOWDA et al.⁶⁰ e SASTRY et al.⁶¹ para determinações espectrofotométricas de propranolol em amostras comerciais. TABRIZI⁵⁵ baseou-se na reação de oxidação do propranolol com Ce(IV) gerando Ce(III) com emissão de fluorescência em 352 nm, quando excitado em 255 nm. Determinação direta do propranolol em formulações comerciais foi feita por

RUIZ et al.⁵⁶ utilizando a fluorescência natural obtida do propranolol em etanol/água (50% v/v) (λ_{exc} = 232 e 295 nm; λ_{em} = 324 e 337 nm). Este mesmo procedimento permitiu a determinação simultânea de propranolol e pindolol em amostras de urina.

A análise por injeção em fluxo com detecção quimiluminescente também é utilizada para a determinação de propranolol em formulações farmacêuticas. A emissão luminescente gerada pela oxidação do pirogalol com o periodato de potássio que não foi consumido na reação prévia deste reagente com o propranolol foi utilizada por TSOGAS et al.⁵⁷ para a determinação indireta deste fármaco. TOWNSHEND et al.⁵⁸ propuseram um procedimento baseado na quimiluminescência induzida pela oxidação do grupo amino com permanganato de potássio em ácido sulfúrico para a determinação direta deste fármaco. Posteriormente, MARQUES et al.⁵⁹ utilizaram a mesma reação supracitada empregando análise em fluxo com multicomutação, o que proporcionou a minimização no consumo de reagentes e na geração de resíduos.

MARTINEZ et al.⁶² desenvolveram um procedimento para a determinação de propranolol em produtos farmacêuticos utilizando HPLC em uma coluna de fase reversa C₁₈ com detecção na região do UV, em 225 nm. A fase móvel contendo dodecilsulfato de sódio 0,15 mol L⁻¹, propanol 15 % v/v e NaH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹ em pH 3,0 (ajustado com HCl) foi utilizada, permitindo a eluição do propranolol e dos demais anti-hipertensivos avaliados em menos de 15 min. EL-SAHARTY et al.⁶³ determinaram simultaneamente furosemida e propranolol empregando HPLC em uma coluna de fase reversa C₁₈ com detecção na região do UV, em 235 nm e como fase móvel foi utilizada a mistura NaH₂PO₄ (0,02 mol L⁻¹):acetonitrila (80:20 v/v) em pH 4,5.

GOTARDO et al.⁶⁴ empregaram espectroscopia de reflectância difusa utilizando “*spot test*” quantitativo para a determinação de propranolol em formulações farmacêuticas, tanto em amostras comerciais como em amostras suspeitas de falsificação ou adulteração. Esse procedimento baseia-se na reação em papel de filtro, utilizando 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida como reagente cromogênico. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de PROP de $8,45 \times 10^{-4}$ a $8,45 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,01 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Algumas técnicas eletroquímicas também foram utilizadas para a quantificação do propranolol em formulações farmacêuticas. O procedimento que

envolve essas técnicas é extremamente atrativo, principalmente do ponto de vista da simplicidade, baixo custo de instrumentação, além da facilidade de miniaturização.

HASSAN et al.⁶⁵ desenvolveram um eletrodo seletivo pela formação de tungstofosfato de propranolol com cloreto de polivinila (PVC) para a determinação potenciométrica de propranolol em formulações farmacêuticas. A resposta para o propranolol foi linear no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, em pH 3-8 com uma resposta subnernstiana de 48,1 mV/década e limite de detecção de $3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Além desse eletrodo, foram construídos mais quatro, para a determinação de atenolol, bisoprolol, metoprolol e timolol, todos empregando o mesmo trocador.

A polarografia de pulso diferencial foi utilizada por EL-RIES et al.⁶⁶ para a determinação indireta de propranolol em formulações farmacêuticas, após a nitração do propranolol pelo ácido nítrico. O nitropropranolol formado reduz-se em -0,275 V vs. Ag/AgCl (KCl saturado), em tampão Britton-Robinson pH 2,0 no eletrodo de gota estática de mercúrio. A resposta foi linear no intervalo de concentração de PROP de $5,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Resultados similares, em termos de linearidade ($6,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e limite de detecção ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) foram obtidos por RADI et al.⁶⁷, que utilizaram um eletrodo de pasta de carbono em conjunto com a voltametria de pulso diferencial adsortiva por redissolução anódica em tampão BR pH 2,0 para a determinação do propranolol em amostras comerciais.

1.3.2. Métodos para a determinação de atenolol

AMIN et al.⁶⁸ descreveram um procedimento colorimétrico para a determinação do atenolol, utilizando o reagente cromogênico 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole em meio de metanol:água (30 % v/v), com absorção máxima em 485 nm, necessitando-se de 2 horas para a formação do complexo. Para minimizar este tempo para 10 min, é necessário aquecimento a 70° C.

ELSHANAWANE et al.⁶⁹ determinaram simultaneamente amilorida, atenolol, hidroclorotiazida e clortalidona empregando HPLC em uma coluna de cianopropil com detecção em 275 nm e como fase móvel foi utilizada a mistura tampão fosfato pH 4,5:metanol, na proporção 75:25 v/v.

AL-GHANNAM⁷⁰ utilizaram a espectrofotometria no visível para a determinação de complexos coloridos formados na reação de atenolol com azul de bromofenol, azul de bromotimol e azul de bromocresol. As reações com formação desses complexos ocorrem em clorofórmio. Os complexos apresentaram absorção máxima em 415 nm. A Farmacopéia Britânica⁵² recomenda medidas espectrofotométricas em 275 nm utilizando metanol como solvente.

ARVAND et al.⁷¹ construíram um eletrodo seletivo para a determinação de atenolol, utilizando uma membrana de PVC contendo fosfotungstato de atenolol. As condições analíticas permitiram resposta nernstiana (58,1 mV/década) no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, sendo aplicado seletivamente na determinação do atenolol.

Alguns procedimentos utilizando técnicas eletroquímicas foram desenvolvidos para a determinação do atenolol em formulações farmacêuticas.

GOYAL et al.⁷² desenvolveram um eletrodo de ITO (óxido de índio e estanho) modificado com nanopartículas de ouro para a determinação de atenolol utilizando voltametria de pulso diferencial. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração para o atenolol de $0,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,2.

Segundo GOYAL and SINGH⁷³, o atenolol não apresenta processos redox na superfície de um eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato pH 7,2. Entretanto, quando modificado com fulereno (C₆₀) foi possível obter um pico de oxidação para esse analito, em aproximadamente 1,04 V vs. Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹), em tampão fosfato pH 7,2, permitindo a quantificação do analito no intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ a $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Recentemente, GRIESE et al.⁷⁴ mostraram que o atenolol oxida-se em um eletrodo de carbono vítreo em aproximadamente 1,17 V, em tampão fosfato pH 7,2, de acordo com as condições experimentais usadas por aqueles autores⁷³.

CERVINI et al.⁷⁵ desenvolveram um eletrodo de grafite/resina de poliuretana sem modificação, cuja oxidação do atenolol é obtida em 760 mV versus o eletrodo de calomelano saturado, empregando voltametria de pulso diferencial. O eletrodo apresentou resposta linear no intervalo de concentração de atenolol de $4,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $3,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 10. Posteriormente, este eletrodo foi adaptado para FIA com detecção amperométrica⁷⁶. A frequência de amostragem alcançada foi de 90 determinações por hora com uma

curva de calibração linear no intervalo de atenolol de $2,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de 18,1 μ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 10.

1.4. Citrato de sildenafil⁴⁵

A disfunção erétil é definida como a incapacidade persistente de obter e manter uma ereção adequada para permitir um desempenho sexual satisfatório.

A crescente elucidação das bases fisiológicas e bioquímicas da função erétil, nos últimos anos, possibilitou a evolução das opções de tratamento da disfunção erétil. No mercado, são encontradas formas farmacêuticas de aplicação local e de administração oral.

A procura por uma terapia farmacológica ideal para o tratamento da disfunção erétil tem o objetivo de satisfazer características como eficácia, fácil administração, redução da toxicidade e efeitos adversos. Devido a isso, os fármacos de administração oral tornaram-se a terapia de primeira escolha para os mais diversos casos de disfunção erétil, destacando-se entre eles o citrato de sildenafil (Viagra[®]), designado quimicamente como citrato de 1-[[3-(6,7-diidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1-H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etoxifenil]Sulfonil]-4-metilpiperazina, cuja estrutura é apresentada na FIGURA 1.3.

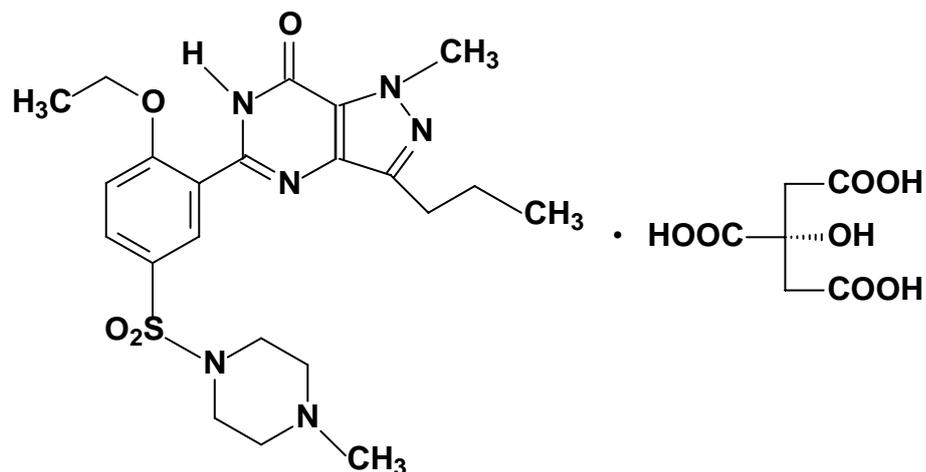


FIGURA 1.3. Fórmula estrutural do citrato de sildenafil.

A ereção peniana é mediada por nervos NANC (não-adrenérgicos-não-colinérgicos), os quais liberam óxido nítrico (NO) no corpo cavernoso durante a estimulação sexual, promovendo a relaxação dos músculos nessa região, permitindo

influxo de sangue. A síntese do NO, no organismo, ocorre durante a transformação do aminoácido semi-essencial L-arginina (L-Arg) em L-citrulina (L-Cit), em uma reação mediada pela enzima *óxido nítrico sintase* (NOS), devendo estar presente oxigênio, NADPH, cálcio, entre várias outras substâncias. O NO, assim produzido, difunde-se em uma ação típica de mensageiro para as células alvo, onde ativa o sistema da *guanilciclase*, com aumento da produção de guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (GMPc), por meio da qual ocasiona seu efeito biológico. Dessa forma, o NO não é armazenado “*in vivo*” como outros neurotransmissores, mas sintetizado sob demanda, difundindo-se rapidamente até seu sítio de ação. Sua deficiência no organismo, dentre outras conseqüências, promove a impotência sexual.

O sildenafil pertence a classe de agentes inibidores das *fosfodiesterases*, enzima que degrada o GMPc no interior dos corpos cavernosos. A *fosfodiesterase* tipo 5, predominante no corpo cavernoso, age na hidrólise do GMPc, convertendo-o em GMP, sua forma inativa. Pela inibição da *fosfodiesterase*, o sildenafil prolonga a atividade do GMPc, promovendo relaxamento da musculatura lisa cavernosa, melhorando a função erétil. O pico de concentração plasmática desse composto ocorre 30 a 120 min após ingestão oral, em jejum.

1.4.1. Métodos para a determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas

O consumo elevado de Viagra[®] em todo o mundo indica a necessidade do desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de seu princípio ativo (sildenafil), a fim de garantir a sua qualidade e a autenticidade. Até o presente momento não há um método analítico descrito em qualquer farmacopéia para a determinação do sildenafil em formulações farmacêuticas.

Vários métodos têm sido propostos para a sua determinação, entre eles: cromatografia líquida de alta eficiência^{77,78}, espectroscopia no infravermelho próximo⁷⁹, espectroscopia Raman⁸⁰, eletroforese capilar⁸¹, colorimetria⁸² e análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica⁸³. Entretanto, alguns desses procedimentos são de alto custo, enquanto outros são trabalhosos e/ou requerem alto tempo de análise, pois envolvem diversas etapas analíticas.

ABD-ELBARY et al.⁷⁷ desenvolveram um procedimento para a determinação de sildenafil em produtos farmacêuticos utilizando HPLC e uma coluna de fase

reversa C₁₈ com detecção na região do UV, em 290 nm. Como fase móvel foi utilizado metanol:água:acetonitrila (60:20:20 v/v/v) pH 6,1 ajustado com ácido acético 0,1 % v/v. DARAGHMEH et al.⁷⁸ também utilizaram HPLC para a determinação do sildenafil na presença de seus produtos de degradação. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ e como fase móvel a mistura tampão acetato (pH 7,0):acetonitrila (1:1, v/v). O método se mostrou bastante seletivo para a separação e identificação do sildenafil de seus produtos de degradação.

VREDENBREGT et al.⁷⁹ descreveram um procedimento para a determinação rápida de sildenafil em comprimidos, em formulações suspeitas de adulteração e em imitações de Viagra[®], utilizando espectroscopia no infravermelho próximo. O procedimento é adequado para determinações de formulações que contenham apenas um princípio ativo, pois não requer preparo de amostra, sem sua destruição durante a análise. VEIJ et al.⁸⁰ utilizaram espectroscopia Raman para a análise direta de amostras adulteradas de Viagra[®], comparando com amostras não adulteradas. Para obter essa diferenciação foi necessário utilizar um tratamento quimiométrico, utilizando análise de componentes principais (PCA) combinada com a análise hierárquica de grupo (HCA).

FLORES et al.⁸¹ utilizaram a eletroforese capilar para a determinação simultânea de sildenafil (Viagra[®]), vardenafila (Levitra[®]) e tadalafila (Cialis[®]) (fármacos empregados para o tratamento da disfunção erétil) em formulações farmacêuticas em apenas dois minutos. Porém, foi utilizado metanol para a dissolução dos fármacos. Foram observados limites de detecção de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $4,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

AMIN et al.⁸² desenvolveram um procedimento colorimétrico para a determinação de sildenafil em amostras comerciais e em soro. Os complexos coloridos formados pela reação entre o sildenafil com os corantes vermelho do Congo, vermelho de Sudão e o violeta de Genciana em valores de pH 2,5, 6,5 e 11,0, respectivamente, foram determinados em 523, 554 e 569 nm, respectivamente.

ALTIOKKA et al.⁸³ utilizaram análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica na região do UV, em 292 nm, para a determinação de sildenafil em amostras de Viagra[®] 50 mg em tampão fosfato pH 8,0 contendo metanol 10 % v/v. A curva analítica foi linear na faixa de sildenafil de $1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e uma quantificação de sildenafil da ordem de $8,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foi possível.

São poucos os procedimentos eletroquímicos utilizados na determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas encontrados na literatura.

HASSAN et al.⁸⁴ desenvolveram dois eletrodos potenciométricos seletivos ao sildenafil constituído dos pares-iônicos: sildenafil-tungstosilicato e sildenafil-reinecato imobilizados em membrana polimérica de PVC. Estes sensores apresentaram resposta Nernstiana no intervalo de concentração de sildenafil de $7,9 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, respectivamente. OTHMAN et al.⁸⁵ construíram outros dois eletrodos seletivos. Nesse caso, foram empregados os trocadores tetrafenilborato e ácido fosfomolibdico em membrana de PVC. Esses dois eletrodos apresentaram coeficiente angular de 55,5 e 53,5 mV/década, respectivamente, no intervalo de concentração de sildenafil de 10^{-2} a 10^{-5} mol L⁻¹, com tempos de resposta de 30 e 40 s, respectivamente. Ambos os eletrodos foram também utilizados para a determinação de sildenafil em soro sanguíneo.

Baseando-se na reação de redução do sildenafil em um eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE), BERZAS et al.⁸⁶ propuseram dois procedimentos voltamétricos para a determinação desse analito em amostras de Viagra[®] (25, 50 e 100 mg) em meio de HClO₄ pH 2,0, utilizando SWV e a voltametria de onda quadrada adsortiva por redissolução catódica (SWAdSV). Esta última promoveu uma melhor linearidade, $5,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com potencial e tempo de acumulação de -0,8 V e 10 s, respectivamente, quando comparada àquela obtida por SWV, $1,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Ainda há um número significativo de trabalhos empregando esse eletrodo.

ÖZKAN et al.⁸⁷ estudaram a oxidação do sildenafil utilizando um eletrodo de carbono vítreo em ácido sulfúrico, em tampão fosfato, acetato e amônia, na faixa de valores de pH condicional de 2-8, contendo acetonitrila 30 % v/v para assegurar a solubilidade. A sua determinação em formulações farmacêuticas, em Viagra[®] 50 mg, foi feita em tampão fosfato pH 2,0 e em tampão acetato pH 3,5 empregando voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

1.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante natural é um material isolante (com exceção do tipo IIb, que contém boro em sua estrutura)⁸⁸, de difícil acessibilidade e de elevado custo

comercial. Estas características não despertavam o interesse de sua utilização nos diferentes segmentos da indústria. Porém, com o desenvolvimento de métodos mais eficientes e relativamente mais baratos para a obtenção de filmes finos de diamante sintético passou a ter aplicações de grande importância nas mais variadas áreas, principalmente devido à alta dureza, condutividade térmica e força de flexão, baixa corrente dielétrica e coeficiente de fricção, isolamento elétrico, resistência à alta temperatura de operação e transparência óptica⁸⁸.

Os dois métodos empregados para a síntese do diamante foram desenvolvidos na década de 50, que constam do crescimento a alta pressão/alta temperatura (HPHT (High Pressure/High Temperature)) e da deposição química a partir da fase vapor (CVD (Chemical Vapor Deposition)). Este último, devido à viabilidade econômica, a versatilidade e ao manuseio simplificado, passou a ser o mais utilizado para a síntese dos filmes de diamante em série⁸⁸.

O método CVD baseia-se na deposição de um filme de diamante em diferentes tipos de substrato (silício, tungstênio, molibdênio, titânio, grafite, carbono vítreo, inclusive o próprio diamante), sob condições termodinamicamente metaestáveis, a partir da ativação de uma fase gasosa (geralmente metano diluído em hidrogênio) introduzida em um reator. Além do metano, pode-se utilizar como fonte de carbono: metanol, acetona, etanol, ou ainda, qualquer outro composto orgânico volátil. O melhor substrato é aquele que possui boa resistência mecânica e coeficiente de dilatação parecido com o do filme de diamante, para facilitar o crescimento de um filme aderente e de qualidade, além de ser resistente à temperatura de operação do reator⁸⁸.

Quanto ao dopante, diferentes compostos podem ser utilizados e injetados no reator. Entre eles, o mais utilizado é o boro, geralmente proveniente do trimetilboro, numa concentração entre 10 e 20000 ppm, que é injetado no reator simultaneamente com hidrogênio e metano, para o crescimento de filmes de diamante com características semicondutoras (baixa concentração de boro), tais como o diamante natural tipo IIb ou ainda, com características de um semimetal (alta concentração de boro)^{24,89}. Outros elementos usados como dopantes são: enxofre, nitrogênio, fósforo e lítio, podendo-se alterar o tipo de semicondutor obtido⁸⁸.

Após o crescimento do filme de diamante dopado com boro, um dos parâmetros mais importantes na montagem do eletrodo é o estabelecimento do contato elétrico, que normalmente é feito com índio/gálio, gálio, subcamada de

titânio, pasta de prata, ouro ou ouro/tálio⁶. O isolamento de todas as partes do eletrodo faz-se necessária, para que somente a superfície do diamante dopado fique exposta à solução de medida.

O estabelecimento do método de dopagem de filmes de diamantes viabilizou economicamente sua produção, despertando o interesse da fabricação de eletrodos para o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, em diferentes matrizes. No Brasil, mais precisamente no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), em São José dos Campos/SP, eletrodos de diamante dopado com boro são preparados pelo método CVD^{88,90,91}.

As aplicações dos eletrodos de diamante dopado com boro em eletroanálise estão relacionadas às propriedades eletroquímicas distinguíveis de outros eletrodos comumente utilizados, como o carbono vítreo, platina e pasta de carbono, que incluem: estabilidade química a corrosão em meios agressivos, baixa e estável corrente de fundo, extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a temperaturas altas, boa resposta a alguns analitos em soluções aquosas e não-aquosas com pré-tratamento convencional, adsorção fraca de moléculas polares, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento, transparência óptica nas regiões do UV/Vis e IV e finalmente, uma larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso com o desprendimento de hidrogênio começando em -1,5 e o desprendimento de oxigênio em +2,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)^{92,93}.

Alguns artigos de revisão fornecem o histórico de pesquisas relacionadas ao eletrodo de BDD^{92,94,95}. O comportamento eletroquímico observado para os eletrodos de BDD em diferentes experiências e, em diferentes laboratórios, não podem ser satisfatoriamente comparados, pois depende das propriedades físicas, químicas e eletrônicas do material. Estas propriedades são afetadas pela quantidade e tipo de dopante, fatores morfológicos e defeitos no filme, presença de impurezas (carbono sp²), orientação cristalográfica e terminação da superfície (hidrogênio e/ou oxigênio).

A terminação em hidrogênio dá ao eletrodo uma natureza hidrofóbica e conseqüentemente elevada condutividade. A terminação em oxigênio mostra tendência hidrofílica e apresenta baixa condutividade. Essa terminação superficial pode ser gerada usando tratamento eletroquímico (redução da água para produzir terminações hidrogênio e oxidação da água para produzir terminações oxigênio) ou

por plasma. A superfície oxidada por meio do pré-tratamento anódico pode ser recuperada, por meio de um pré-tratamento catódico adequado e vice-versa⁹⁶.

O conhecimento sobre o tipo de pré-tratamento superficial nos eletrodos de BDD sobre as eventuais aplicações eletroanalíticas dos mesmos é um ponto fundamental. O pré-tratamento anódico mostrou-se seletivo na determinação de dopamina⁹⁷ e ácido úrico⁹ na presença de grande quantidade de ácido ascórbico. Por outro lado, as terminações hidrogênio desempenham um importante papel na resposta eletroquímica do eletrodo. GRANGER e SWAIN⁹⁸ estudando a influência das terminações superficiais do eletrodo de BDD (obtidas por tratamento com plasma) na reversibilidade do sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ observaram que a reação ocorre mediante interações específicas na superfície do eletrodo com terminações em hidrogênio e que estas interações superficiais são bloqueadas quando a superfície do boro contém terminações em oxigênio. Em estudos posteriores realizado por SUFFREDINI et al.⁹⁶ foi observado que o pré-tratamento catódico facilitava a interação de espécies eletroquímicas com esta superfície, assegurando uma alta condutividade na superfície do eletrodo. Aumento similar da atividade eletroquímica do sistema, após um pré-tratamento catódico da superfície do eletrodo de BDD também foi relatado posteriormente em nosso grupo de trabalho, na determinação individual^{99,100} ou simultânea²¹ de aspartame e ciclamato em adoçantes, na determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas²², e também na determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas²³. MAHE et al.¹⁰¹ observaram que o pré-tratamento catódico incrementa a reprodutibilidade e o valor da constante de velocidade de transferência de carga do par reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ sobre a superfície do eletrodo de BDD, quando comparado a resultados obtidos para a superfície oxidada do eletrodo. SALAZAR-BANDA et al.¹⁰² observaram que após o pré-tratamento catódico o eletrodo de diamante dopado com boro apresentou uma mudança no comportamento eletroquímico, onde a resposta voltamétrica do sistema ferrocianeto se mostrou mais definida e reversível, mostrando a importância das terminações de hidrogênio para a resposta eletroquímica. Por espectroscopia Raman foi possível mostrar que nenhuma mudança estrutural é acrescentada ao eletrodo no pré-tratamento, nem qualquer mudança na relação sp^2/sp^3 . As mudanças no comportamento eletroquímico do eletrodo refletem perda da reversibilidade em função do tempo de exposição ao ar, provavelmente em

decorrência da perda de hidrogênio superficial pela oxidação da superfície do eletrodo de BDD pelo oxigênio do ar. Esses autores reforçam a necessidade de pré-tratar catodicamente o eletrodo de BDD antes de realizar algum experimento para se obter resultados reprodutíveis e confiáveis, especialmente se o eletrodo não foi utilizado por um longo período de tempo.

