

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

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE FIBRATOS EM  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ELETRODOS DE  
CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE  
CARBONO**

Jorge Armando Ardila Quintero\*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador:** Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

\* bolsista CNPq

**São Carlos - SP**  
**2012**

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

A676dv

Ardila Quintero, Jorge Armando.

Determinação voltamétrica de fibratos em formulações farmacêuticas utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono / Jorge Armando Ardila Quintero. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

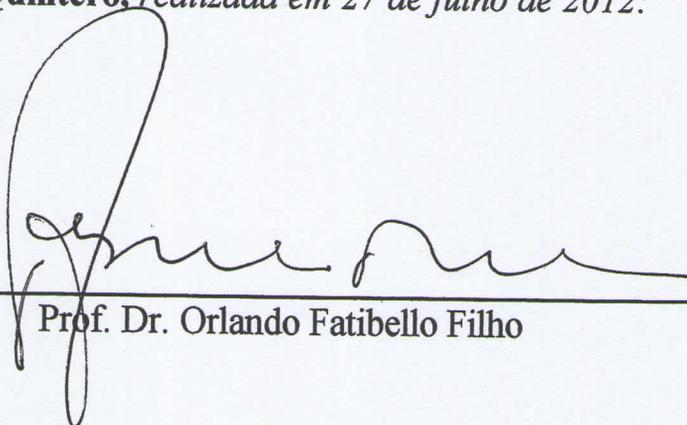
1. Química analítica. 2. Eletrodos modificados. 3. Carbono vítreo. 4. Nanotubos de carbono. 5. Voltametria de onda quadrada. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

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

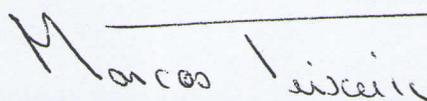
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato **Jorge Armando Ardila Quintero**, realizada em 27 de julho de 2012:*



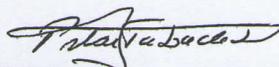
---

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



---

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira



---

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

*“Não, o sucesso não se deseja a ninguém. Acontece a alguém o mesmo que aos alpinistas, que se matam para chegar