1.6. Objetivos

Essa tese de doutorado teve como objetivo desenvolver procedimentos eletroanalíticos combinando as vantagens do emprego das técnicas de voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial e aquelas do diamante dopado com boro para a determinação de ácido acetilsalicílico, propranolol, atenolol e sildenafil (Viagra[®]) em formulações farmacêuticas.

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes utilizados e preparo das soluções de trabalho

Todas as soluções empregadas nos experimentos foram preparadas a partir de reagentes comerciais de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada, purificada em um sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA), modelo UV-Plus ultrabaixo teor de substâncias orgânicas dissolvidas.

As soluções de ácido sulfúrico (Merck) foram preparadas em diferentes concentrações, diluindo-se volumes apropriados desse ácido em água desionizada.

As soluções de nitrato de potássio e cloreto de potássio, ambas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por dissolução de 12,6 g e 9,32 g de cada sal (Synth), respectivamente, em água desionizada em balão volumétrico de 250 mL.

A solução de nitrato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 42,5 g desse sal (Synth) em água desionizada em balão volumétrico de 1 L. Ajustes de pH foram feitos por adições de ácido nítrico (HNO_3 , Synth) concentrado e hidróxido de sódio (NaOH , Synth) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O tampão BR pH 2,2 foi preparado pela mistura de ácido acético (Synth), ácido fosfórico (Synth) e ácido bórico (Synth), cada qual na concentração $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Para o ajuste do pH 7,5 e 9,0 foi utilizado solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,8 g do NaOH em água desionizada em balão volumétrico de 100 mL. A partir desta solução, com diluições adequadas, foi preparada a solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, também empregada nesse trabalho.

O tampão acetato pH 4,8 foi preparado pela mistura das soluções de acetato de sódio (Synth) e ácido acético, ambas de concentração $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Os tampões fosfato pH 5,6 e 7,0 foram preparados pela mistura das soluções de fosfato de sódio monobásico, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt), e fosfato de sódio bibásico, Na_2HPO_4 (J.T.Baker), ambas de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O tampão citrato pH 5,0 foi preparado pela mistura das soluções de citrato de sódio (J.T.Baker) e ácido cítrico (Merck), ambas de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de AAS $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0182 g de ácido acetilsalicílico (Sigma) em balão volumétrico de

10 mL com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e sonicada por 10 min em banho ultrasom BRASONIC, modelo 1510R-MTH, para obter uma completa dissolução do AAS. A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de AAS empregadas neste trabalho.

A solução estoque de PROP $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0259 g de cloridrato de propranolol (Sigma) em balão volumétrico de 10 mL com H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de PROP empregadas neste trabalho.

A solução de atenolol $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0266 g de cloridrato de atenolol (Sigma) em balão volumétrico de 10 mL com solução de NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH_{cond} 1,1 (ajustado com HNO_3 conc.). A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de atenolol empregadas neste trabalho.

A solução estoque de sildenafil $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0667 g de citrato de sildenafil (Pfizer) em balão volumétrico de 10 mL com H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de sildenafil empregadas neste trabalho.

2.2. Preparo das amostras

As amostras contendo ácido acetilsalicílico, propranolol, atenolol e sildenafil de diferentes marcas e dosagens foram adquiridas em drogarias locais.

Para cada amostra foram tomados cinco comprimidos, que foram pesados em balança analítica e pulverizados em almofariz. Uma quantidade adequada de cada amostra foi dissolvida no eletrólito suporte respectivo para cada analito. Eventuais excipientes insolúveis contidos nas amostras, foram removidos por filtração simples por gravidade em papel de filtro Whatman n° 1. As amostras contendo AAS foram sonicadas por 10 min em banho ultrasom, para completa dissolução do AAS.

2.3. Instrumentação

Foram utilizadas micropipetas volumétricas Eppendorf® de volumes variáveis de capacidade máxima de 5000, 1000, 100 e 10 μL , sendo que todas continham

ponteiras descartáveis de polietileno. Todo o material utilizado (balões volumétricos, béqueres, espátula, etc.) foi devidamente lavado antes do uso com solução de HNO_3 10% v/v e posterior lavagem com água, para assegurar a ausência de quaisquer impurezas que pudessem interferir nas medidas.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica BEL[®], modelo 210A, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro ORION Expandable Ion Analyser, modelo EA-940 e um eletrodo de vidro combinado ANALION, modelo V-620, com um eletrodo de referência externa de Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato EGG&PAR, modelo 273A, acoplado a um microcomputador para aquisição de dados (FIGURA 2.1).

Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula de vidro de compartimento único de 20 mL equipada com uma tampa de Teflon[®], contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) e capilar para desaeração da solução com nitrogênio (White Martins), como representado na FIGURA 2.2.

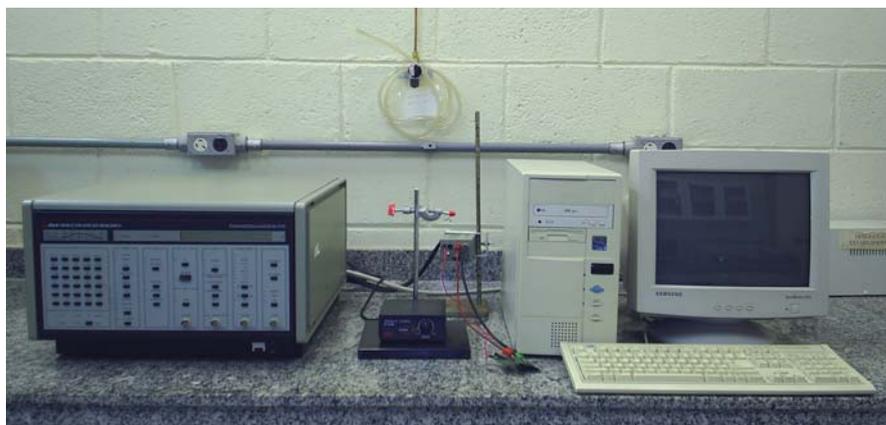


FIGURA 2.1. Foto do Potenciostato/Galvanostato EGG&PAR 273A utilizado nas medidas voltamétricas.

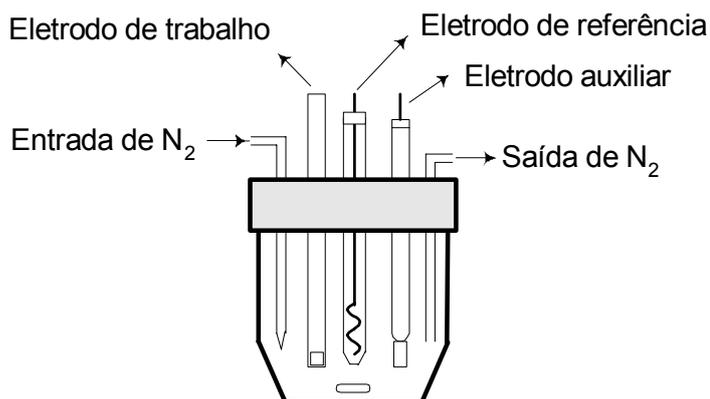


FIGURA 2.2. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizados nas medidas voltamétricas.

2.3.1. Sistema de eletrodos

Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e uma placa de platina de $0,5 \text{ cm}$ de largura e 1 cm de comprimento, respectivamente. O eletrodo de referência foi construído inserindo-se um fio de prata recoberto anodicamente com $\text{AgCl}_{(s)}$ em um tubo de vidro de 3 mm de diâmetro interno contendo solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, no qual uma das extremidades continha um disco de vidro sinterizado. O mesmo foi mantido imerso na mesma solução de preenchimento, em KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O eletrodo de trabalho utilizado nas medidas voltamétricas foi um eletrodo de diamante dopado com boro (8000 ppm) com área geométrica de $0,33 \text{ cm}^2$ (FIGURA 2.3), produzido pelo Centro Suíço de Eletrônica e Microtécnica (CSEM), Neuchâtel. Esse eletrodo foi sintetizado sobre um substrato de silício pela técnica de HFCVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), cuja fase gasosa consistia em metano (CH_4), com excesso de hidrogênio (H_2) e trimetilboro como gás de dopagem. Detalhes da preparação destes filmes foram reportados por GANDINI et al.¹⁰³

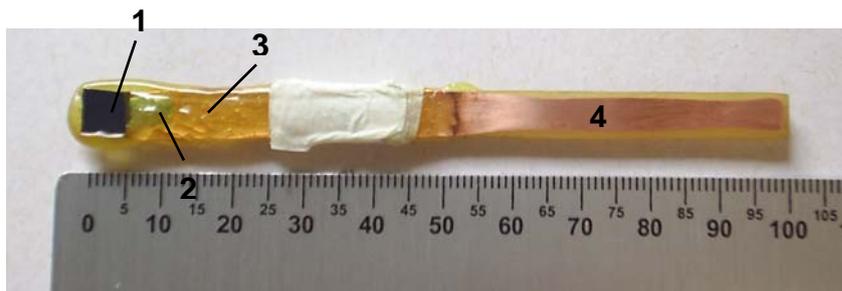


FIGURA 2.3. Foto do eletrodo de diamante dopado com boro empregado nas determinações voltamétricas de AAS, PROP, atenolol e sildenafil em formulações farmacêuticas: (1) filme de diamante dopado com boro, (2) contato elétrico (liga estanho/chumbo), (3) isolamento do eletrodo com resina epóxi Araldite[®], (4) camada de cobre.

Para a determinação de propranolol, atenolol e sildenafil houve a necessidade de realizar um tratamento catódico do eletrodo de BDD, sempre que necessário, para a recuperação da superfície eletródica e consequentemente garantir a reprodutibilidade das análises. Para isso, empregou-se cronopotenciometria, aplicando-se ao eletrodo uma corrente de -1 A cm^{-2} durante 120, 120 e 240 s vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente, em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Para a determinação de AAS não houve a necessidade de um pré-tratamento eletroquímico do eletrodo de BDD.

2.4. Procedimentos Experimentais

2.4.1. Voltametria cíclica, de onda quadrada e de pulso diferencial

Inicialmente, utilizou-se voltametria cíclica para estudar o perfil voltamétrico do eletrodo de BDD na ausência e presença dos analitos de interesse utilizados nesse trabalho, tais como, ácido acetilsalicílico, propranolol, atenolol e sildenafil, além da escolha do melhor eletrólito suporte e pH. A voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial foram utilizadas para propor um procedimento eletroanalítico para a determinação de cada um desses analitos em formulações farmacêuticas sobre o eletrodo de diamante dopado com boro.

Para a realização dessas medidas adicionaram-se 10 mL de eletrólito suporte respectivo a cada analito à célula eletroquímica, sem borbulhamento de gás,

com exceção do experimento em que se testou o efeito da eliminação de oxigênio, quando o borbulhamento de nitrogênio foi feito por 10 min antes de cada leitura, sob agitação. A agitação era então desligada ao registrar-se o voltamograma. Era necessário um intervalo de 3 min entre cada medida e agitação da solução segundos antes de cada medida para todos os analitos estudados, a fim de garantir repetibilidade.

Após a otimização do sistema, as curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica.

O limite de detecção (LD) foi calculado a partir da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, obtidos das correntes medidas no mesmo potencial de pico de oxidação de cada analito, e a seguinte relação: $LD = 3S_B/b$, onde S_B corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, obtidos das correntes medidas no mesmo potencial de pico de oxidação de cada analito, e a seguinte relação: $LQ = 10S_B/b$, onde S_B corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

2.4.2. Determinação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas

Para o procedimento proposto, uma alíquota de 60 μL de cada amostra contendo AAS foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. A concentração de AAS em cada comprimido foi determinada diretamente utilizando a curva analítica previamente obtida com soluções de referência de AAS $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

O procedimento de referência adotado foi o descrito pela Farmacopéia Britânica³⁰, utilizando titulação de retorno. Cinco comprimidos de cada amostra foram pesados e pulverizados em almofariz, no qual massas exatamente determinadas em balança analítica, foram tratadas com 25 mL de solução padronizada de NaOH 0,492 mol L^{-1} . Essa solução foi aquecida em um forno de microondas, para assegurar a hidrólise completa do ácido acetilsalicílico a ácido salicílico, evitando-se a ebulição da solução. Após resfriamento da solução a 25° C,

o excesso de NaOH foi titulado com solução padronizada de HCl $0,508 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando como indicador a fenolftaleína. O volume final da titulação foi usado para calcular o teor de AAS nos comprimidos.

2.4.3. Determinação de propranolol em formulações farmacêuticas

Uma alíquota de $300 \mu\text{L}$ de cada amostra foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. A concentração de propranolol em cada comprimido foi determinada diretamente utilizando a curva analítica previamente obtida com soluções de referência de PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

O procedimento espectrofotométrico descrito na Farmacopéia Brasileira⁵¹ foi aplicado como método de referência para o procedimento proposto. As amostras de propranolol analisadas foram monitoradas espectrofotometricamente em 290 nm , usando água como branco. Massas acuradamente pesadas foram dissolvidas em metanol e sua absorvância foi obtida e comparada com uma curva analítica preparada com soluções padrões de propranolol, da mesma forma que as amostras.

2.4.4. Determinação de atenolol em formulações farmacêuticas

Uma alíquota de $90 \mu\text{L}$ de cada amostra foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ (ajustado com HNO_3 conc.) e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. A concentração de atenolol em cada comprimido foi determinada diretamente utilizando a curva analítica previamente obtida com soluções de referência de atenolol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

O procedimento de referência adotado foi o espectrofotométrico descrito na Farmacopéia Britânica⁵³, com algumas alterações. Esse método consiste em solubilizar a amostra com 30 mL de metanol, aquecer até 60° C , deixar atingir a temperatura ambiente e completar o volume para 50 mL , com metanol. Por conseguinte, as amostras foram filtradas e um volume adequado do filtrado foi diluído em metanol, de forma a obter uma solução $0,01\%$ de atenolol (m/v). Então, essa solução foi monitorada espectrofotometricamente em 275 nm , usando metanol

como branco. A absorvância obtida foi comparada com uma curva analítica preparada com soluções padrões de atenolol, da mesma forma que as amostras.

2.4.5. Determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas

Para o procedimento proposto, uma alíquota de 500 μL de cada amostra contendo sildenafil foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. A concentração de sildenafil em cada comprimido foi determinada diretamente utilizando a curva analítica previamente obtida com soluções de referência de sildenafil 1,0 $\times 10^{-4}$ mol L^{-1} . As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

O procedimento cromatográfico descrito por ABD-ELBARY et al.⁷⁷ foi utilizado como método de comparação para o procedimento proposto. As amostras de sildenafil analisadas foram determinadas por cromatografia utilizando uma coluna C_{18} (60 μm \times 150 mm, 5 μm), monitoradas espectrofotometricamente em 290 nm. Massas acuradamente pesadas foram dissolvidas em metanol:água:acetonitrila (60:20:20 v/v/v) pH 6,1 ajustado com ácido acético 0,1 % v/v. A resposta obtida foi comparada com uma curva analítica preparada com soluções padrões de sildenafil, da mesma forma que as amostras.

2.4.6. Estudo de interferentes e teste de recuperação

As medidas para a determinação de interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais estabelecidas para o AAS, PROP, atenolol e sildenafil. Cada um dos concomitantes foi analisado sob uma concentração constante de cada um destes analitos, sendo a proporção 1/1, 1/10 e 1/100 analito:concomitante.

O teste de recuperação foi realizado adicionando-se às soluções das amostras, quantidades conhecidas de analito. Descontou-se então, dos resultados finais de cada amostra, o valor presente originalmente na amostra, de modo a obter o valor de recuperação frente ao padrão adicionado.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação de ácido acetilsalicílico sem a necessidade da hidrólise alcalina

3.1.1. Voltametria cíclica

Inicialmente foram realizados experimentos de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação e/ou de redução do AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do eletrodo de BDD em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Pela FIGURA 3.1 pode-se observar que o AAS apresenta um pico de oxidação em torno de $+2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), com características de um processo irreversível, uma vez que o voltamograma não apresenta pico no sentido da varredura reversa.

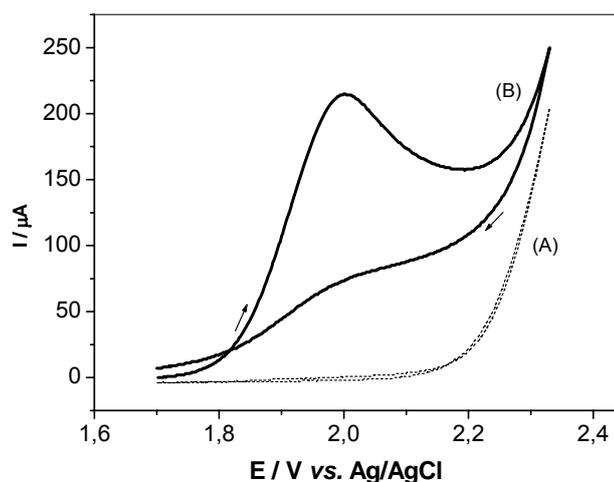


FIGURA 3.1. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) empregando o eletrodo de BDD, na ausência (A) e na presença de AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (B), em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

As respostas voltamétricas da oxidação do AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, a saber: ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, tampão BR pH 2,2, KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ são mostradas na FIGURA 3.2. O eletrólito suporte que proporcionou melhor resposta para o processo de oxidação do AAS foi o ácido sulfúrico, com um perfil voltamétrico melhor definido, intensidade de corrente de pico ligeiramente maior e, ademais, apresentou um potencial de pico menos positivo.

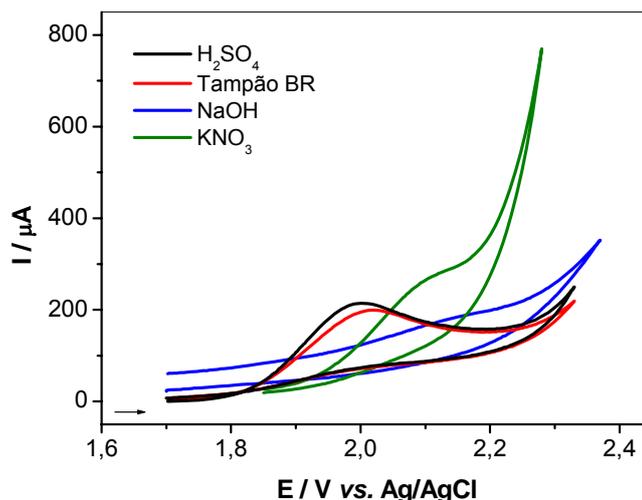


FIGURA 3.2. Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) para a oxidação do AAS 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ empregando o eletrodo de BDD em diferentes eletrólitos suporte: H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, tampão BR pH 2,2, KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹.

O efeito da concentração do H₂SO₄ no intervalo de 0,001 a 0,5 mol L⁻¹ também foi investigado na oxidação do AAS 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ sobre o eletrodo de BDD. Os voltamogramas cíclicos para a oxidação do AAS em diferentes concentrações de H₂SO₄ são mostrados na FIGURA 3.3. Pode-se observar que tanto a corrente como o potencial de pico são influenciados pela concentração do ácido. Maior intensidade de corrente de pico e menor potencial de pico foram obtidos em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹. Ademais, entre pH 2-3 a cinética de hidrólise do AAS é muito lenta¹⁰⁴, garantindo que a sua determinação nessas condições não passa pela etapa de hidrólise.

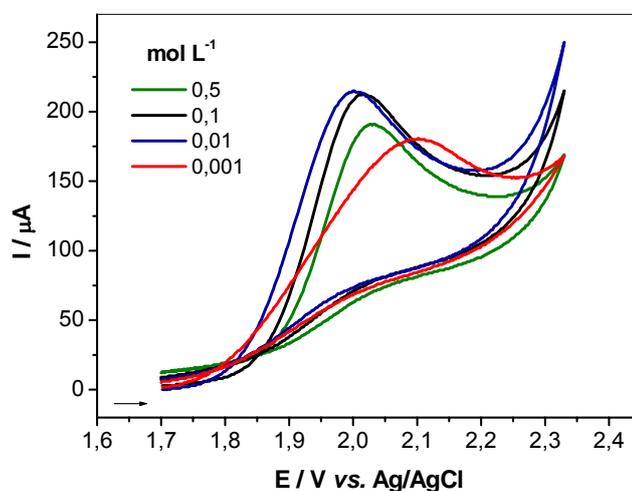


FIGURA 3.3. Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) para a oxidação do AAS 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em diferentes concentrações de H₂SO₄.

Como informação adicional para garantir que não estaria havendo hidrólise do AAS nessas condições de pH, durante a realização das medidas, a estabilidade da solução de AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliada em um período de 8 horas, monitorando-se a concentração de ácido acetilsalicílico por voltametria cíclica com um intervalo de uma hora entre cada medida. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, com desvio padrão relativo (RSD) de 1,6 %, indicando efetivamente que a hidrólise do AAS em ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, neste período de tempo de trabalho, é desprezível.

O comportamento voltamétrico do ácido salicílico (AS) foi investigado no eletrodo de BDD, nas mesmas condições empregadas para o AAS. Não se observa processos redox para o AS no potencial de oxidação do AAS, como pode ser observado na FIGURA 3.4. Isso é mais um indicativo que o pico observado em torno de $+2,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) corresponde à oxidação do AAS, e não à oxidação do ácido salicílico. Ademais, de acordo com LOUHICHI et al.¹⁰⁵ o AS possui um comportamento similar ao dos fenóis e apresenta dois picos irreversíveis de oxidação em 1,5 e 1,8 V vs. SCE em um eletrodo de BDD. O segundo pico corresponde à oxidação do produto de oxidação do AS.

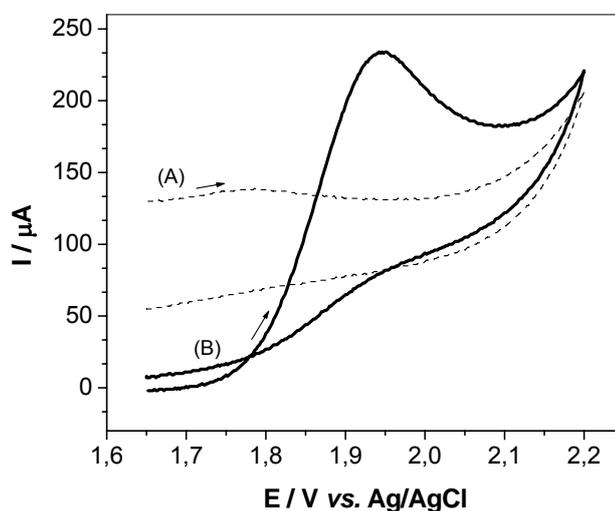


FIGURA 3.4. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) para a oxidação do (A) AS e (B) AAS, ambos de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando um eletrodo de BDD.

No caso do ácido acetilsalicílico, deve ocorrer uma interação deste analito com o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) eletrogerado em potenciais muito positivos, pela

decomposição da água²⁴, formando provavelmente, algum composto quinônico (FIGURA 3.5), que requer maior energia para ser oxidado¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Dessa forma, o AAS pode ser determinado diretamente em potenciais mais positivos em um eletrodo de BDD, sem a necessidade da etapa de hidrólise do mesmo.

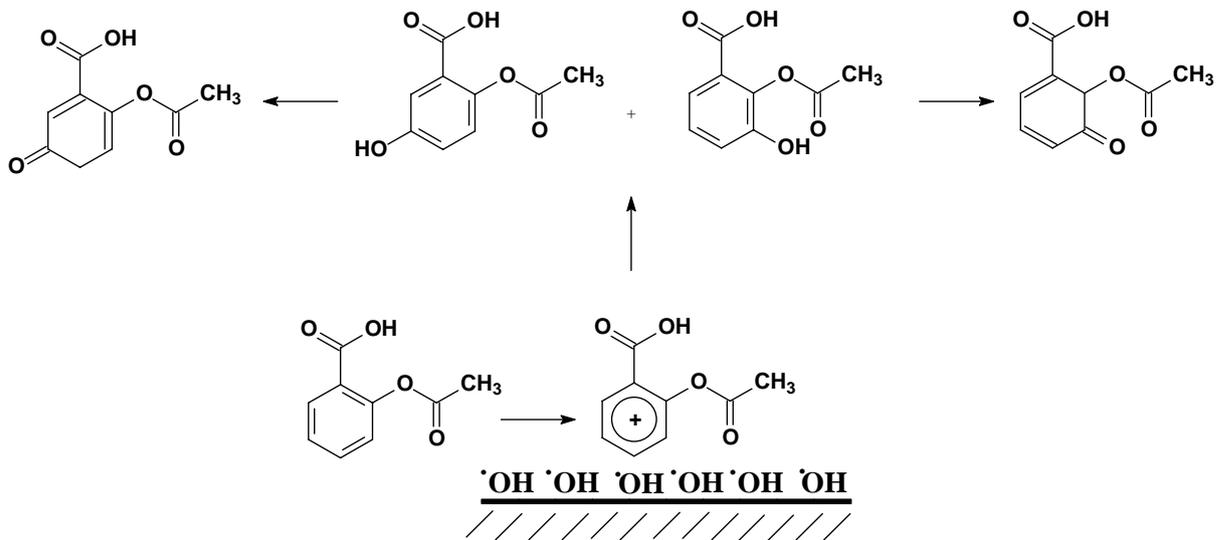


FIGURA 3.5. Proposta de possíveis etapas de hidroxilação do AAS.

Em vista desses resultados, verifica-se que em H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} a hidrólise do AAS pode ser considerada desprezível e conseqüentemente, o método é seletivo para o AAS, como pode ser visto mais adiante.

As medidas de AAS sobre o eletrodo de BDD foram realizadas na presença de oxigênio, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no perfil voltamétrico da oxidação do AAS na presença e ausência de oxigênio.

Os voltamogramas cíclicos de oxidação do AAS em função da velocidade de varredura podem ser observados na FIGURA 3.6. O aumento da velocidade de varredura desloca o pico de oxidação do AAS para valores ligeiramente mais positivos, sendo que esse comportamento é característico de processos irreversíveis¹⁰⁹.

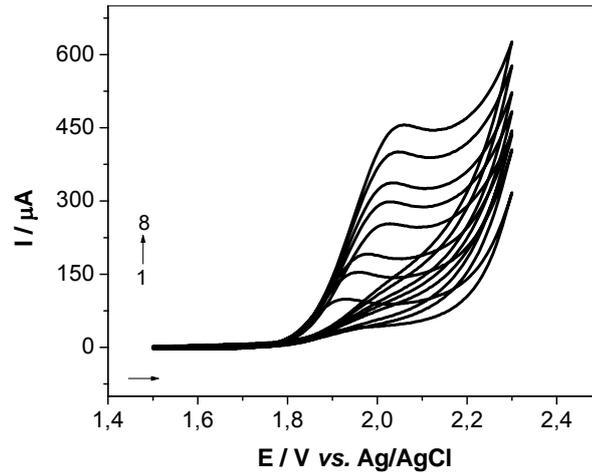


FIGURA 3.6. Variação da velocidade de varredura nos voltamogramas do AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$: (1) 5, (2) 15, (3) 25, (4) 50, (5) 75, (6) 100, (7) 150, (8) 200 mV s^{-1} .

A corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 5 a 200 mV s^{-1} ($r = 0,9957$), como pode ser observado na FIGURA 3.7(a). Esse comportamento é um indicativo que o transporte de massa é controlado por difusão de espécies na superfície eletródica¹⁰⁹. Observa-se nesse gráfico que o coeficiente linear obtido é diferente de zero ($I_p = 34,6 + 19,0 v^{1/2}$), devido provavelmente a processos de adsorção no eletrodo de trabalho.

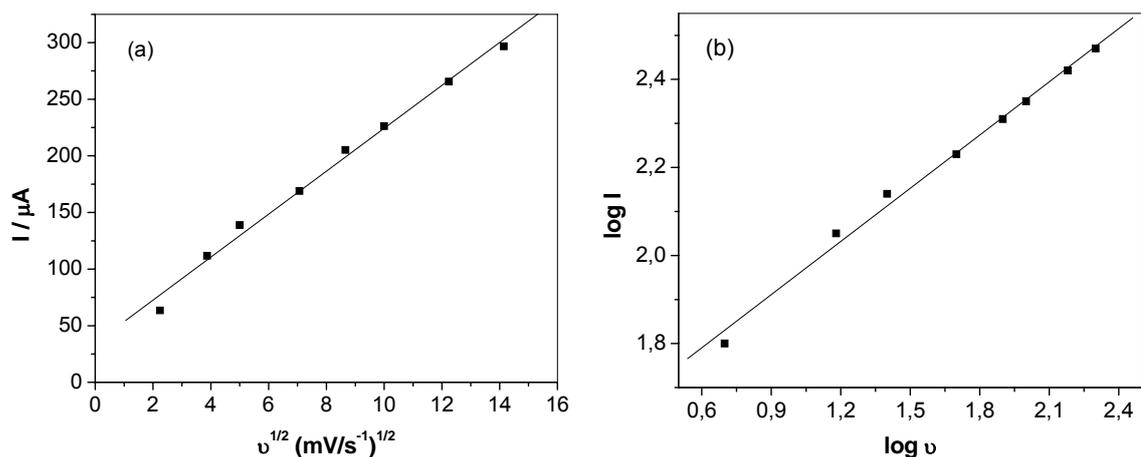


FIGURA 3.7. (a) Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e (b) dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de AAS $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

O gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.7(b)) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,40. Esse valor está próximo do previsto pela literatura (0,50) para sistemas controlados pela difusão de espécies¹⁰⁹.

3.1.2. Voltametria de onda quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada apresentaram um comportamento semelhante àquele obtido por voltametria cíclica, apresentando somente um pico de oxidação em torno de +1,8 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

A FIGURA 3.8 apresenta a separação das componentes de corrente para o AAS sobre o eletrodo de BDD com a voltametria de onda quadrada. Observa-se que a corrente resultante (utilizada para as medidas) é bastante semelhante à corrente direta e ainda, a corrente reversa não apresenta pico. Esse comportamento é característico de sistemas totalmente irreversíveis¹¹⁰.

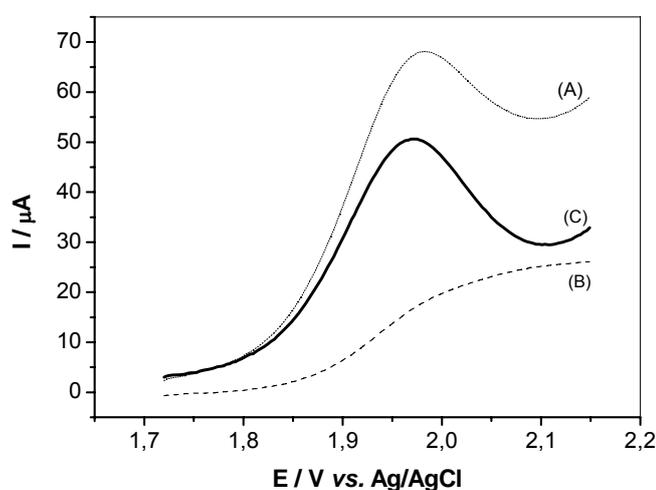


FIGURA 3.8. Voltamogramas de onda quadrada para o AAS $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em meio de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ ($f = 50$ s⁻¹, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV): (A) corrente direta, (B) corrente reversa e (C) corrente resultante.

Foi realizado um estudo do efeito do pré-tratamento do eletrodo de BDD na resposta voltamétrica do AAS. Os voltamogramas obtidos para o AAS sobre o eletrodo de BDD sem pré-tratamento e após os pré-tratamentos anódico e catódico, são mostrados na FIGURA 3.9. Sem o pré-tratamento, o eletrodo de BDD apresentou um perfil voltamétrico melhor definido para a oxidação do ácido

acetilsalicílico. Dessa forma, optou-se por realizar as análises de AAS sobre o eletrodo de BDD sem pré-tratamento. O eletrodo era lavado somente com água desionizada e armazenado ao ar livre.

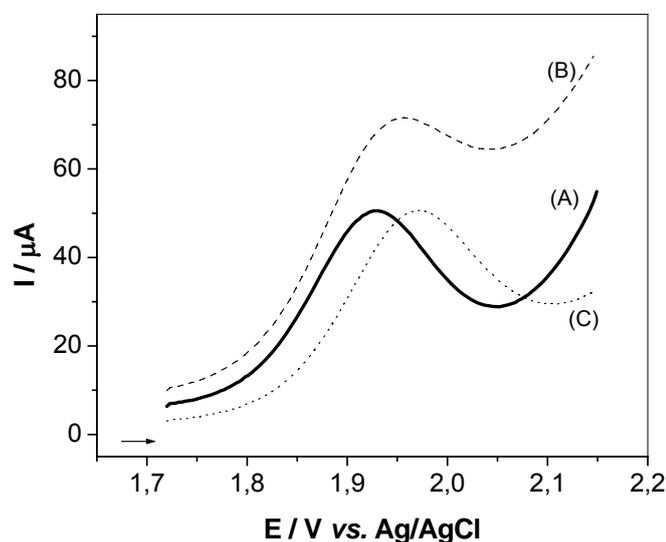


FIGURA 3.9. Voltamogramas de onda quadrada para o AAS $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se o eletrodo de BDD: sem pré-tratamento (A), com pré-tratamento catódico (B) e com pré-tratamento anódico (C); ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 3 \text{ mV}$).

3.1.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada¹¹⁰

No desenvolvimento de um método eletroanalítico empregando a voltametria de onda quadrada faz-se necessário otimizar os parâmetros que possam influenciar a resposta voltamétrica, como a frequência de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_S), pois podem melhorar de forma significativa a resposta voltamétrica.

A frequência de aplicação de pulso de potencial (f) é uma importante variável na voltametria de onda quadrada, pois é um dos parâmetros que determina a intensidade dos sinais. A FIGURA 3.10(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o AAS em função da variação da frequência (f), no intervalo de 10 a 150 s^{-1} . Observa-se um aumento da magnitude da corrente de pico com o aumento da frequência de aplicação de pulsos de potenciais e um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos. Há também um deslocamento da

linha base para valores maiores de corrente. Dessa forma, a fim de se evitar altos valores de corrente para a linha base, a frequência escolhida foi igual a 50 s^{-1} .

A corrente de pico, neste caso, é uma função linear da raiz quadrada da frequência (Figura 3.10(b), com correção da linha base), indicando que o transporte de massa é predominantemente controlado por difusão das espécies.

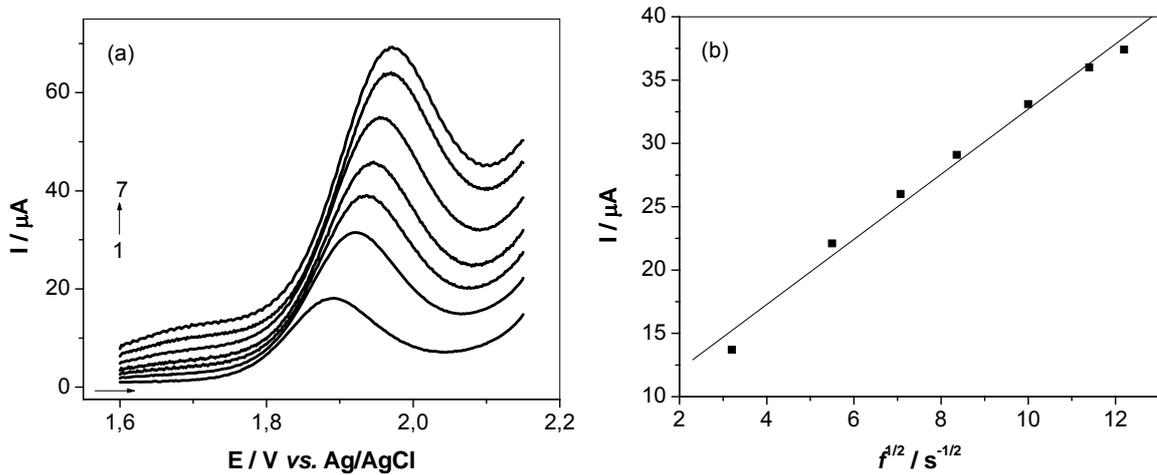


FIGURA 3.10. (a) Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial no aspecto geral dos voltamogramas do AAS $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). Frequências: (1) 10, (2) 30, (3) 50, (4) 70, (5) 100, (6) 130, (7) 150 s^{-1} . (b) Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

Outro parâmetro estudado foi a influência da variação da amplitude de pulso de potencial (a) na corrente de pico para a oxidação do AAS sobre o eletrodo de BDD, no intervalo de 10 a 100 mV.

A FIGURA 3.11(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do AAS em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial. Observa-se que para valores de amplitude até 40 mV o potencial de pico é mantido e para valores acima deste ocorre deslocamento para potenciais menos positivos.

Com os dados extraídos dessa figura, construiu-se o gráfico mostrado na FIGURA 3.11(b) (com correção da linha base), que mostra o comportamento da corrente de pico em função da amplitude de pulsos de potencial da onda quadrada. Observa-se que com o aumento da amplitude, há um deslocamento nos potenciais de pico para valores menos positivos e deslocamento da linha base para valores maiores de corrente. Para valores de amplitudes menores que 40 mV, o aumento de

intensidade de corrente é praticamente linear. Para amplitudes maiores há perda dessa linearidade, não atuando de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos. Sendo assim, a amplitude selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi a de 40 mV.

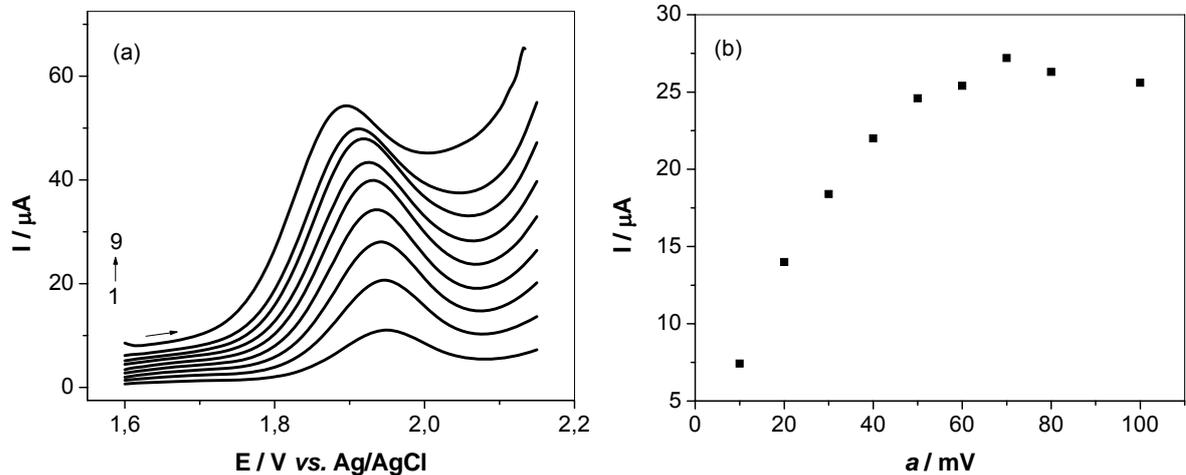


FIGURA 3.11. (a) Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do AAS $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$). Amplitudes: (1) 10, (2) 20, (3) 30, (4) 40, (5) 50, (6) 60, (7) 70, (8) 80 e (9) 100 mV. (b) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial para o AAS.

Por fim, estudou-se o efeito da variação do incremento de varredura no sinal analítico. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do AAS em diferentes valores de incremento de varredura (ΔE_S), no intervalo de 1 a 7 mV, são mostrados na FIGURA 3.12. Observa-se que com o aumento do incremento de varredura ocorre um aumento na intensidade de corrente de pico e o deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos. Observa-se que a corrente de pico varia linearmente com o incremento de varredura (ΔE_S) até 3 mV, onde há um deslocamento da linha base para valores maiores de corrente. Dessa forma, optou-se em trabalhar com um valor de incremento de varredura de 3 mV.

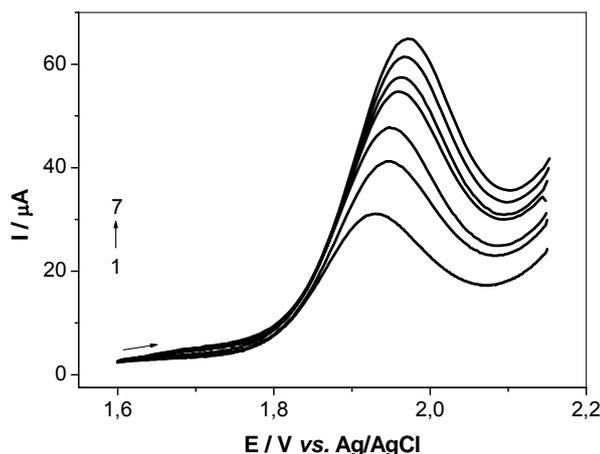


FIGURA 3.12. Variação do incremento de varredura nos voltamogramas do AAS $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$), sendo: (1) 1, (2) 2, (3) 3, (4) 4, (5) 5, (6) 6, (7) 7 mV.

3.1.2.2. Curva analítica

Após a otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de 1,72 a 2,15 V vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes concentrações de AAS, de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, empregando-se o eletrodo de BDD.

A FIGURA 3.13(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada concentração de AAS. Observa-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração do ácido acetilsalicílico e que praticamente não ocorre deslocamento no valor dos potenciais de pico. A curva analítica é mostrada na FIGURA 3.13(b) e a equação de reta obtida foi: $I_p/\mu\text{A} = 0,49 + 4,1 \times 10^5 \{[\text{AAS}]/\text{mol L}^{-1}\}$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9995.

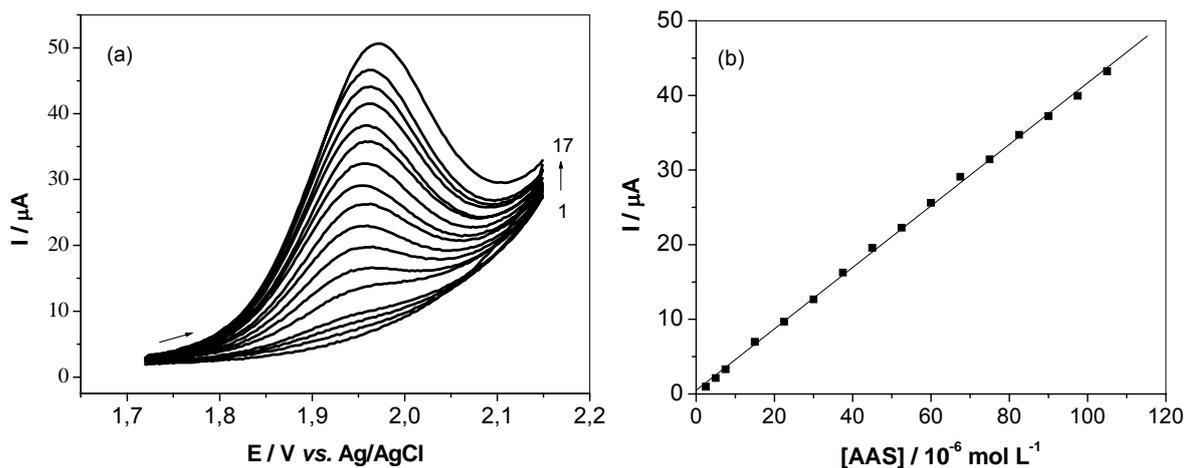


FIGURA 3.13. (a) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de AAS em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$): (1) 0; (2) $2,5 \times 10^{-6}$; (3) $5,0 \times 10^{-6}$; (4) $7,5 \times 10^{-6}$; (5) $1,5 \times 10^{-5}$; (6) $2,2 \times 10^{-5}$; (7) $3,0 \times 10^{-5}$; (8) $3,8 \times 10^{-5}$; (9) $4,5 \times 10^{-5}$; (10) $5,2 \times 10^{-5}$; (11) $6,0 \times 10^{-5}$; (12) $6,8 \times 10^{-5}$; (13) $7,5 \times 10^{-5}$; (14) $8,2 \times 10^{-5}$; (15) $9,0 \times 10^{-5}$; (16) $9,8 \times 10^{-5}$; (17) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica.

O limite de detecção (3 vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica) obtido para o intervalo de concentração estudado foi de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação (10 vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica) foi de $6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Um estudo comparativo empregando as técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial (DPV) para a quantificação do AAS em formulações farmacêuticas foi realizado. Os resultados estão mostrados na TABELA 3.1. Verifica-se que a voltametria de onda quadrada apresentou maior sensibilidade, menor limite de detecção e de quantificação, sendo então selecionada para a determinação de AAS nas amostras comerciais.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada concentração de AAS estão apresentados na FIGURA 3.14. A inserção nesta figura corresponde à curva analítica obtida.

TABELA 3.1. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de AAS utilizando um eletrodo de BDD

Voltametria de onda quadrada			Voltametria de pulso diferencial		
Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados	Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados
Frequência (Hz)	10–200	50	Tempo (ms)	5–20	5
Amplitude (mV)	10–100	40	Amplitude (mV)	25–150	75
Incremento (mV)	1–7	3	Velocidade (mV s ⁻¹)	5–20	7
Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,49 + 4,1 \times 10^5 \{[\text{AAS}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $2,5 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$			Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 7,5 + 2,0 \times 10^5 \{[\text{AAS}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $9,0 \times 10^{-6} - 9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		

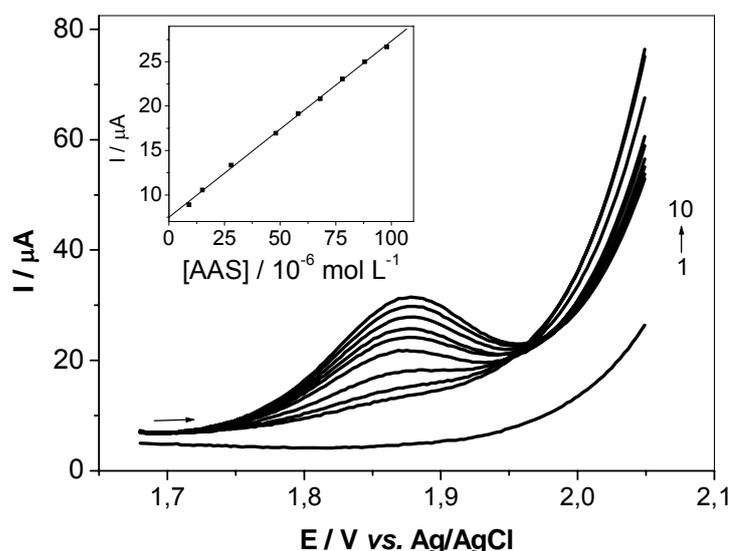


FIGURA 3.14. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de AAS em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 5 \text{ ms}$, $a = 75 \text{ mV}$ e $v = 7 \text{ mV s}^{-1}$): (1) 0; (2) $9,0 \times 10^{-6}$; (3) $1,5 \times 10^{-5}$; (4) $2,8 \times 10^{-5}$; (5) $4,8 \times 10^{-5}$; (6) $5,8 \times 10^{-5}$; (7) $6,8 \times 10^{-5}$; (8) $7,8 \times 10^{-5}$; (9) $8,8 \times 10^{-5}$; (10) $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A figura inserida corresponde a curva analítica ($r = 0,9994$).

3.1.2.3. Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade

O estudo da repetibilidade foi feito em decuplicata ($n = 10$) para uma solução padrão de AAS $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo da reprodutibilidade foram feitas 5

medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de AAS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ambos os estudos foram realizados por voltametria de onda quadrada.

O desvio padrão relativo (RSD) obtido para o estudo da repetibilidade foi de 1,4 % e para a reprodutibilidade foi de 3,2 %.

3.1.2.4. Estudo de interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de AAS em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais, como: amido, manitol, glicose, frutose, sacarose, ácido ascórbico, amarelo crepúsculo (CI 15.985) e vermelho de eritrosina (CI 45.430). Nesses experimentos, foi feita adição destes concomitantes à solução de AAS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de AAS. Exceto para o amido e o ácido ascórbico, nenhuma das demais substâncias investigadas causaram qualquer interferência na determinação de AAS.

Em concentrações 1/10 analito:concomitante, o amido causou um aumento de corrente de aproximadamente 12 % e um deslocamento no pico de oxidação do AAS para valores de potenciais mais positivos, quando comparado ao voltamograma obtido somente para a oxidação do AAS. Porém, a concentração de amido nas amostras é muito menor que a concentração do AAS, tornando assim possível a determinação do analito na presença de amido com boa exatidão. Para o ácido ascórbico (AA) foi observada uma variação positiva na intensidade do pico de oxidação do AAS de 11 % e 12 % quando se adicionou concentração de AA igual ou 10 vezes maior que a de AAS, respectivamente. Entretanto, nos medicamentos encontrados no mercado, a concentração de ácido ascórbico é menor que a concentração de AAS.

3.1.2.5. Teste de adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação do AAS nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado, fornecendo informações sobre a influência de possíveis

interferentes existentes na matriz das amostras desse analito sobre o procedimento proposto.

Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para as amostras de AAS adulto e infantil. A TABELA 3.2 apresenta os resultados de recuperação obtidos.

TABELA 3.2. Estudo de adição e recuperação de AAS em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada

Amostras	AAS (10^{-5} mol L ⁻¹)		Recuperação ^a (%)
	Adicionado	Encontrado	
ASA adulto			
A	1,50	1,40 ± 0,02	93,3
	3,00	2,99 ± 0,02	99,7
	4,50	4,53 ± 0,03	101
B	1,50	1,53 ± 0,02	102
	3,00	3,17 ± 0,01	106
	4,50	4,80 ± 0,03	107
AAS infantil			
A	1,50	1,51 ± 0,02	101
	3,00	2,99 ± 0,05	99,7
	4,50	4,59 ± 0,03	102
B	1,50	1,42 ± 0,03	94,7
	3,00	3,07 ± 0,02	102
	4,50	4,63 ± 0,04	103

^a média de 3 medidas/amostra.

As recuperações variaram entre 93,3 % a 107 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação do AAS pelo procedimento analítico proposto.

3.1.2.6. Aplicação analítica

O método proposto foi aplicado na determinação de AAS em produtos farmacêuticos e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método volumétrico recomendado pela Farmacopéia Britânica³⁰.

Soluções das amostras e soluções de referência de AAS $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram adicionadas à célula eletroquímica. Os resultados obtidos estão apresentados

na TABELA 3.3. Observa-se que os resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência.

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado¹¹¹. O valor de t calculado (2,644) é menor que o valor de t crítico (3,182), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 3.3. Determinação de AAS em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método volumétrico³⁰

Amostras	AAS (mg/comprimido)			Erro relativo ^b (%)
	Rotulado	Referência ^a	Proposto ^a	
AAS adulto				
A	500	498 ± 3	498 ± 1	0,0
B	500	501 ± 1	503 ± 2	0,40
AAS infantil				
A	100	99 ± 1	97 ± 1	-2,0
B	85	85 ± 1	86 ± 1	1,2

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra;

^b100 × (proposto–referência)/referência.

3.2. Determinação de propranolol

3.2.1. Voltametria cíclica

Inicialmente foram realizados experimentos de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação e/ou redução do propranolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do eletrodo de BDD em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Pela FIGURA 3.15 pode-se observar que o PROP apresenta um pico de oxidação em torno de $+1,30 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$, com características de um processo irreversível, uma vez que o voltamograma não apresenta pico de redução no sentido inverso.

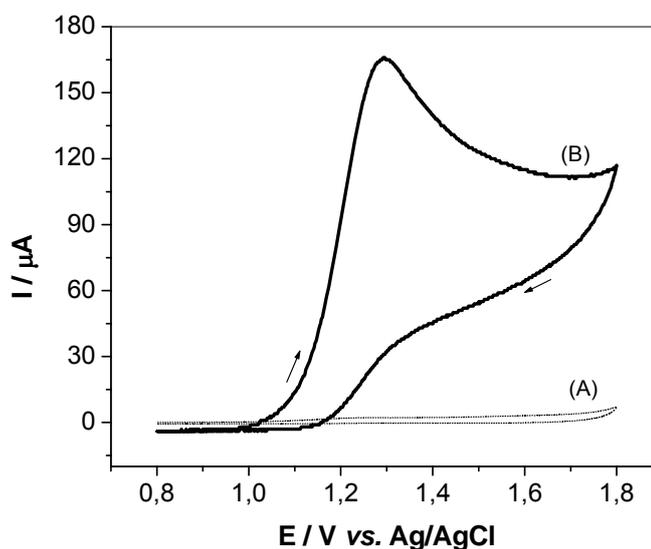


FIGURA 3.15. Voltamogramas cíclicos (200 mV s^{-1}) empregando o eletrodo de BDD na ausência (A) e na presença (B) de PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Como o propranolol possui uma estrutura semelhante àquela do atenolol, há grande possibilidade de estar sendo oxidado o grupo alcoólico de sua molécula⁷², produzindo dessa forma o processo anódico observado na FIGURA 3.15.

As respostas voltamétricas da oxidação do PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suportes, tais como: ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, tampão BR pH 2,2, tampão acetato pH 4,0, tampão citrato pH 5,0 e tampão fosfato pH 6,0 são mostradas nas FIGURAS 3.16(a) e 3.16(b). Em tampão acetato, citrato e fosfato foi observada uma diminuição gradativa na corrente de pico com as varreduras

sucessivas, o que não foi constatado para os demais eletrólitos suporte investigados. Dessa forma, o ácido sulfúrico foi então selecionado como eletrólito suporte, por proporcionar maior magnitude de corrente.

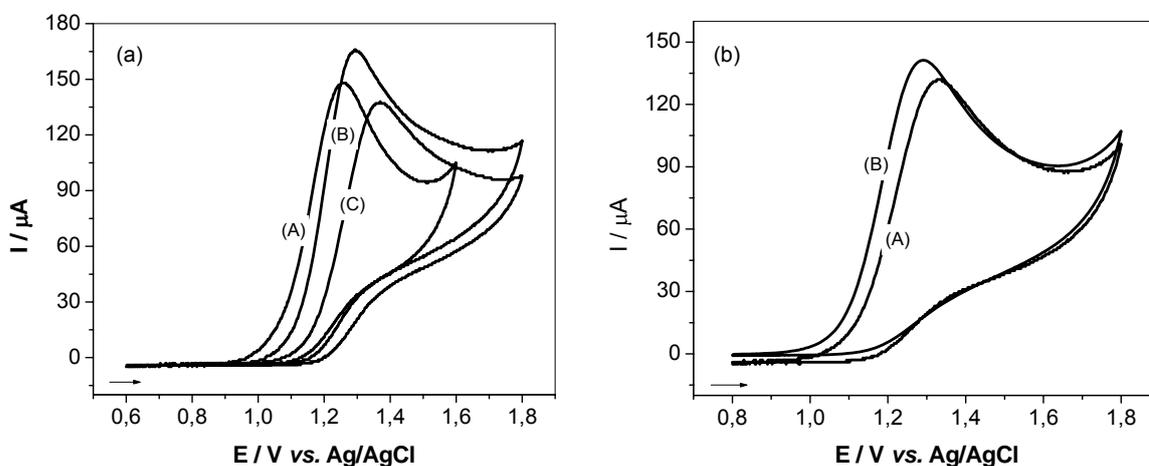


FIGURA 3.16. Voltamogramas cíclicos (200 mV s^{-1}) para a oxidação do PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte: (a): (A) tampão citrato pH 5,0, (B) ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (C) tampão BR pH 2,2 e (b): (A) tampão acetato pH 4,0 e (B) tampão fosfato pH 6,0.

Posteriormente, foi realizado o estudo da influência da variação da concentração do H_2SO_4 no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos para o PROP em diferentes concentrações de H_2SO_4 encontram-se na FIGURA 3.17. Pode-se observar que tanto a corrente como o potencial de pico são influenciados pela concentração do ácido sulfúrico. Quanto maior a concentração do H_2SO_4 observa-se maior magnitude do sinal analítico e deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos. No entanto, em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi observada melhor definição do perfil voltamétrico, quando comparado ao perfil voltamétrico obtido em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, além do que a variação de corrente entre eles é pequena. Assim, selecionou-se uma concentração de H_2SO_4 igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nesta concentração do eletrólito suporte, foi observado um potencial de pico do analito em torno de $1,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

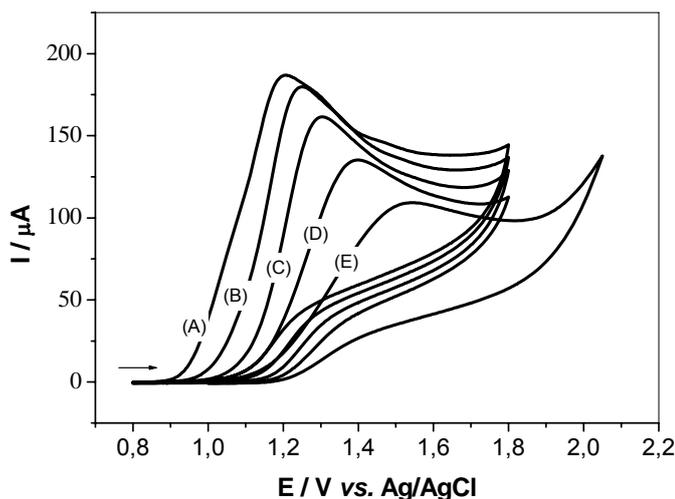


FIGURA 3.17. Voltamogramas cíclicos (200 mV s^{-1}) para a oxidação do PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de H_2SO_4 : (A) 0,5, (B) $1,0 \times 10^{-1}$, (C) $1,0 \times 10^{-2}$, (D) $1,0 \times 10^{-3}$ e (E) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A FIGURA 3.18(a) mostra os voltamogramas cíclicos para o PROP sobre o eletrodo de BDD após os pré-tratamentos anódico e catódico, no qual foi aplicada ao eletrodo uma corrente de 1 A cm^{-2} durante 60 s e -1 A cm^{-2} durante 120 s, respectivamente. Com o pré-tratamento catódico o eletrodo de BDD apresentou um perfil voltamétrico mais bem definido para a oxidação do PROP. Além do mais, nas medidas realizadas após o tratamento anódico foi observada uma diminuição gradativa da corrente durante as varreduras.

Um estudo do melhor tempo de pré-tratamento catódico do eletrodo de BDD para a oxidação do PROP foi também executado, podendo-se observar que não houve diferença significativa na variação de corrente entre os pré-tratamentos de 120 e 180 s. Sendo assim, selecionou-se um tempo de pré-tratamento de 120 s para dar sequência aos estudos posteriores (FIGURA 3.18(b)). Esse pré-tratamento catódico era realizado somente no início de cada dia de trabalho, para garantir resultados reprodutíveis.

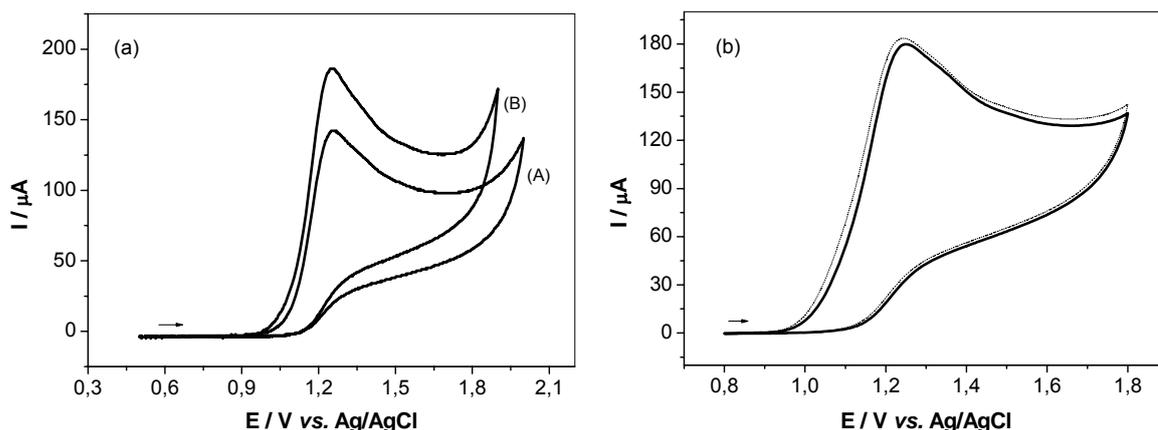


FIGURA 3.18. (a) Voltamogramas cíclicos (200 mV s^{-1}) para a oxidação do PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se o eletrodo de BDD com pré-tratamento anódico (a) e com pré-tratamento catódico (b); (b) Pré-tratamento catódico: (—) 120 s e (---) 180 s.

Todas as medidas do PROP sobre o eletrodo de BDD foram realizadas na presença de oxigênio, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no perfil voltamétrico da oxidação do PROP na presença e na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio, a magnitude do sinal analítico foi ligeiramente superior àquela obtida sem a retirada de oxigênio das soluções.

A estabilidade da solução de PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliada em um período de 8 horas, monitorando-se a concentração do propranolol por voltametria cíclica. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, com desvio padrão relativo de 1,0 %, indicando que não houve degradação do propranolol nessas condições neste período de trabalho.

A dependência da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalo de 5 a 200 mV s^{-1}) também foi investigada para a oxidação do PROP (FIGURA 3.19(a)). A existência de uma linearidade ($r = 0,9996$) entre as correntes de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o transporte de massa é difusional para a oxidação do PROP na superfície do eletrodo de BDD¹⁰⁹. Além do mais, o coeficiente linear apresentado por esta reta está muito próximo de zero ($I_p = -0,071 + 1,4 v^{1/2}$), indicando que o transporte de massa é controlado por difusão das espécies, com pequena influência de algum processo adsorptivo.

Adicionalmente, o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.19(b)) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,52, que está próximo do previsto na literatura (0,50) para o transporte de massa controlado pela difusão de espécies¹¹⁰.

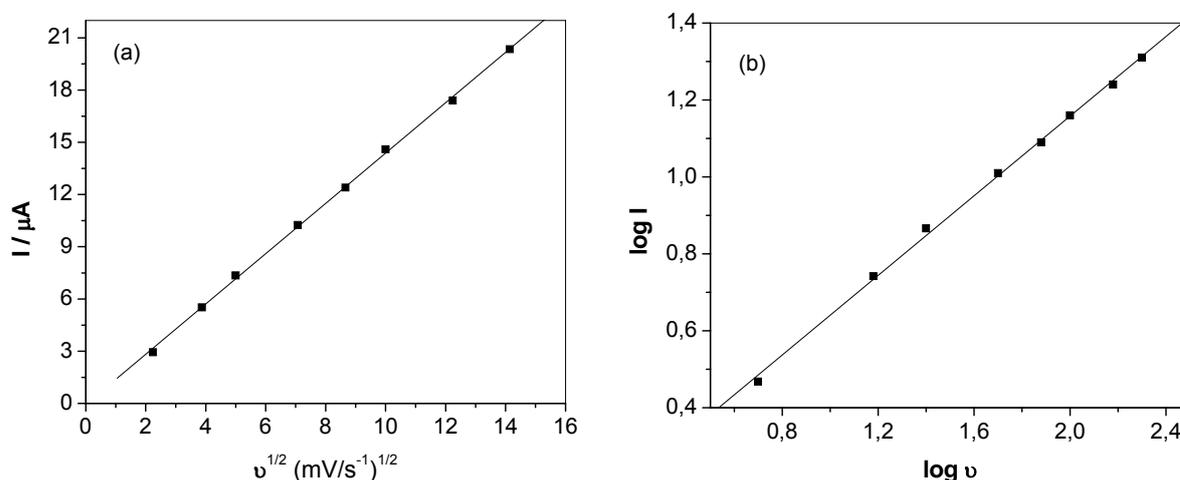


FIGURA 3.19. (a) Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e (b) dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de PROP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.2. Voltametria de onda quadrada

Assim como observado inicialmente por voltametria cíclica, o propranolol apresentou somente um pico de oxidação, em torno de +1,20 V vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A FIGURA 3.20 apresenta a separação das componentes de corrente para o PROP sobre o eletrodo de BDD com a voltametria de onda quadrada. A corrente usada na determinação do propranolol (soma entre as correntes de varredura no sentido direto e no sentido reverso de aplicação de pulsos de potencial) é bastante semelhante à corrente direta. Ademais, a corrente reversa não apresenta pico, indicando comportamento característico de um sistema totalmente irreversível¹¹⁰.

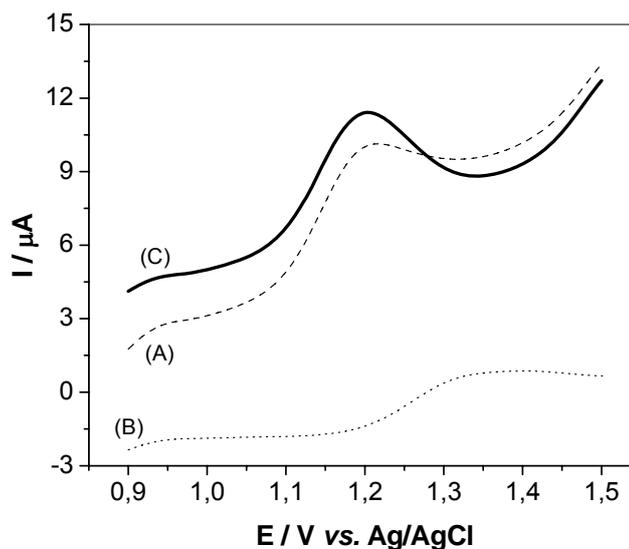


FIGURA 3.20. Voltamogramas de onda quadrada para o PROP $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 130 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$): (A) corrente direta, (B) corrente reversa e (C) corrente resultante.

3.2.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada¹¹⁰

A FIGURA 3.21(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o PROP em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial. Observa-se que, à medida que se aumenta a frequência de aplicação de pulsos de potenciais ocorre um aumento na intensidade da corrente de pico e um mínimo deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos. Ocorre também um deslocamento da linha base para valores maiores de corrente. Sendo assim, para evitar altos valores de corrente para a linha base, a frequência de aplicação dos pulsos de potencial selecionada foi 130 s^{-1} .

A FIGURA 3.21(b) (com correção da linha base) mostra o comportamento da corrente de pico para a oxidação do PROP em função da variação da frequência. Pela linearidade obtida, verifica-se que o transporte de massa é predominantemente controlado por difusão para a oxidação do propranolol sobre o eletrodo de BDD.

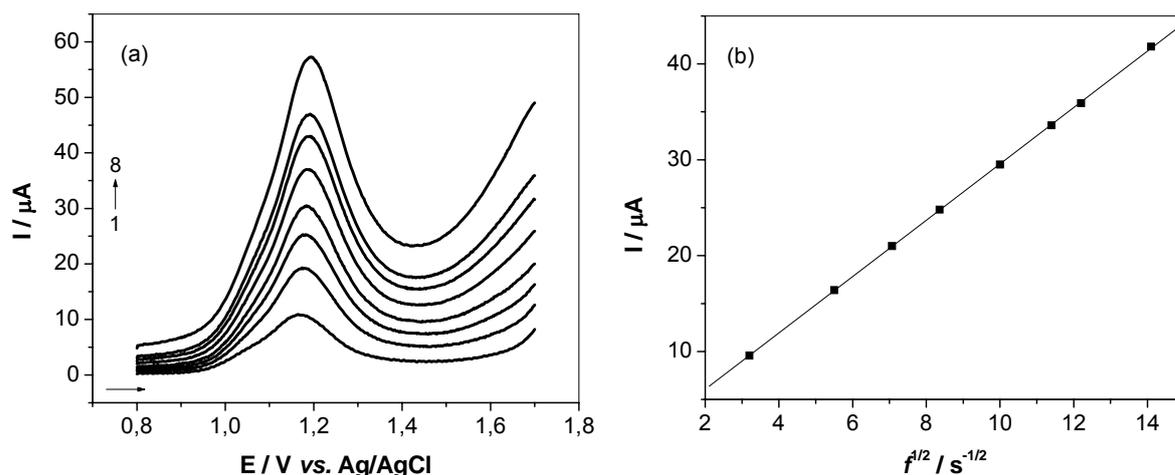


FIGURA 3.21. (a) Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$). Frequências: (1) 10, (2) 30, (3) 50, (4) 70, (5) 100, (6) 130, (7) 150 (8) 200 s^{-1} . (b) Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

A FIGURA 3.22(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o propranolol em diferentes valores de amplitude de pulso. Até praticamente 50 mV o potencial de pico é mantido e para valores acima deste ocorre deslocamento para potenciais menos positivos e um alargamento nos voltamogramas, promovendo uma alteração na sua largura de meia-altura, conseqüentemente não atuando de forma significativa na sensibilidade para propósitos analíticos. Em amplitudes elevadas ocorre uma pronunciada deformação do voltamograma.

Pela FIGURA 3.22(b) (com correção da linha base) observa-se que para valores de amplitudes menores que 50 mV, o aumento de intensidade de corrente é praticamente linear. Ademais, para amplitudes de pulso de potencial maiores, os valores afastam-se da linearidade. Assim, optou-se por trabalhar com uma amplitude de pulso de potencial de 50 mV.

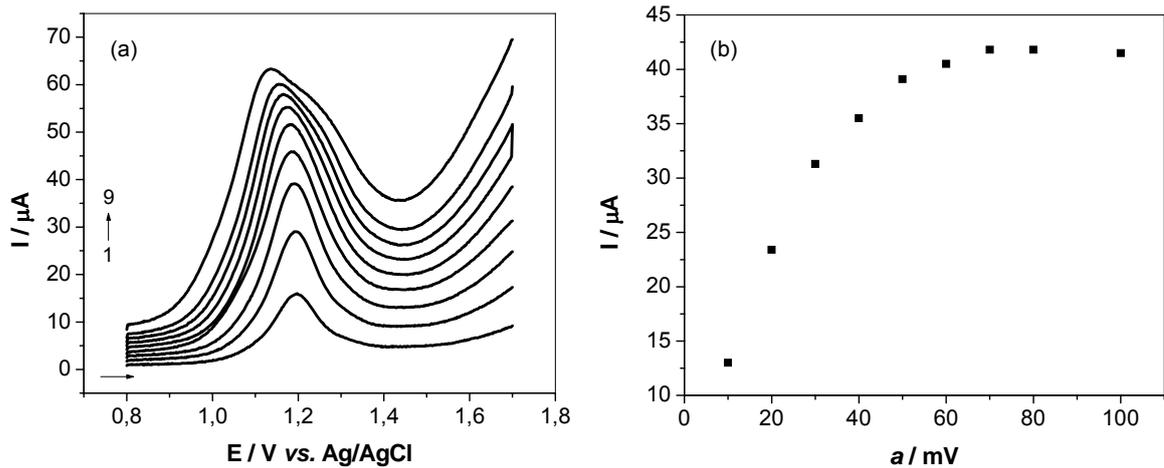


FIGURA 3.22. (a) Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 130 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$). Amplitudes: (1) 10, (2) 20, (3) 30, (4) 40, (5) 50, (6) 60, (7) 70, (8) 80 e (9) 100 mV. (b) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o PROP em diferentes valores de incremento de varredura são mostrados na FIGURA 3.23. Observa-se que com o aumento do incremento de varredura ocorre um aumento da intensidade de corrente e um deslocamento mínimo dos potenciais de pico para regiões mais positivas. Selecionou-se 6 mV para o incremento de varredura.

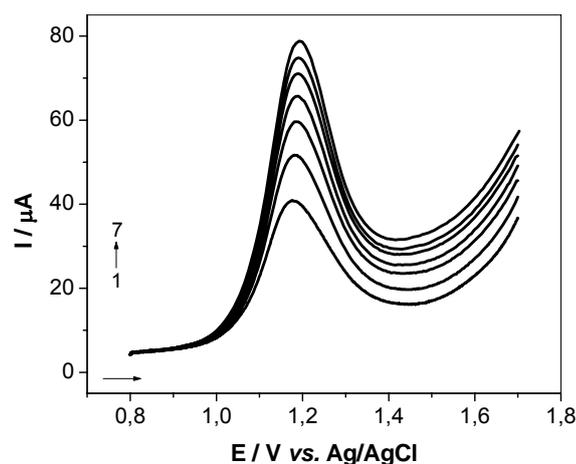


FIGURA 3.23. Variação do incremento de varredura nos voltamogramas do PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 130 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$), sendo: (1) 1, (2) 2, (3) 3, (4) 4, (5) 5, (6) 6, (7) 7 mV.

3.2.2.2. Curva analítica

Após a otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de 0,90 a 1,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) em diferentes concentrações de PROP, de $2,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ empregando-se o eletrodo de BDD. A FIGURA 3.24(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada concentração de propranolol. Observa-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração e que praticamente não ocorre deslocamento no valor dos potenciais de pico.

A curva analítica é mostrada na FIGURA 3.24(b) e a equação de reta obtida foi: $I_p/\mu\text{A} = 0,25 + 7,1 \times 10^5 \{[\text{PROP}]/\text{mol L}^{-1}\}$, $r = 0,9994$. Os limites de detecção e quantificação obtidos para o intervalo de concentração estudado foram de $1,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $5,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

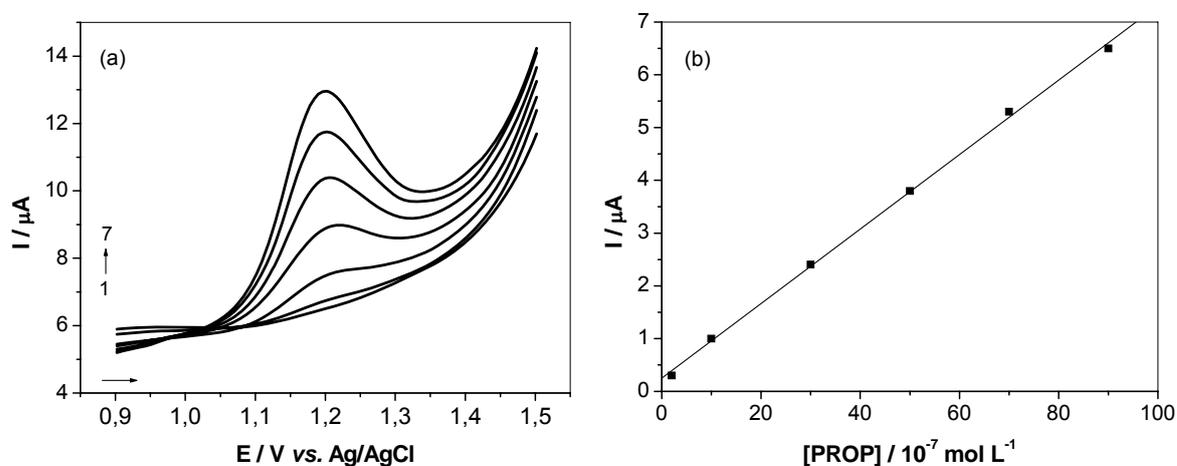


FIGURA 3.24. (a). Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de PROP em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ ($f = 130 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 6 \text{ mV}$): (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-7}$; (3) $1,0 \times 10^{-6}$; (4) $3,0 \times 10^{-6}$; (5) $5,0 \times 10^{-6}$; (6) $7,0 \times 10^{-6}$; (7) $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; (b) Curva analítica.

Um estudo comparativo empregando as técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a quantificação do propranolol em formulações farmacêuticas foi realizado. Os resultados estão mostrados na TABELA 3.4. Verifica-se que a voltametria de onda quadrada apresentou maior sensibilidade, menor limite

de detecção e de quantificação, sendo então selecionada para a determinação de PROP nas amostras comerciais.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada concentração de propranolol estão apresentados na FIGURA 3.25(a) com a respectiva curva analítica na FIGURA 3.25(b).

TABELA 3.4. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de PROP

Voltametria de onda quadrada			Voltametria de pulso diferencial		
Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados	Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados
Frequência (Hz)	10–200	130	Tempo (ms)	5–20	7
Amplitude (mV)	10–100	50	Amplitude (mV)	25–150	75
Incremento (mV)	1–7	6	Velocidade (mV s ⁻¹)	5–20	10
Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,25 + 7,1 \times 10^5 \{[\text{PROP}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $1,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $5,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $2,0 \times 10^{-7} - 9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$			Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,19 + 2,5 \times 10^5 \{[\text{PROP}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $6,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $2,0 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		

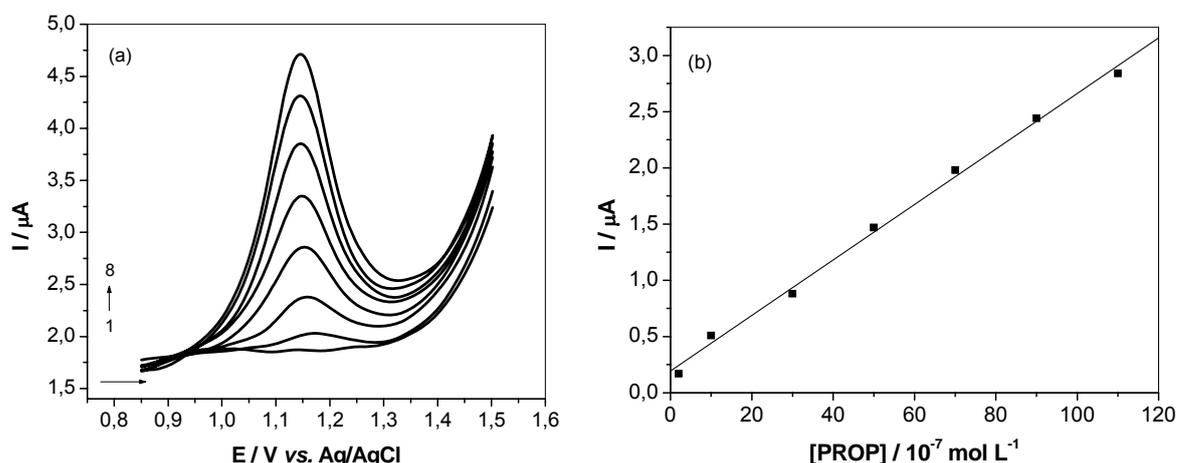


FIGURA 3.25. (a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de PROP em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (t = 7 ms, a = 75 mV e v = 10 mV s⁻¹): (1) 0; (2) 2,0 × 10⁻⁷; (3) 1,0 × 10⁻⁶; (4) 3,0 × 10⁻⁶; (5) 5,0 × 10⁻⁶; (6) 7,0 × 10⁻⁶; (7) 9,0 × 10⁻⁶; (8) 1,1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹; (b) Curva analítica (r = 0,9980).

3.2.2.3. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

O estudo da repetibilidade foi feito em decuplicata ($n = 10$) para a solução padrão de propranolol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Para o estudo da reprodutibilidade foram feitas 5 medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de PROP $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Ambos os estudos foram realizados por voltametria de onda quadrada.

O desvio padrão relativo obtido para o estudo de repetibilidade foi de 0,33 % e para a reprodutibilidade foi de 3,5 %.

3.2.2.4. Estudo de interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de propranolol em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais, como: manitol, lactose, amido, povidona (polivinilpirrolidona), hidroclorotiazida e estearato de magnésio. Nesses experimentos, foi feita adição destes concomitantes à solução de PROP $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de PROP. A hidroclorotiazida (associação com o propranolol) é insolúvel nas condições experimentais utilizadas.

Pelos estudos realizados, somente a povidona e o amido, em concentrações 1/10 analito:concomitante, apresentaram uma interferência de -7,4 e + 4,4 %, respectivamente. Entretanto, cabe ressaltar que o teor desses excipientes nos produtos farmacêuticos disponíveis no mercado são inferiores aos testados nesse estudo. O método pode ser aplicado para a quantificação do PROP nas referidas amostras sem a interferência desses concomitantes, com boa exatidão.

3.2.2.5. Teste de adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação do PROP nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado, fornecendo informações sobre a influência de possíveis interferentes existentes na matriz das amostras desse analito sobre o procedimento proposto. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para as amostras

de PROP nas dosagens 10, 40 e 80 mg, cujos resultados são apresentados na TABELA 3.5.

TABELA 3.5. Estudo de adição e recuperação de PROP em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada

Amostras	propranolol (10^{-6} mol L $^{-1}$)		Recuperação ^a (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	1,65	1,60 ± 0,02	97,0
	3,53	3,70 ± 0,01	105
	5,34	5,54 ± 0,03	104
B	1,65	1,62 ± 0,02	98,2
	3,53	3,72 ± 0,01	105
	5,34	5,62 ± 0,01	105
C	1,65	1,55 ± 0,02	93,9
	3,53	3,55 ± 0,04	101
	5,34	5,26 ± 0,01	98
D	1,65	1,72 ± 0,01	104
	3,53	3,36 ± 0,01	95,2
	5,34	5,38 ± 0,02	101
E*	1,65	1,61 ± 0,01	97,6
	3,53	3,65 ± 0,03	103
	5,34	5,61 ± 0,02	105
F	1,65	1,58 ± 0,01	95,8
	3,53	3,60 ± 0,02	102
	5,34	5,30 ± 0,01	99,2

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra;

*amostra continha 25 mg de hidroclorotiazida.

As recuperações variaram entre 93,9 % a 105 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de PROP empregando-se o procedimento analítico proposto.

3.2.2.6. Aplicação analítica

O método proposto foi aplicado na determinação de propranolol em produtos farmacêuticos e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método espectrofotométrico descrito pela Farmacopéia Brasileira⁵¹. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 3.6. Observa-se que os

resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência.

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado¹¹⁰. O valor de t calculado (1,170) é menor que o valor de t crítico (2,571), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 3.6. Determinação de PROP em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método espectrofotométrico⁵¹

Amostras	propranolol (mg/comprimido)			Erro relativo ^b (%)
	Rotulado	Referência ^a	Proposto ^a	
A	10	9,93 ± 0,04	9,97 ± 0,02	0,40
B	40	37,0 ± 0,8	37,6 ± 0,6	1,6
C	40	39,8 ± 0,6	40,8 ± 0,5	2,5
D	40	40,3 ± 0,7	38,6 ± 0,8	-4,2
E [#]	40	43,7 ± 0,6	41,7 ± 0,4	-4,6
F	80	78,8 ± 0,9	77,0 ± 0,9	-2,3

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra;

^b100 × (proposto–referência)/referência;

[#]amostra continha 25 mg de hidroclorotiazida

3.3. Determinação de atenolol

3.3.1. Voltametria cíclica

Inicialmente foram realizados experimentos de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação e/ou de redução do atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do eletrodo de BDD em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (FIGURA 3.26). A oxidação eletroquímica do atenolol é representada por picos irreversíveis a $+1,23 \text{ V}$ (pico 1), $+1,50 \text{ V}$ (pico 2) e $+1,80 \text{ V}$ (pico 3) vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

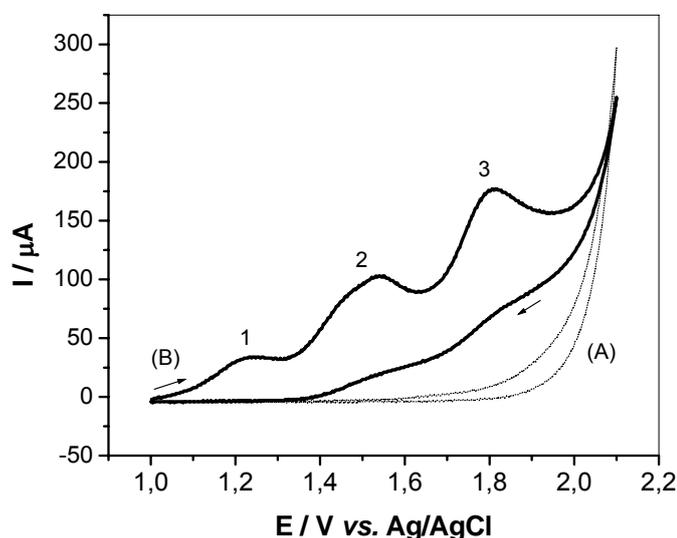


FIGURA 3.26. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) empregando o eletrodo de BDD, na ausência (A) e na presença de atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (B), em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

De acordo com GOYAL et al.⁷², o processo anódico do atenolol se deve à oxidação do grupo alcoólico presente na estrutura da sua molécula, posteriormente formando ácido carboxílico, e que a oxidação dos grupos amino não ocorre em baixos valores de pH. Em potenciais mais positivos (região de decomposição da água), nos quais é observado o terceiro processo anódico, deve estar ocorrendo uma provável hidroxilação do anel aromático, como sugerido para o AAS, no Item 3.1.

Posteriormente foi investigado o efeito de diferentes eletrólitos suportes, tais como: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão BR pH 2,2, tampão acetato pH 4,0, KNO_3

0,5 mol L⁻¹, KCl 0,5 mol L⁻¹ e NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹. As respostas voltamétricas da oxidação do atenolol 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ são mostradas nas FIGURAS 3.27 (a) e 3.27(b). Dentre todos os eletrólitos estudados, o atenolol mostrou um melhor perfil voltamétrico em ácido sulfúrico. Entretanto, para este e todos os tampões foi observada uma diminuição gradativa na corrente de pico com as varreduras de potencial. Esse comportamento sugere uma provável adsorção do atenolol ou de seu(s) produto(s) de oxidação na superfície do eletrodo de BDD. Dessa forma, o NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ foi escolhido como eletrólito suporte para dar sequência à determinação de atenolol em formulações farmacêuticas, pois foi observada uma melhor resolução do pico de oxidação em torno de +1,80 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), além de se obter repetibilidade nas medidas com a obtenção de correntes mais estáveis.

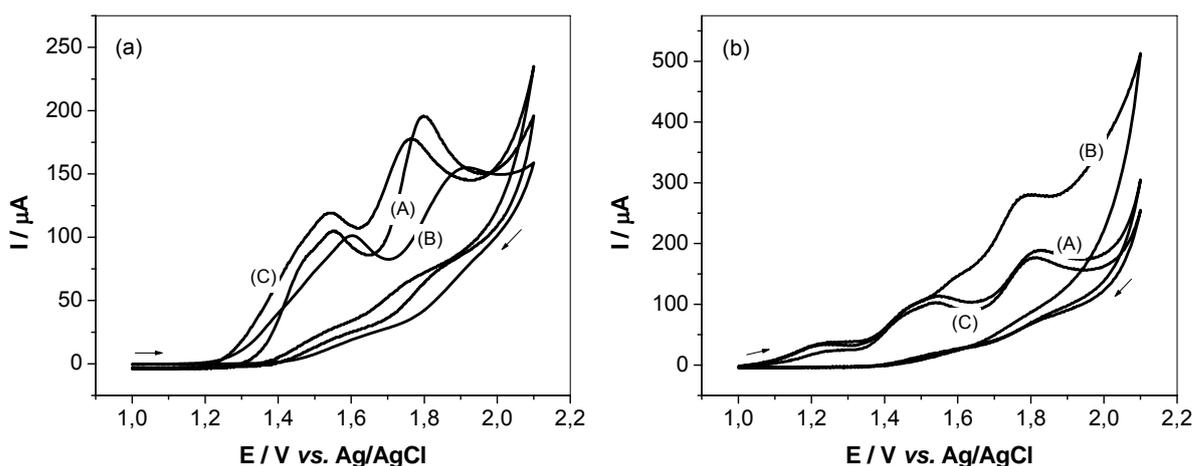


FIGURA 3.27. Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) para a oxidação do atenolol 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte: (a): (A) H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, (B) tampão BR pH 2,2, (C) tampão acetato pH 4,0, (b): (A) KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, (B) KCl 0,5 mol L⁻¹ e (C) NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹.

O efeito da concentração do NaNO₃, no intervalo de 0,01 a 0,5 mol L⁻¹, sobre o sinal analítico foi estudado em seguida. Como pode ser observado na FIGURA 3.28, ao ser aumentada a concentração do NaNO₃, há um deslocamento da corrente de pico para valores menos positivos de potencial e uma melhor resolução do perfil voltamétrico, especialmente para o processo anódico em torno de +1,80 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Sendo assim, foi selecionada uma solução de NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ como eletrólito suporte.

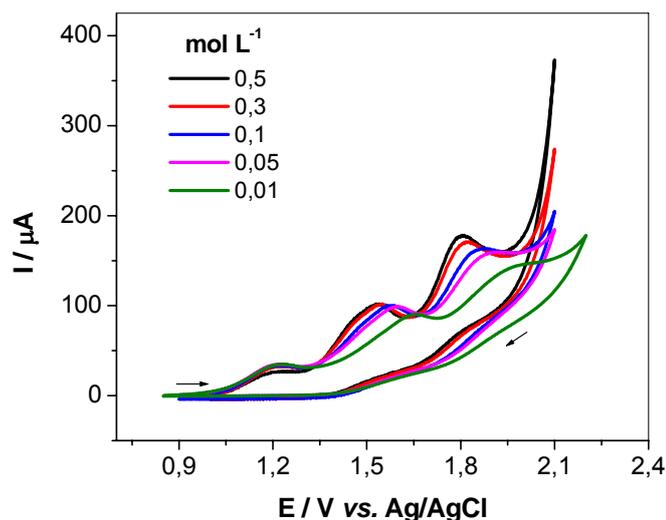


FIGURA 3.28. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) para a oxidação de atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de NaNO_3 .

O efeito da acidez do meio no intervalo de pH 1,1 a 10 (ajustado com HNO_3 concentrado e/ou $\text{NaOH } 2,0 \text{ mol L}^{-1}$) foi também investigado. Os voltamogramas cíclicos para o atenolol em diferentes valores de pH são mostrados na FIGURA 3.29. Pode-se observar que a corrente e o potencial de pico não são influenciados pelo pH do meio. Em $\text{pH} \leq 2,0$ verificam-se dois processos anódicos.

Em $\text{NaNO}_3 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 concentrado) observa-se um perfil voltamétrico melhor definido para o processo anódico em torno de $+1,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), sendo então selecionado.

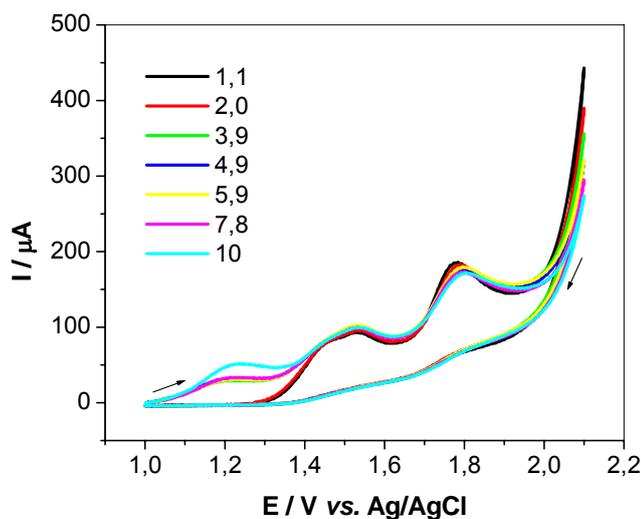


FIGURA 3.29. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) para a oxidação de atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH_{cond} (1,1 – 10; ajustados com HNO_3 conc. e/ou $\text{NaOH } 2,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Para a determinação do atenolol foi utilizado o processo anódico em torno de +1,80 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Ao se fazer a varredura entre 1,5 V a 1,85 V este pico continua a ser observado e mantém-se constante com o aumento do número de ciclos, indicando que este processo anódico é independente dos demais, não sendo resultante da oxidação de algum produto de oxidação envolvido nos processos anódicos anteriores. Apesar de estar em um potencial desfavorável (próximo à região de evolução de oxigênio), este pico de oxidação apresentou um perfil voltamétrico melhor definido com uma intensidade de corrente de pico maior. Ademais, para as determinações deste analito em formulações farmacêuticas não ocorre interferências sérias, como poderá ser visto mais adiante.

Realizou-se um estudo do melhor pré-tratamento do eletrodo de BDD (anódico e catódico). Quando pré-tratado catodicamente (1 A cm⁻² durante 120 s) foi possível obter um aumento considerável na magnitude de corrente de pico, além de uma melhor definição de pico. Por conseguinte, o tempo de pré-tratamento também foi avaliado em 120, 180 e 240 s (FIGURA 3.30). Pode-se observar que não há diferença significativa entre os tempos e, como consequência, escolheu-se 120 s para dar continuidade aos estudos. Esse pré-tratamento catódico foi realizado toda vez, antes do início do experimento em cada dia de trabalho.

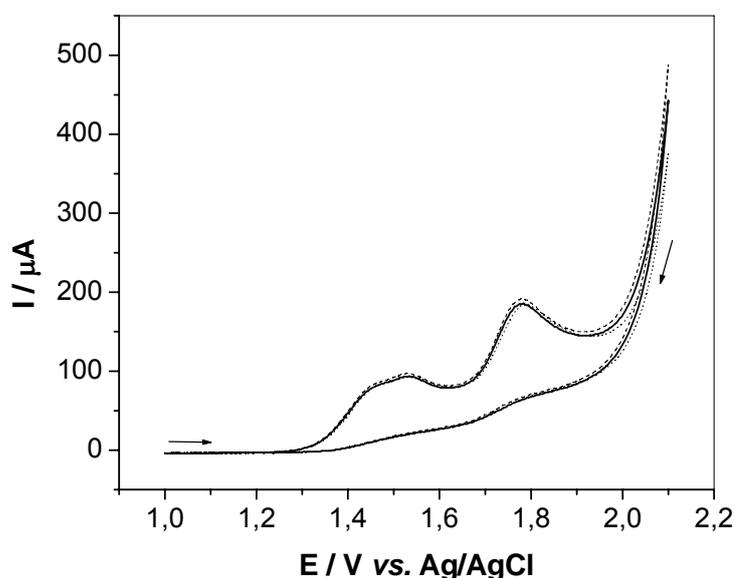


FIGURA 3.30. Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) para a oxidação do atenolol 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH_{cond} 1,1 ajustado com HNO₃ conc.) empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes tempos de pré-tratamento catódico (—) 120, (---) 180 e (.....) 240 s.

Todas as medidas do atenolol sobre o eletrodo de BDD foram realizadas na presença de oxigênio, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no perfil voltamétrico da oxidação do atenolol na presença e na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio, a magnitude do sinal analítico foi ligeiramente superior àquela obtida sem a retirada de oxigênio das soluções.

A estabilidade da solução de atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) foi avaliada em um período de 8 horas, monitorando-se a concentração do atenolol por voltametria cíclica com um intervalo de uma hora entre cada medida. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, com desvio padrão relativo de 1,2 %, podendo-se considerar que não houve decomposição do atenolol em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) neste período de trabalho.

A dependência da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalo de 5 a 200 mV s^{-1}) foi investigada para o processo anódico em torno de $+1,80 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$. (FIGURA 3.31(a)).

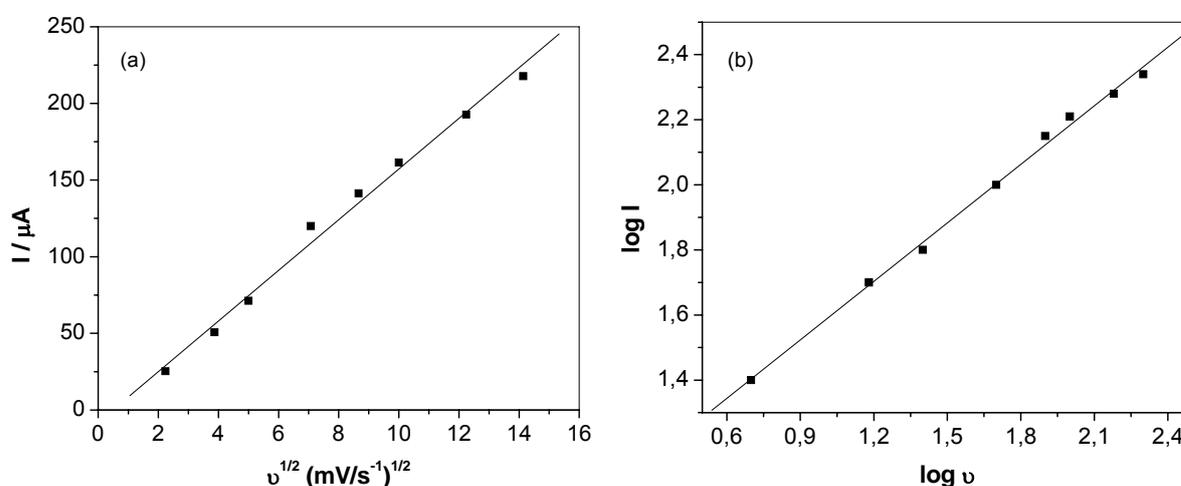


FIGURA 3.31. (a) Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura e (b) dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de atenolol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.).

A existência de uma linearidade ($r = 0,9955$) entre as correntes de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o transporte de massa é difusional para a oxidação do atenolol na superfície do eletrodo de BDD¹⁰⁹.

Observa-se nesse gráfico, que o coeficiente linear obtido é diferente de zero ($I_p = -8,01 + 16,5 v^{1/2}$), devido provavelmente a processos adsorptivos no eletrodo de trabalho. Adicionalmente, o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.31(b)) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,60, que está próximo do previsto pela técnica voltamétrica (0,50) para sistemas controlados pela difusão de espécies¹⁰⁹.

3.3.2. Voltametria de onda quadrada

Como mencionado anteriormente, o pico de oxidação em +1,80 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) (pico 3) obtido por voltametria cíclica foi selecionado para a quantificação do atenolol em formulações farmacêuticas utilizando a voltametria de onda quadrada. Os voltamogramas de onda quadrada apresentaram um comportamento semelhante àquele obtido por voltametria cíclica.

A FIGURA 3.32 apresenta a separação das componentes de corrente para o atenolol sobre o eletrodo de BDD com a voltametria de onda quadrada. Observa-se que a corrente resultante (utilizada para as medidas) é bastante semelhante à corrente direta e ainda, a corrente reversa não apresenta pico. Esse comportamento é característico de sistemas totalmente irreversíveis¹¹⁰.

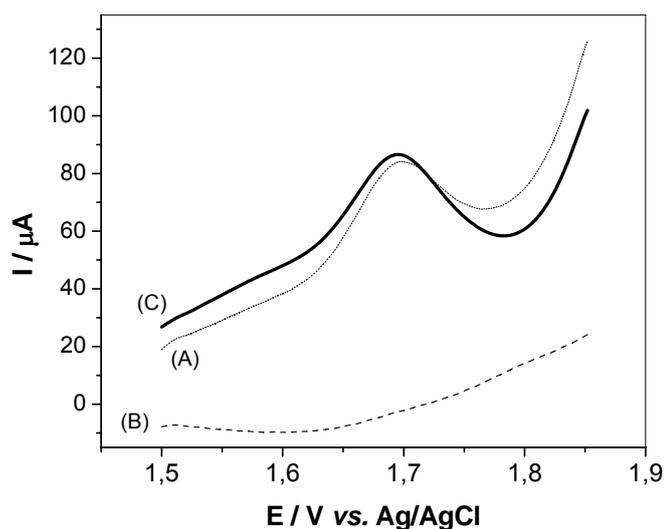


FIGURA 3.32. Voltamogramas de onda quadrada para o atenolol $6,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH 1,1 ajustado com HNO₃ conc.) ($f = 100$ s⁻¹, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV): (A) corrente direta, (B) corrente reversa e (C) corrente resultante.

3.3.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada¹¹⁰

A FIGURA 3.33(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o atenolol em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial. Observa-se que, com o aumento no valor da frequência, ocorre um aumento na intensidade de corrente de pico e também um mínimo deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais positivas. Há um deslocamento da linha base para valores maiores de corrente, comportamento semelhante ao apresentado pelos analitos anteriores, sendo assim, a frequência de aplicação dos pulsos de potencial selecionada foi de 100 s^{-1} .

A corrente de pico, neste caso é uma função linear da frequência de aplicação dos pulsos de potencial (FIGURA 3.33(b), com correção da linha base), indicando que há participação de algum processo adsorptivo, de produto e/ou reagente, na superfície eletródica.

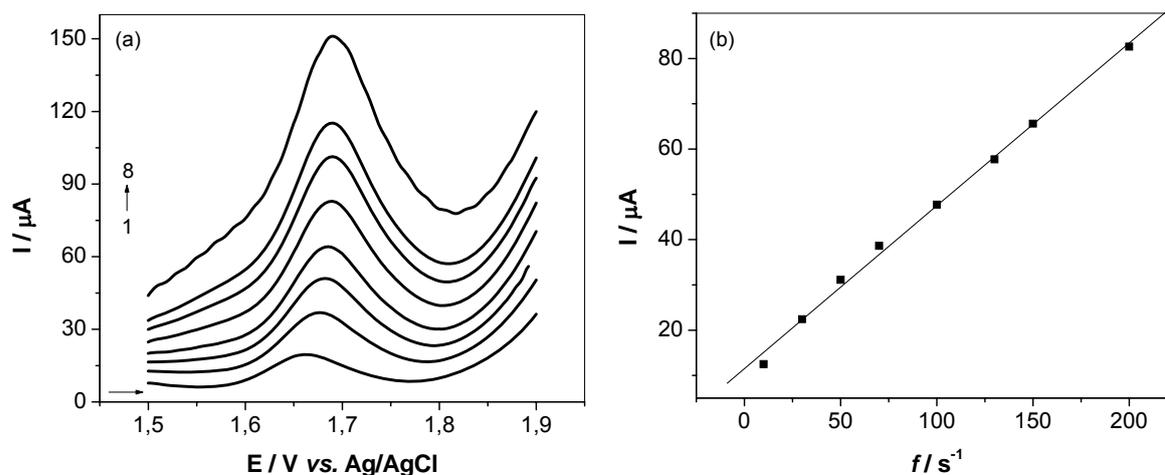


FIGURA 3.33. (a) Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do atenolol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) ($a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). Frequências: (1) 10, (2) 30, (3) 50, (4) 70, (5) 100, (6) 130, (7) 150 (8) 200 s^{-1} . (b) Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos para o atenolol.

Na FIGURA 3.34(a) estão apresentados os voltamogramas obtidos para o atenolol em função da variação da amplitude de pulso de potencial. Observa-se que para valores de amplitudes menores que 40 mV (FIGURA 3.34(b), com correção da linha base), o aumento de intensidade de corrente é praticamente linear. Por outro lado, para valores acima de 40 mV ocorre deslocamento do potencial de pico para

valores menos positivos, com perda da linearidade. Assim, optou-se por trabalhar com uma amplitude de pulso de potencial de 40 mV.

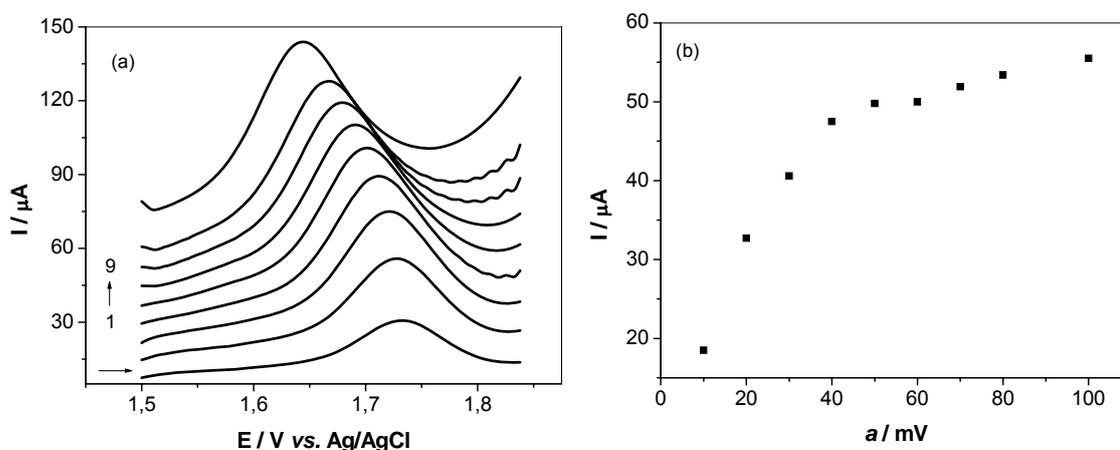


FIGURA 3.34. (a) Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do atenolol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$). Amplitudes: (1) 10, (2) 20, (3) 30, (4) 40, (5) 50, (6) 60, (7) 70, (8) 80 e (9) 100 mV. (b) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial para o atenolol.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o atenolol em diferentes valores de incremento de varredura são mostrados na FIGURA 3.35. Observa-se que com o aumento do incremento de varredura ocorre um aumento na intensidade de corrente e deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos. Há um aumento linear da corrente de pico com o incremento de varredura até 4 mV, sendo esse valor então selecionado.

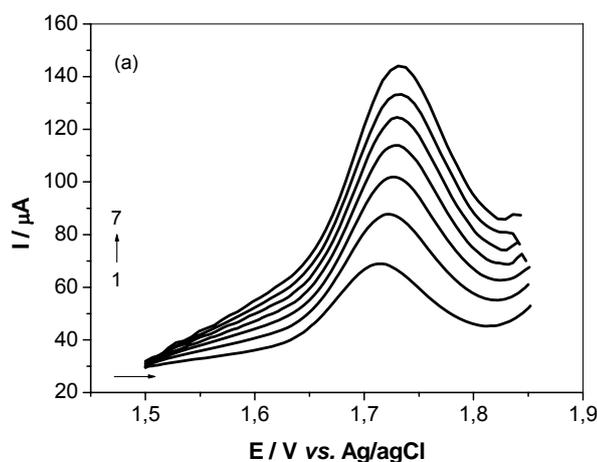


FIGURA 3.35. Variação do incremento de varredura nos voltamogramas do atenolol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$), sendo: (1) 1, (2) 2, (3) 3, (4) 4, (5) 5, (6) 6, (7) 7 mV.

3.3.2.2. Curva analítica

Após a otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de 0,90 a 1,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) em diferentes concentrações de propranolol, de $2,0 \times 10^{-6}$ a $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH_{cond} 1,1 ajustado com HNO₃ conc.) empregando-se o eletrodo de BDD. A FIGURA 3.36(a) mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada concentração de atenolol.

A curva analítica é mostrada na FIGURA 3.36(b), e a equação de reta obtida foi: $I_p/\mu\text{A} = 1,3 + 8,0 \times 10^5 \{[\text{atenolol}]/\text{mol L}^{-1}\}$, $r = 0,9997$.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o intervalo de concentração estudado foram de $9,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $3,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

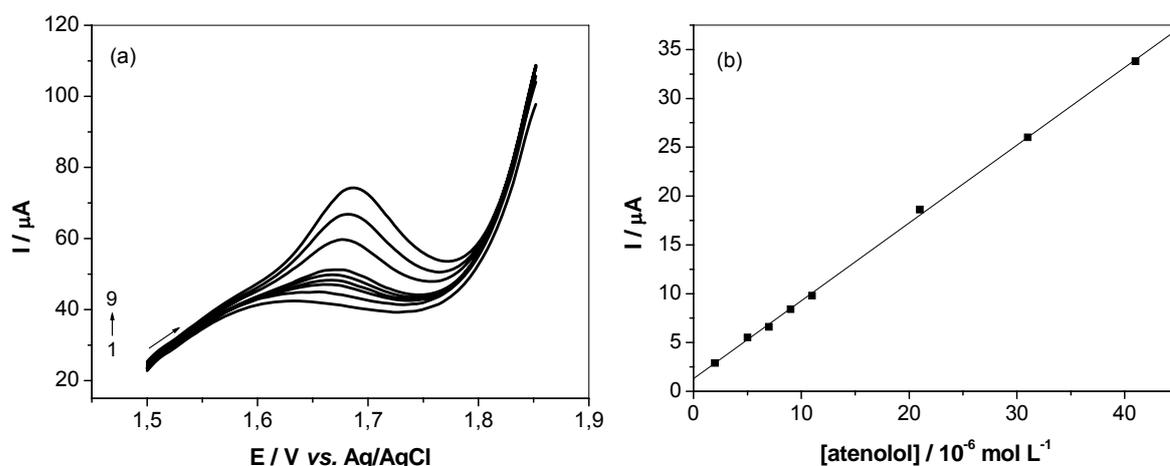


FIGURA 3.36. (a) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de atenolol em NaNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (pH_{cond} 1,1 ajustado com HNO₃ conc.) ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$): (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-6}$; (3) $5,0 \times 10^{-6}$; (4) $7,0 \times 10^{-6}$; (5) $9,0 \times 10^{-6}$; (6) $1,1 \times 10^{-5}$; (7) $2,1 \times 10^{-5}$; (8) $3,1 \times 10^{-5}$; (9) $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; (b) Curva analítica.

Um estudo comparativo empregando as técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para a quantificação do atenolol em formulações farmacêuticas foi realizado. Os resultados estão mostrados na TABELA 3.7. Verifica-se que a técnica de onda quadrada apresentou maior sensibilidade, menor limite de

detecção e de quantificação, sendo então selecionada para a determinação de atenolol em amostras comerciais.

TABELA 3.7. Parâmetros investigados na SWV em comparação à DPV para a determinação de atenolol utilizando um eletrodo de BDD

Voltametria de onda quadrada			Voltametria de pulso diferencial		
Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados	Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados
Frequência (Hz)	10–200	100	Tempo (ms)	5–20	7
Amplitude (mV)	10–100	40	Amplitude (mV)	25–150	75
Incremento (mV)	1–7	4	Velocidade (mV s ⁻¹)	5–20	10
Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 1,3 + 8,0 \times 10^5 \{[\text{atenolol}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $9,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $3,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $2,0 \times 10^{-6} - 4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$			Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,73 + 4,9 \times 10^5 \{[\text{atenolol}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $2,0 \times 10^{-6} - 4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada concentração de atenolol estão apresentados na FIGURA 3.37. A inserção nesta figura corresponde à curva analítica obtida.

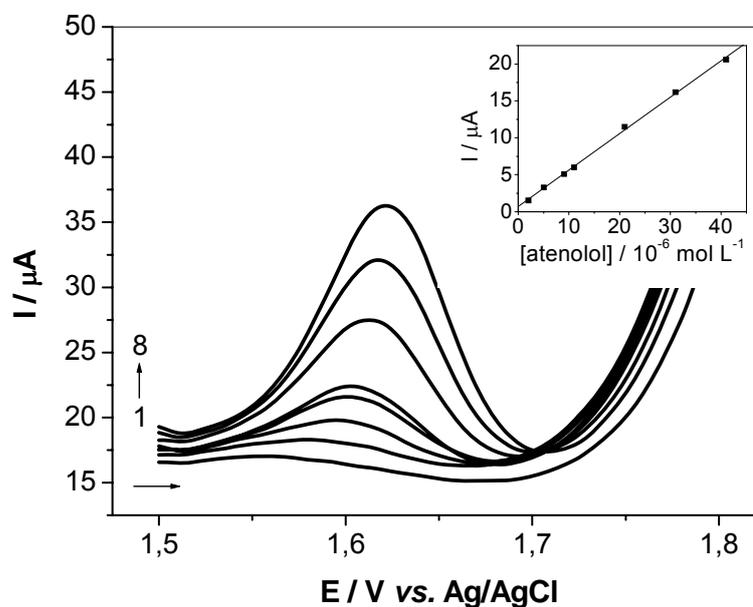


FIGURA 3.37. Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de atenolol em NaNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,1$ ajustado com HNO_3 conc.) ($t = 7 \text{ ms}$, $a = 75 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$): (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-6}$; (3) $5,0 \times 10^{-6}$; (4) $9,0 \times 10^{-6}$; (5) $1,1 \times 10^{-5}$; (6) $2,1 \times 10^{-5}$; (7) $3,1 \times 10^{-5}$; (8) $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A figura inserida corresponde a curva analítica ($r = 0,9993$).

3.3.2.3. Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade

O estudo da repetibilidade foi feito em decuplicata ($n = 10$) para a solução padrão de atenolol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo da reprodutibilidade foram feitas 5 medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de atenolol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ambos os estudos foram realizados por voltametria de onda quadrada.

O desvio padrão relativo obtido para o estudo da repetibilidade foi de 0,78 % e para a reprodutibilidade foi de 4,5 %.

3.3.2.4. Estudo de interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de atenolol em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais, como: amido, lactose, estearato de magnésio e carbonato de magnésio. Nesses experimentos, foi feita adição destes concomitantes à solução de atenolol $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de atenolol. Alguns destes excipientes são insolúveis e/ou possuem baixa solubilidade. A clortalidona e o nifedipino (associações com o atenolol) são insolúveis no eletrólito empregado, não interferindo assim nas determinações do analito.

Dentre as substâncias investigadas, somente o carbonato de magnésio e a lactose, em concentrações 1/10 analito:concomitante, apresentaram interferência negativa de 11,9 e 11,6 %, respectivamente. Entretanto, cabe ressaltar que o teor desse excipiente nos produtos farmacêuticos disponíveis no mercado são inferiores aos testados nesse estudo. O método pode ser aplicado para a quantificação do atenolol nas referidas amostras sem a interferência desses concomitantes, com boa exatidão.

3.3.2.5. Teste de adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação do atenolol nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado, fornecendo informações sobre a influência de possíveis interferentes existentes na matriz das amostras desse analito sobre o

procedimento proposto. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para as amostras de atenolol nas dosagens 25, 50 e 100 mg, cujos resultados estão apresentados na TABELA 3.8.

TABELA 3.8. Estudo de adição e recuperação de atenolol em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada

Amostras	atenolol (10^{-6} mol L $^{-1}$)		Recuperação ^a (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	1,98	1,93 ± 0,01	97,5
	2,92	2,72 ± 0,01	93,2
	3,85	3,87 ± 0,02	100
B	1,98	2,10 ± 0,01	106
	2,92	2,99 ± 0,02	102
	3,85	3,81 ± 0,04	99,0
C*	1,98	1,92 ± 0,01	97,0
	2,92	2,80 ± 0,03	95,9
	3,85	3,56 ± 0,01	92,5
D [#]	1,98	1,95 ± 0,02	98,5
	2,92	2,83 ± 0,01	96,9
	3,85	3,86 ± 0,03	100
E	1,98	2,00 ± 0,01	101
	2,92	2,86 ± 0,02	97,9
	3,85	3,78 ± 0,01	98,2
F	1,98	1,91 ± 0,02	96,5
	2,92	2,90 ± 0,01	99,3
	3,85	3,68 ± 0,01	95,6

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra;

*amostra continha 12,5 mg de clortalidona;

[#]amostra continha 10 mg de nifedipino.

As recuperações variaram entre 92,5 % a 106 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de atenolol pelo procedimento analítico proposto.

3.3.2.6. Aplicação analítica

O método proposto foi aplicado na determinação de atenolol em produtos farmacêuticos e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método espectrofotométrico descrito pela Farmacopéia Britânica⁵³. Os

resultados obtidos estão apresentados na TABELA 3.9. Observa-se que os resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência.

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado¹¹¹. O valor de t calculado (0,2700) é menor que o valor de t crítico (2,571), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 3.9. Determinação de atenolol em formulações farmacêuticas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método espectrofotométrico⁵³

Amostras	atenolol (mg/comprimido)			Erro relativo ^b (%)
	Rotulado	Referência ^a	Proposto ^a	
A	25	24,2 ± 0,9	23,6 ± 0,6	-2,5
B	25	25,1 ± 0,5	25,8 ± 0,8	2,8
C*	25	25,7 ± 0,8	26,3 ± 0,7	2,3
D [#]	25	25,8 ± 0,9	26,3 ± 0,5	1,9
E	50	49,4 ± 0,8	47,7 ± 0,5	-3,4
F	100	98,7 ± 0,9	99,9 ± 0,7	1,2

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra

^b100 × (proposto– referência)/referência;

*amostra continha 12,5 mg de clortalidona;

[#]amostra continha 10 mg de nifedipino.

3.4. Determinação de sildenafil

3.4.1. Voltametria cíclica

A oxidação do sildenafil ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi estudada inicialmente empregando-se a voltametria cíclica, com a finalidade de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução deste analito sobre a superfície do eletrodo de BDD vs. Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Pela FIGURA 3.38 pode-se observar que o sildenafil possui resposta eletroativa no eletrodo de BDD, com dois processos anódicos (E_{p1} e E_{p2}) e nenhum pico no sentido da varredura reversa, caracterizando-se um processo irreversível¹⁰⁹.

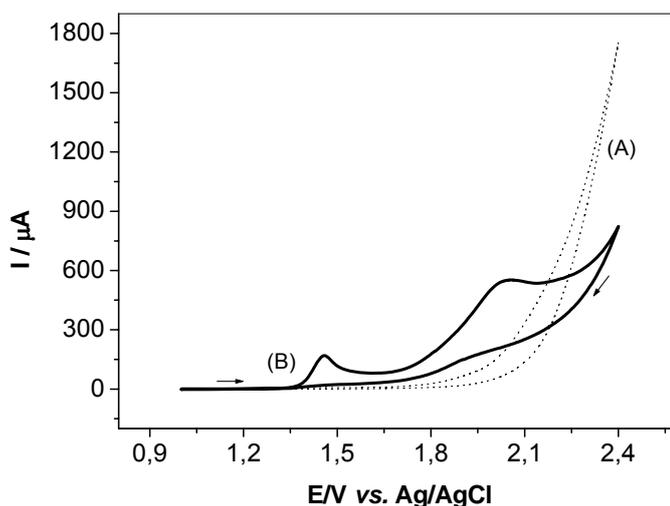


FIGURA 3.38. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) empregando o eletrodo de BDD: (A) na ausência e (B) na presença de sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

O mesmo comportamento foi observado por ÖZKAN et al.⁸⁷ utilizando um eletrodo de carbono vítreo. Estes autores sugerem que o primeiro processo anódico corresponde à oxidação da forma não protonada do anel piperazínico da molécula do sildenafil e o segundo processo anódico à oxidação do produto dessa oxidação, que é fortemente adsorvido na superfície deste eletrodo. No caso do eletrodo de BDD, provavelmente o segundo processo anódico pode ocorrer em decorrência de uma possível reação de hidroxilação do anel aromático presente no grupamento *p*-

alcoxibenzenossulfonamida da molécula de sildenafil, uma vez que esse segundo processo está em um potencial próximo a decomposição da água com formação de radicais hidroxila¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Para os demais estudos, será utilizado o primeiro pico de oxidação, Ep1, pois apresentou um perfil voltamétrico melhor definido e o menor potencial de pico deverá aumentar a seletividade do método proposto.

As respostas voltamétricas da oxidação do sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suportes, tais como: H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, tampão BR pH 2,0 e tampão acetato pH 3,5 são mostradas na FIGURA 3.39. O eletrólito suporte que apresentou um perfil voltamétrico melhor definido e maior magnitude de corrente foi o ácido sulfúrico, sendo esse eletrólito selecionado para os estudos posteriores.

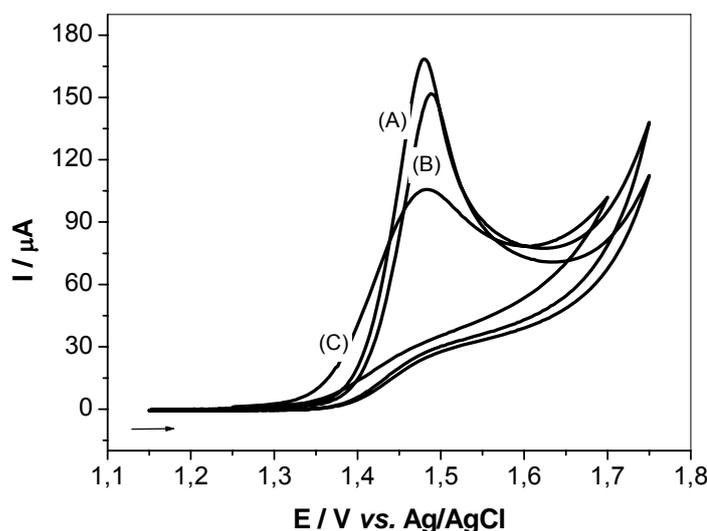


FIGURA 3.39. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) para a oxidação do sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte: (A) H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (B) tampão BR pH 2,0 e (C) tampão acetato pH 3,5.

Posteriormente, realizaram-se estudos variando-se a concentração do eletrólito suporte e como pode ser observado na FIGURA 3.40, há uma variação discreta da magnitude de corrente de pico com a concentração do ácido empregado, sendo a de maior magnitude aquela obtida em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ selecionada.

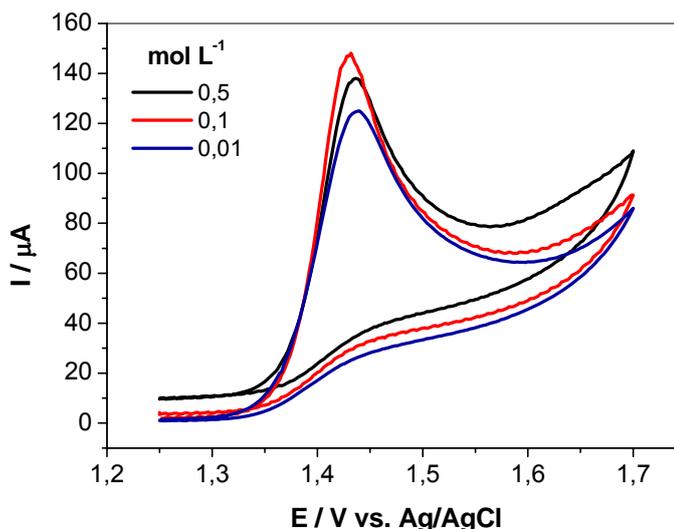


FIGURA 3.40. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) para a oxidação de sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de H_2SO_4 .

O estudo do pré-tratamento (anódico e catódico) do eletrodo de BDD foi realizado. Quando pré-tratado catodicamente (1 A cm^{-2} durante 240 s) foi possível obter um aumento significativo na magnitude de corrente de pico, além de uma melhor definição de pico ao se comparar com o pré-tratamento anódico.

Todas as medidas eletroquímicas do sildenafil sobre o eletrodo de BDD foram realizadas na presença de oxigênio, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no perfil voltamétrico da oxidação do sildenafil na presença e ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio a magnitude do sinal analítico foi ligeiramente superior àquela obtida sem a retirada de oxigênio das soluções.

O estudo da estabilidade da solução de sildenafil foi realizado empregando-se uma solução padrão de sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Realizaram-se oito medidas, com o intervalo de uma hora entre cada medida. O desvio padrão relativo obtido foi de 2,1 %, podendo-se considerar que não houve degradação do sildenafil nessas condições durante este período de trabalho.

A dependência da corrente de pico anódico (I_{p1}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais (intervalo de 5 a 150 mV s^{-1}) também foi investigada (FIGURA 3.41(a)). A existência de uma linearidade ($r = 0,9963$) entre as correntes de pico anódico (E_{p1}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o transporte de massa é predominantemente controlado por difusão de espécies para a oxidação do sildenafil na superfície do eletrodo de BDD¹⁰⁹. Entretanto,

observa-se nesse gráfico que o coeficiente linear obtido é diferente de zero ($lp1 = -6,2 + 4,1 v^{1/2}$), devido provavelmente a algum processo adsortivo. Outrossim, se há algum processo adsortivo envolvido, este não é tão intenso, uma vez que não houve a necessidade de algum tipo de limpeza da superfície do eletrodo entre uma medida e outra.

Adicionalmente, o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.41(b)) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,68, que está próximo do previsto pela literatura (0,50) para sistemas controlados pela difusão de espécies¹⁰⁹.

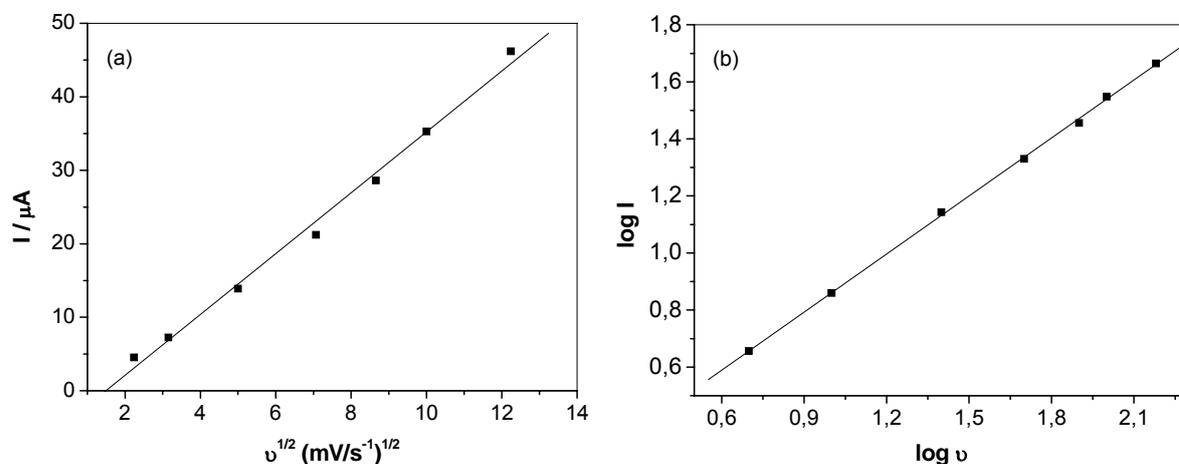


FIGURA 3.41. (a) Dependência da variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para o primeiro processo anódico e (b) dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o eletrodo de BDD na presença de sildenafil $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.2. Voltametria de pulso diferencial

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram um comportamento semelhante àqueles obtidos por voltametria cíclica, apresentando o pico de oxidação para o sildenafil em torno de $1,35 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}\text{)}$.

Para o desenvolvimento desse procedimento analítico realizou-se a otimização de parâmetros como a amplitude de pulso (a), a velocidade de varredura

(v) e o tempo de duração do pulso (t), pois são fatores que podem melhorar de forma significativa a resposta voltamétrica.

3.4.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

A FIGURA 3.42 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o sildenafil em função da variação da amplitude de pulso. Aumentando-se a amplitude do pulso aumenta-se a magnitude da corrente, e desloca-se o potencial de pico para valores menos positivo. Entretanto, um aumento da amplitude provoca um aumento na largura do pico, reduzindo desta maneira a resolução do método. Observa-se que para os valores de amplitudes até 100 mV ocorre um aumento praticamente linear da magnitude de corrente (figura inserida). Desta forma, a amplitude selecionada para o desenvolvimento dos experimentos foi de 100 mV.

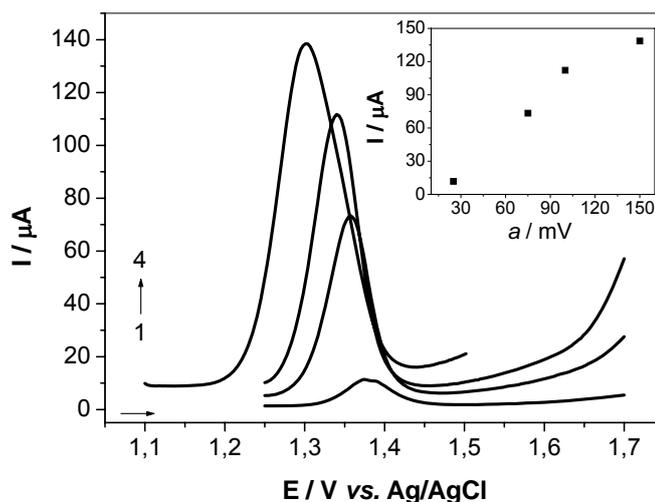


FIGURA 3.42. Variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas do sildenafil $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, $t = 5 \text{ ms}$): (1) 25, (2) 75, (3) 100, (4) 150 mV. A inserção nesta figura corresponde à dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de pulso de potencial para o sildenafil.

A FIGURA 3.43 mostra como varia a magnitude de corrente de pico com a velocidade de varredura de potencial no intervalo de 5 a 15 mV s^{-1} . Observa-se que, à medida que se aumenta a velocidade de varredura o potencial de pico permanece constante. Há um aumento na intensidade da corrente de pico até 10 mV s^{-1} ,

decrecendo para a velocidade de varredura de 15 mV s^{-1} (figura inserida). Assim, foi selecionada uma velocidade de varredura de potencial de 10 mV s^{-1} para dar continuidade aos estudos.

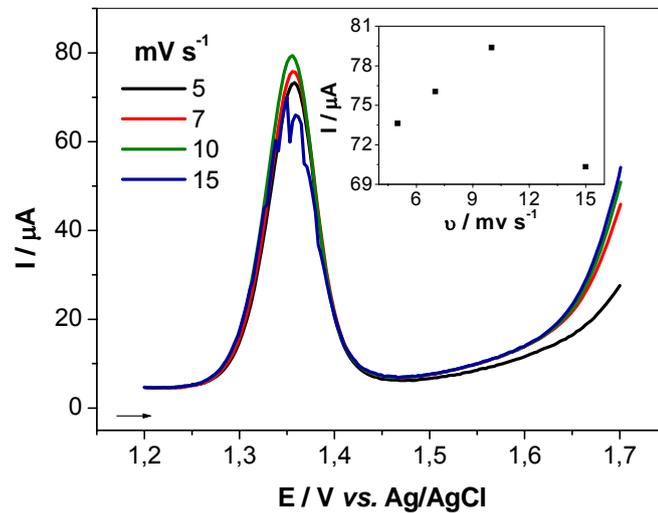


FIGURA 3.43. Variação da velocidade de varredura nos voltamogramas de pulso diferencial do sildenafil $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 100 \text{ mV}$, $t = 5 \text{ ms}$). A inserção nesta figura corresponde à variação da velocidade de varredura sobre a corrente de pico.

Outro parâmetro estudado foi o tempo de duração do pulso, variando de 5 a 20 ms (FIGURA 3.44). Com o aumento do tempo de duração do pulso, observa-se um deslocamento no potencial de pico para valores ligeiramente menos positivo e um decréscimo na magnitude de corrente de pico, como pode ser visualizado na figura inserida nesta figura. Desta forma, foi selecionado um tempo de duração de pulso de 5 ms.

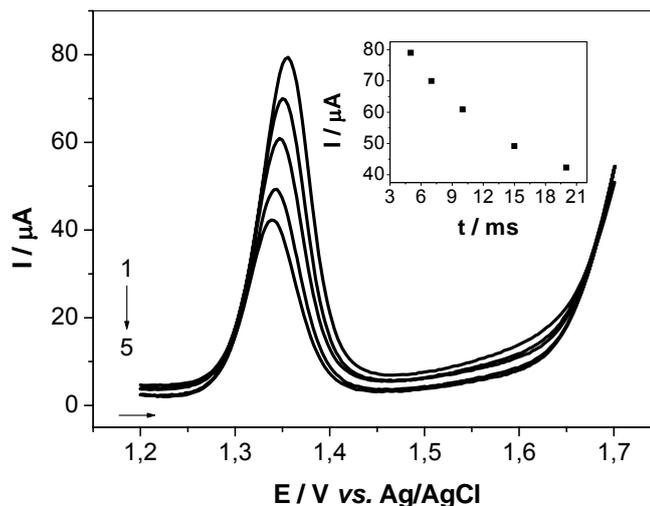


FIGURA 3.44. Variação do tempo de duração do pulso nos voltamogramas do sildenafil $1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ em H $_2$ SO $_4$ 0,1 mol L $^{-1}$ ($a = 100$ mV, $v = 10$ mV s $^{-1}$): (1) 5, (2) 7, (3) 10, (4) 15 e (5) 20 ms. A inserção nesta figura corresponde a influência da variação do tempo de duração do pulso sobre a corrente de pico.

3.4.3.2. Curva analítica

Após a otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a voltametria de pulso diferencial, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de 1,27 a 1,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L $^{-1}$) em diferentes concentrações de sildenafil, de $7,3 \times 10^{-7}$ a $7,3 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em H $_2$ SO $_4$ 0,1 mol L $^{-1}$, empregando-se o eletrodo de BDD.

A FIGURA 3.45(a) mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada concentração de sildenafil. Observa-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração e que praticamente não ocorre deslocamento no valor dos potenciais de pico.

A curva analítica é mostrada na FIGURA 3.45(b), e a equação de reta obtida foi: $I_p/\mu\text{A} = 0,14 + 6,3 \times 10^5 \{[\text{sildenafil}]/\text{mol L}^{-1}\}$, $r = 0,9981$.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o intervalo de concentração estudado foram de $4,8 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ e $1,6 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$, respectivamente.

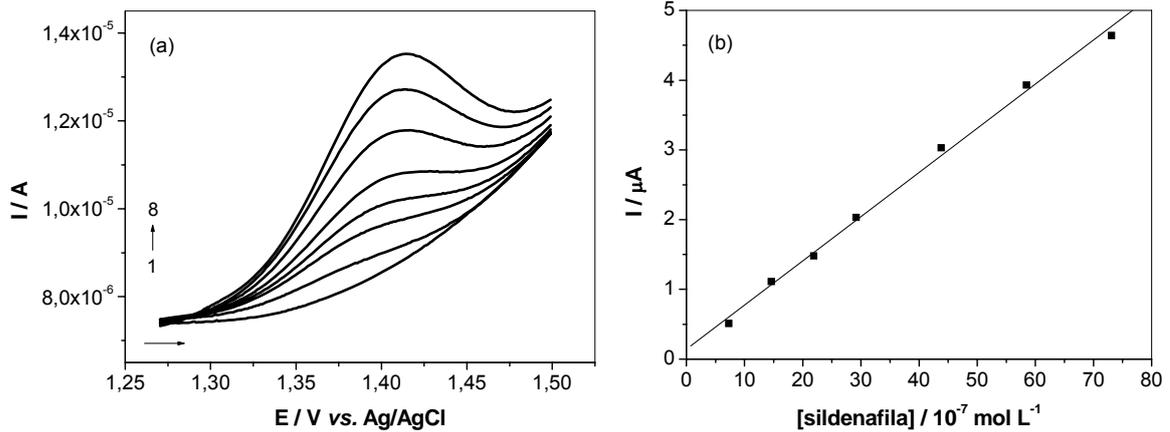


FIGURA 3.45. (a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de sildenafil em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 100 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $t = 5 \text{ ms}$): (1) 0; (2) $7,3 \times 10^{-7}$; (3) $1,5 \times 10^{-6}$; (4) $2,2 \times 10^{-6}$; (5) $2,9 \times 10^{-6}$; (6) $4,4 \times 10^{-6}$; (7) $5,9 \times 10^{-6}$; (8) $7,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica.

Um estudo comparativo empregando as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de onda quadrada para a quantificação do sildenafil em formulações farmacêuticas foi realizado. Os resultados estão mostrados na TABELA 3.10. Apesar da voltametria de onda quadrada apresentar melhor linearidade, menor limite de detecção e quantificação, a voltametria de pulso diferencial apresentou melhor sensibilidade, selecionando-a desta forma, para a determinação de sildenafil nas amostras de comerciais de Viagra®.

TABELA 3.10. Parâmetros investigados na DPV em comparação à SWV para a determinação de sildenafil utilizando um eletrodo de BDD

Voltametria de pulso diferencial			Voltametria de onda quadrada		
Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados	Parâmetros	Faixa estudada	Valores selecionados
Tempo (ms)	5–20	5	Frequência (Hz)	10–200	50
Amplitude (mV)	25–150	100	Amplitude (mV)	10–100	30
Velocidade (mV s^{-1})	5–20	10	Incremento (mV)	1–7	3
Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,14 + 6,3 \times 10^5 \{[\text{sildenafil}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $4,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $7,3 \times 10^{-7} - 7,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$			Equação da reta $I_p/\mu\text{A} = 0,53 + 3,6 \times 10^5 \{[\text{sildenafil}]/\text{mol L}^{-1}\}$ LD: $4,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LQ: $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Linearidade: $5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cada concentração de sildenafil são apresentados na FIGURA 3.46(a). A curva analítica é mostrada na FIGURA 3.46(b).

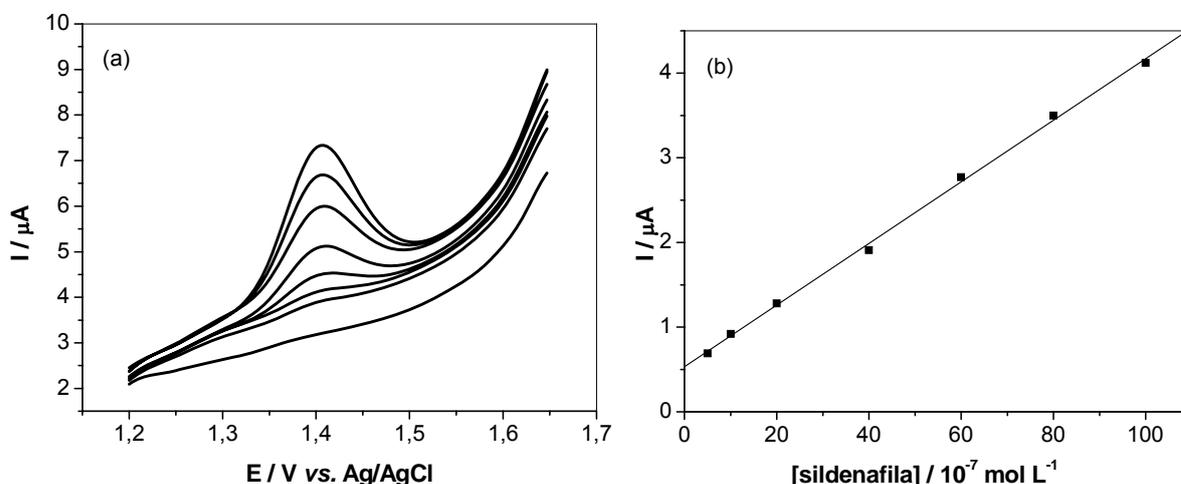


FIGURA 3.46. (a) Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de sildenafil em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9992$): (1) 0; (2) $5,0 \times 10^{-7}$; (3) $1,0 \times 10^{-6}$; (4) $2,0 \times 10^{-6}$; (5) $4,0 \times 10^{-6}$; (6) $6,0 \times 10^{-6}$; (7) $8,0 \times 10^{-6}$; (8) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica.

3.4.3.3. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

O estudo da repetibilidade foi feito em decuplicata ($n = 10$) para a solução padrão de sildenafil $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo da reprodutibilidade foram feitas 5 medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de sildenafil $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ambos os estudos foram realizados por voltametria de pulso diferencial.

O desvio padrão relativo obtido para o estudo de repetibilidade foi de 1,1 % e para a reprodutibilidade foi de 1,9 %.

3.4.3.4. Estudo de interferentes em potencial

O efeito de interferentes em potencial na determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas foi avaliado para os excipientes presentes em amostras comerciais de Viagra[®], como: fosfato de cálcio dibásico, estearato de magnésio, corante índigo carmin alumínio laca, lactose. Nesses experimentos, foi feita adição

destes concomitantes à solução de sildenafil $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de sildenafil. Alguns destes excipientes são insolúveis e/ou possuem baixa solubilidade.

Dentre as substâncias investigadas, somente a lactose, em concentrações 1/1 e 1/10 analito:concomitante, apresentou interferência positiva de 11,6 e 219 %, respectivamente. A lactose mostrou-se eletroativa no eletrodo de BDD no potencial de oxidação do sildenafil, promovendo um aumento pronunciado em sua resposta voltamétrica. A lactose está presente na camada azul que reveste o comprimido comercializado e a sua concentração é, em geral, muito menor que a concentração do princípio ativo (sildenafil), tornando possível a sua determinação com boa exatidão em amostras de Viagra[®] na presença de lactose.

3.4.3.5. Teste de adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação do sildenafil nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado, fornecendo informações sobre a influência de possíveis interferentes existentes na matriz das amostras desse analito sobre o procedimento proposto. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para as amostras de Viagra[®] nas dosagens 25, 50 e 100 mg, cujos resultados são mostrados na TABELA 3.11.

TABELA 3.11. Estudo de adição e recuperação de sildenafil em formulações de Viagra[®] empregando um eletrodo de BDD e voltametria de onda quadrada

Amostras	sildenafil ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)		Recuperação ^a (%)
	Adicionado	Encontrado	
Viagra [®] 25 mg	1,90	1,74 ± 0,01	91,5
	3,74	3,39 ± 0,02	91,7
	5,50	5,12 ± 0,01	93,1
Viagra [®] 50 mg	1,90	1,74 ± 0,03	91,5
	3,74	3,76 ± 0,01	101
	5,50	5,51 ± 0,02	100
Viagra [®] 100 mg	1,90	1,88 ± 0,01	99,2
	3,74	3,52 ± 0,01	95,1
	5,50	5,41 ± 0,02	98,3

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra.

As recuperações variaram entre 91,5 % a 101 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de sildenafil pelo procedimento analítico proposto.

3.3.2.6. Aplicação analítica

O método proposto foi aplicado na determinação de sildenafil em amostras comerciais de Viagra[®] e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método cromatográfico comparativo descrito por ABD-ELBARY et al.⁷⁷ (TABELA 3.12). Observa-se que os resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método comparativo.

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado¹¹¹. O valor de t calculado (0,9900) é menor que o valor de t crítico (4,303), indicando que o procedimento proposto possui boa exatidão, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos empregando-se os dois métodos, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 3.12. Determinação de sildenafil em formulações de Viagra[®] de diferentes dosagens empregando-se o procedimento voltamétrico proposto e o método comparativo⁷⁷

Amostras	sildenafil (mg/comprimido)		Erro relativo ^b (%)
	Comparativo ^a	Proposto ^a	
Viagra [®] 25 mg	25,7 ± 0,9	26,5 ± 0,9	3,1
Viagra [®] 50 mg	51,5 ± 0,5	51,6 ± 0,7	0,2
Viagra [®] 100 mg	105,0 ± 0,9	100,0 ± 0,8	-4,8

^amédia aritmética de 3 medidas/amostra;

^b100 × (proposto – referência)/referência.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, referentes ao tratamento dos dados experimentais e interpretações dos mesmos cabem aqui destacar as principais conclusões.

- Todos os analitos investigados, AAS, PROP, atenolol e sildenafil, oxidam-se na superfície do eletrodo de BDD em reações irreversíveis, cujo transporte de massa é controlado por difusão de espécies à superfície do eletrodo.

- Para o AAS não houve a necessidade do pré-tratamento da superfície do eletrodo. Enquanto para o PROP, atenolol e sildenafil fizeram-se necessário o pré-tratamento catódico.

- O AAS foi determinado diretamente, sem a necessidade da etapa de hidrólise alcalina, utilizando a voltametria de onda quadrada. A vantagem de se determinar o AAS diretamente em potencial em torno de 1,95 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) empregando-se o eletrodo de BDD está no intervalo amplo de potencial eletroquímico de trabalho que este eletrodo apresenta (-1,5 V a +2,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), que não é obtido ao utilizar o eletrodo de grafite de lápis⁴⁴, cuja determinação necessitou da etapa de hidrólise alcalina.

- O PROP e atenolol foram quantificados em diferentes amostras comerciais utilizando a voltametria de onda quadrada. Para o PROP, o limite de detecção obtido utilizando-se o eletrodo de BDD foi maior que aquele obtido empregando-se o eletrodo de gota pendente de mercúrio⁶⁶. Entretanto, ao utilizar este eletrodo a determinação do PROP foi feita indiretamente, após a nitração do propranolol pelo ácido nítrico. Além do mais, é interessante evitar o uso de mercúrio devido a sua toxicidade. Quando se utilizou o eletrodo de pasta de carbono em conjunto com a voltametria de pulso diferencial adsortiva por redissolução anódica⁶⁷, foi necessário um tempo para a acumulação do analito e a renovação da superfície de trabalho. Ademais, foi obtido limite de detecção maior que aquele obtido neste trabalho. Para o atenolol, os procedimentos propostos na literatura empregam eletrodos modificados e compósito. O limite de detecção utilizando o eletrodo de BDD foi menor que aquele obtido empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado com fulereno e, maior que aqueles obtidos empregando-se os eletrodos de óxido de índio modificado com nanopartículas de ouro e eletrodo de grafite/resina de poliuretano. Por outro lado,

quando se utiliza o eletrodo de BDD não há necessidade de renovação da superfície, uma vez que neste tipo de eletrodo há adsorção fraca de espécies (reagentes ou produtos de oxidação/redução), o que melhora a sua resistência à desativação ou envenenamento de sua superfície.

- O sildenafil foi quantificado em amostras de Viagra[®] por voltametria de pulso diferencial. Utilizando-se o eletrodo de BDD foi possível obter menor limite de detecção que aquele obtido por ÖZKAN et al.⁸⁷ usando um eletrodo de carbono vítreo. Entretanto, esse eletrodo era polido após cada determinação do analito. O LD encontrado para o sildenafil neste trabalho de tese foi maior que aquele obtido por BERZAS et al.⁸⁶ ao utilizar um eletrodo de mercúrio de gota pendente e voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada. No entanto, ambos os procedimentos relatados na literatura^{86,87} empregaram solventes orgânicos para a determinação do analito, o que não foi necessário utilizando-se o eletrodo de BDD.

CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo métodos eletroanalíticos para a determinação de analitos de interesse alimentício, ambiental, biológico, farmacêutico e industrial empregando-se o eletrodo de diamante dopado com boro. Uma proposta de investigação é a adaptação destes métodos analíticos em fluxo, sendo que alguns destes trabalhos estão sendo implementados. Outras possibilidades que estão sendo investigadas tem relação com adaptação destes eletrodos como detectores amperométricos em cromatografia líquida de alta eficiência.

Outra proposta de trabalho é a modificação da superfície do eletrodo de BDD com polímeros, enzimas e nanopartículas metálicas.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. KOROLKOVAS, A. *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988.
2. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.
3. WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. New York, VCH Publishers, 1994.
4. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A. *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. New York, Oxford University Press Inc, 1993.
5. BOND, A.M., *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. New York and Basel, Marcel Dekker, 1980.
6. PLESKOV, Y.V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, **55**: 1045, 2000.
7. SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P. & CHAILAPAKUL, O. "Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system". *Sensors and Actuators B*, **91**: 60, 2003.
8. FUJISHIMA, A.; RAO, N.T.; POPA, E.; SARADA, B.V.; YAGI, I. & TRYK, D.A. "Electroanalysis of dopamina and NADH at conductive diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **473**: 179, 1999.
9. POPA, E.; KUBOTA, Y.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Selective voltammetric and amperometric detection of uric acid with oxidized diamond film electrodes". *Anal. Chem.*, **72**: 1724, 2000.
10. SARADA, B.V.; RAO, N.T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron doped-diamond electrodes". *Anal. Chem.*, **72**: 1632, 2000.
11. WANGFUENKANAGUL, N.; SIANGPROH, W. & CHAILAPAKUL, O. "A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode". *Talanta*, **64**: 1183, 2004.
12. SOUZA, C.D.; BRAGA, O.C.; VIEIRA, I.C. & SPINELLI, A. "Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode". *Sensors and Actuators B*, **135**: 66, 2008.
13. CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations". *Diamond and Related Materials*, **11**: 1670, 2002.
14. PEDROSA, V.A. & AVACA, L.A. "Determinação voltamétrica do 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada". *Quim. Nova*, **26**: 844, 2003.

15. PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analysis? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters". *J. Electroanal. Chem.*, **573**: 11, 2004.
16. OLIVEIRA, R.T.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; FERREIRA, V.S.; OLIVEIRA, S.C. & AVACA, L.A. "Electroanalytical Determination of Lidocaine in Pharmaceutical Preparations Using Boron-Doped Diamond Electrodes". *Electroanalysis*, **19**: 1189, 2007.
17. FELIX, F.S.; BARROS, R.C.M.; LICHTIG, J.; MASINI, J.C. & FERREIRA, N.G. "Determinação de manganês em material particulado atmosférico de ambientes de trabalho utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e voltametria de onda quadrada com redissolução catódica". *Quim. Nova*, **28**: 1000, 2005.
18. ALTUNA, Y.; DOGAN-TOPAL, B.; USLU, B. & OZKAN, S.A. "Anodic behavior of sertindole and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum using glassy carbon and boron-doped diamond electrodes". *Electrochim. Acta*, **54**: 1893, 2009.
19. YU, H.; MA, C.; QUAN, X.; CHEN, S. & ZHAO, H. "Flow injection analysis of chemical oxygen demand (COD) by using a boron-doped diamond (BDD) electrode". *Environ. Sci. Technol.*, **43**: 1935, 2009.
20. DEJMKOVA, H.; SCAMPICHO, M.; ZIMA, J.; BAREK, J. & MANNINO, S. "Determination of total phenols in foods by boron doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **21**: 1014, 2009.
21. MEDEIROS, R.A.; CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond". *Talanta*, **76**: 685, 2008.
22. LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; MAZO, L.H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **78**: 748, 2009.
23. ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R.C.; CASS, Q.B. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **12**: 1475-1480, 2009.
24. SUFFREDINI, H.B.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "The water decomposition reaction on boron-doped diamond electrodes". *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**: 16, 2004.
25. CARVALHO, R.B. "Munição contra dor, febre e inflamação". *Ciência Hoje*, **26**(153): 76, 1999.

26. ELWOOD, P.C. "Aspirin: past, present and future." *Clin. Med.*, **1**(2): 132, 2001.
27. HAMMERSCHMIDT, D.E. "The first commercial bottle of aspirin: march 6, 1899." *J. Lab. Clin. Med.*, **132**: 556, 1998.
28. THIESSEN, J.J. "Pharmacokinetics of Salicylates". IN: *Acetylsalicylic Acid: New Uses for an Old Drug*. BARNETT, H.J.M.; HIRSH, J. & MUSTARD, J.F. (Eds), New York, Raven Press, 1992.
29. SNEADER, W. "The discovery of aspirin: a reappraisal". *British Med. J.*, **321**: 1591, 2000.
30. *British Pharmacopoeia*. London, HMSO, 1980. p. 733.
31. TRINDER, P. "Rapid determination of salicylate in biological fluids". *Biochem. J.* **57**: 301, 1954.
32. PEREIRA, A.V.; ANICETO, C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid in tablets after on-line microwave-assisted alkaline hydrolysis". *Analyst*, **123**: 1011, 1998.
33. MATIAS, F.A.A.; VILA, M.D.C.V. & TUBINO, M. "Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations". *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**: 327, 2004.
34. VERMA, K.K. & JAIN, A. "Spectrophotometric determination of Aspirin by transacetylation of 4-aminophenol". *Anal. Chem.*, **58**: 821, 1986.
35. KEES, F.; JEHNICH, D. & GROBECKER, H. "Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. B*, **677**: 172, 1996.
36. MILES, C.I. & SCHENK, G.H. "Fluorescence of acetylsalicylic acid in solution and its measurement in presence of salicylic acid". *Anal. Chem.*, **42**: 656, 1970.
37. GANDHIMATHI, M.; RAVI, T.K.; ABRAHAM, A. & THOMAS, R. "Simultaneous determination of aspirin and isosorbide 5-mononitrate in formulation by reversed phase high pressure liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**: 1145, 2003.
38. FERREIRA, V.J.F.; CAVALHEIRO, A.C.V.; FAGNANI, E.; MORAES, M.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. & MELIOS, C.B. "An electrode of the second kind for aspirin determination in tablet formulations". *Anal. Sci.*, **15**: 249, 1999.
39. ROVER JR., L.; GARCIA, C.A.B.; NETO, G.O.; KUBOTA, L.T. & GALEMBECK, F. "Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane". *Anal. Chim. Acta*, **366**: 103, 1998.

40. KUBOTA, L.T.; FERNANDES, J.C.B.; ROVER JR., L. & NETO, G.O. "Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis". *Talanta*, **50**: 661, 1999.
41. FERNANDES, J.C.B.; GARCIA, C.A.B.; GRANDIN, L.A.; NETO, G.O. & GODINHO, O.E.S. "Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system". *J. Braz. Chem. Soc.*, **9**: 249, 1998.
42. QUINTINO, M.S.M.; CORBO, D.; BERTOTTI, M. & ANGNES, L. "Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions". *Talanta*, **58**: 943, 2002.
43. MAJDI, S.; JABBARI, A. & HELI, H. "A study of the electrocatalytic oxidation of aspirin on a nickel hydroxide-modified nickel electrode". *J. Solid State Electrochem.*, **11**: 601, 2007.
44. SUPALKOVA, V.; PETREK, J.; HAVEL, L.; KRIZKOVA, S.; PETRLOVA, J.; ADAM, V.; POTESIL, D.; BABULA, P.; BEKLOVA, M.; HORNA, A. & KIZEK, R. "Electrochemical sensors for detection of acetylsalicylic acid". *Sensors*, **6**: 1483, 2006.
45. BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S. & PARKER, K.L. *Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11^a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006.
46. PATHAK, V.N.; SHUKLA, M.S.R. & SHUKLAHUKLA, I.C. "Direct titrimetric determination of the antihypertensive drugs methyldopa and propranolol in pharmaceutical preparations". *Analyst*, **107**: 1086, 1982.
47. ISSA, Y.M. & AMIN, A.S. "Conductometric titration of pindolol and propranolol using ammonium reineckate and potassium tetracyanonickelate". *Mikrochim. Acta*, **118**: 85, 1995.
48. GÖLCÜ, A. "New, simple, and validated UV-spectrophotometric method for the estimation of some beta blockers in bulk and formulations". *J. Anal. Chem.* **63**: 538, 2008.
49. EL-RIES, M.A.; ABOU ATTIA, F.M. & IBRAHIM, S.A. "AAS and spectrophotometric determination of propranolol HCl and metoprolol tartrate". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**: 179, 2000.
50. SULTAN, N.M. "Kinetic Determination of Propranolol in Drug Formulations". *Analyst*, **113**: 149, 1988.
51. *Farmacopéia Brasileira*. 4^a ed. Parte II. São Paulo, Atheneu, 2002. p. 143.
52. PASSOS, M.L.C.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; LIMA, J.L.F.C. & KORN, M.G.A. "Determination of metoprolol, acebutolol and propranolol in pharmaceutical formulations using the same SIA system". *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**: 563, 2008.
53. *British Pharmacopoeia*. London: HMSO. 1998.

54. RAMESH, K.C.; GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. & KESHAVAYYA, J. "Indirect spectrofluorimetric determination of piroxicam and propranolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations". *J. Anal. Chem.*, **58**: 933, 2003.
55. TABRIZI, A.B. "A simple spectrofluorimetric method for determination of piroxicam and propranolol in pharmaceutical preparations". *J. Food Drug Anal.*, **15**: 242, 2007.
56. RUIZ, T.P.; MARTINEZ-LOZANO, C.; TOMAS, V. & CARPENA, J. "Simultaneous determination of propranolol and pindolol by synchronous spectrofluorimetry". *Talanta*, **45**: 969, 1998.
57. TSOGAS, G.Z.; STERGIU, D.V.; VLESSIDIS, A.G. & EVMIRIDIS, N.P. "Development of a sensitive flow injection-chemiluminescence detection method for the indirect determination of propranolol". *Anal. Chim. Acta.*, **541**: 151, 2005.
58. TOWNSHEND, A.; PULGARÍN, J.A.M. & PARDO, M.T.A. "Flow injection-chemiluminescence determination of propranolol in pharmaceutical preparations". *Anal. Chim. Acta.*, **488**: 81, 2003.
59. MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M. & LIMA, J.L.F.C. "Chemiluminometric determination of propranolol in an automated multicommutated flow system". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**: 886, 2005.
60. GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. & MELWANKI, M.B. "Indirect spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations". *Anal. Sci.*, **18**: 671, 2002.
61. SASTRY, C.S.P.; SRINIVAS, K.R. & PRASAD, K.M.M.K. "Spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical formulations with N-bromosuccinimide and celestine blue". *Mikrochim. Acta*, **122**: 77, 1996.
62. MARTÍNEZ, I.R.; COQUE, M.C.G.A. & CAMAÑAS, R.M.V. "Liquid chromatographic procedure for the evaluation of β -blockers in pharmaceuticals using hybrid micellar mobile phases". *J. Chromatogr. A*, **765**: 221, 1997.
63. EL-SAHARTY, Y.S. "Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCl and its application in a pharmacokinetic study". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**: 699, 2003.
64. GOTARDO, M.A.; TOGNOLLI, J.O.; PEZZA, H.R. & PEZZA, L. "Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy". *Spectrosc. Acta Part A*, **69**: 1103, 2008.
65. HASSAN, S.S.M.; ABOU-SEKKINA, M.M.; EL-RIES, M.A. & WASSEL, A.A. "Polymeric matrix membrane sensors for sensitive potentiometric

- determination of some b-blockers in pharmaceutical preparations". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**: 175, 2003.
66. EL-RIES, M.A.; ABOU-SEKKINA, M.M. & WASSEL, A.A. "Polarographic determination of propranolol in pharmaceutical formulation". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**: 837, 2002.
67. RADI, A.; WASSEL, A.A. & EL-RIES, M.A. "Adsorptive behaviour and voltammetric analysis of propranolol at carbon paste electrode". *Chem. Anal.*, **49**: 51, 2004.
68. AMIN, A.S.; RAGAB, G.H. & SALEH, H. "Colorimetric determination of b-blockers in pharmaceutical formulaions". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**: 1347, 2002.
69. ELSHANAWANE, A.A.; MOSTAFA, S.M. & ELGAWISH, M.S. "Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide, and chlorthalidone in their combined mixture". *J. AOAC Inter.*, **92**: 404, 2009.
70. AL-GHANNAM, S.M. "A simple spectrophotometric method for the determination of b-blockers in dosage forms". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**: 151, 2006.
71. ARVAND, M.; VEJDANI, M. & MOGHIMI, M. "Construction performance characterization of an ion selective electrode for potentiometric determination of atenolol in pharmaceutical preparations". *Desalination*, **225**: 176, 2008.
72. GOYAL, R.N.; GUPTA, V.K.; OYAMA, M. & BACHHETI, N. "Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine usig nanogold modified indium tin oxide electrode". *Electrochem. Commun.*, **8**: 65, 2006.
73. GOYAL, R.N. & SINGH, S.P. "Voltammetric determination of atenolol at C₆₀-modified glassy carbon electrodes". *Talanta*, **69**: 932, 2006.
74. GRIESE, S.; KAMPOURIS, D.K.; KADARA, R.O. & BANKS, C.E. "Misinterpretations of the electro-catalysis observed at C₆₀ modified glassy carbon electrodes for the determination of atenolol". *Electrochem. Commun.*, **10**: 1633, 2008.
75. CERVINI, P.; RAMOS, L.A. & CAVALHEIRO, E.T.G. "Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode". *Talanta*, **72**: 206, 2007.
76. CERVINI, P. & CAVALHEIRO, E.T.G. "Graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector in the determination of atenolol". *Anal. Lett.*, **41**: 1867, 2008.
77. ABD-ELBARY, A.; FODA, N.H. & EL-GAZAYERLY, O.N. "Stability indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of sildenafil citrate in bulk and in formulations". *Chromatographia*, **59**: 59, 2004.

78. DARAGHMEH, N.; AL-OMARI, M.; BADWAN, A.A. & JABER, A.M.Y. "Determinaton of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**: 483, 2001.
79. VREDENBREGT, M.J.; BLOK-TIP, L.; HOOGERBRUGGE, R.; BARENDS, D.M. & KASTE, D. "Screening suspected counterfeit Viagra[®] and imitations of Viagra[®] with near-infrared spectroscopy". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**: 840, 2006.
80. VEIJ, M.; DENECKERE, A.; VANDENABEELE, P.; KASTE, D. & MOENSA, L. "Detection of counterfeit Viagra[®] with Raman spectroscopy". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 303, 2008.
81. FLORES, J.R.; NEVADO, J.J.B.; PEÑALVO, G.C. & DIEZ, N.M. "Development of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of three drugs employed in the erectile dysfunction therapy". *J. Chromatogr. B*, **811**: 231, 2004.
82. AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E. & EL-DOSOKY, R.M.S. "Colorimetric determination of sildenafil citrate (Viagra) through ion-associate complex formation". *J. AOAC Inter.*, **92**: 125, 2009.
83. ALTIOKKA, G.; ATKOSAR, Z.; SENNER, E. & TUNÇEL, M. "FIA of sildenafil citrate using UV-detection". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**: 339, 2001.
84. HASSAN, S.S.M.; ELNEMMA, E.M.; MAHMOUD, W.H. & MOHAMMED, A.H.K. "Continuous potentiometric monitoring of viagra (sildenafil) in pharmaceutical preparations using novel membrane sensors". *J. Appl. Electrochem.*, **36**: 139, 2006.
85. OTHMAN, A.M.; RIZK, N.M.H. & EL-SHAHAWI, M.S. "Polymer membrane sensors for sildenafil citrate (Viagra) determination in pharmaceutical preparations". *Anal. Chim. Acta*, **515**: 303, 2004.
86. BERZAS, J.J.; RODRIGUEZ, J.; CASTAÑEDA, G. & VILLASEÑOR, M.J. "Voltammetric behavior of sildenafil citrate (Viagra) using square wave and adsorptive stripping square wave techniques. Determination in pharmaceutical products". *Anal. Chim. Acta*, **417**: 143, 2000.
87. ÖZKAN, S.A.; USLU, B. & ZUMAN, P. "Electrochemical oxidation of sildenafil citate (Viagra) on carbon electrodes". *Anal. Chim. Acta*, **501**: 227, 2004.
88. BARROS, R.C.M.; RIBEIRO, M.C.; AN-SUMODJO, P.T.; JULIÃO, M.S.S.; SERRANO, S.H.P. & FERREIRA, N.G. "Filmes de diamante dopado com boro. Part I. Histórico, produção e caracterização". *Quim. Nova*, **28**: 317, 2005.
89. ZHANG, R.J.; LEE, S.T. & LAM, Y.M. "Characterization of heavily boron-doped diamond films". *Diamond and Related Materials*, **5**: 1288, 1996.

90. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G.; CORAT, E.J.; TRAVA-AIROLDO, V.J. & IHA, K. "Electrochemical characterization on semiconductors p-type CVD diamond electrodes". *Braz. J. Phys.*, **29**: 760, 1999.
91. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G. & CORAT, E.J. "Electrochemical activity of boron-doped diamond electrodes grown on carbon fiber cloths". *Diamond and Related Materials*, **11**: 657, 2002.
92. PLESKOV, Y.V. "Electrochemistry of diamond. A review". *Russian J. Electrochem.*, **38**: 1275, 2002.
93. COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. & MARKEN, F. "Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes". *Electroanalysis*, **15**: 1349, 2003.
94. RAO, N.T. & FUJISHIMA, A. "Recent advances in electrochemistry of diamond". *Diamond and Related Materials*, **9**: 384, 2000.
95. KRAFT, A. "Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material". *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2**: 355, 2007.
96. SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment". *Electrochim. Acta*, **49**: 4021, 2004.
97. DAYTON, M.A.; EWING, A.G. & WIGHTMAN, R.M. "Response of microvoltammetric electrodes to homogeneous catalytic and slow heterogeneous charge-transfer reactions". *Anal. Chem.*, **52**: 2392, 1980.
98. GRANGER, M.C. & SWAIN, G.M. "The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes". *J. Electrochem. Soc.*, **146**: 4551, 1999.
99. MEDEIROS, R.A.; CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro". *Quim. Nova*, **31**: 1405, 2008.
100. MEDEIROS, R.A.; CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetry determination of aspartame in dietary products using a boron-doped diamond electrode". *Anal. Lett.* **40**: 3195, 2007.
101. MAHE, E.; DEVILLIERS, D. & COMMINELLIS, C. "Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron-doped diamond thin films electrodes". *Electrochim. Acta*, **50**: 2263, 2005.
102. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, **51**: 4612, 2006.

103. GANDINI, D.; MICHAUD, P.; DUO, I.; MACHA, E.; HAENI, W.; PERRET, A. & CONMINELLIS, C. "Electrochemical behavior of synthetic boron-doped diamond thin film anodes". *New Diamond Front. Carbon. Technol.*, **9**: 303, 1999.
104. CONNORS, K.A.; AMINDON, G.L. & KENNON, L., *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. Wiley, New York, 1979. p. 151.
105. LOUHICHI, B.; BENSALASH, N. & GADRI, A. "Electrochemical oxidation of benzoic acid derivatives on boron doped diamond: voltammetric study and galvanostatic electrolyses". *Chem. Eng. Technol.*, **29**: 944, 2006.
106. ZHU, X.; SHI, S.; WEI, J.; LV, F.; ZHAO, H.; KONG, J.; HE, Q. & NI, J. "Electrochemical oxidation characteristics of p-substituted phenols using a boron-doped diamond electrodes". *Environ. Sci. Technol.* **41**: 6541, 2007.
107. OLIVEIRA, R.T.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; SANTOS, M.C.; CALEGARO, M.L.; MIWA, D.W.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Electrochemical oxidation of benzene on boron-doped diamond eletrodes". *Chemosphere.* **66**: 2152, 2007.
108. ENACHE, T.A.; CHIORCEA-PAQUIM, A.M.; FATIBELLO-FILHO, O. & OLIVEIRA-BRETT, A.M. "Hydroxyl radicals electrochemically generated *in situ* on a boron-doped diamond electrode". *Electrochem. Commun.*, **11**: 1342-1345, 2009.
109. GOSSER, D.K. *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. New York, VCH Publishers, 1994.
110. MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S. & LOVRIC, M. *Square-wave Voltammetry: Theory and Application*. Berlin, Springer, 2007.
- 111 CHRISTIAN, G.D. *Analytical Chemistry*. 5th ed. New York, John Wiley & Sons, 1994.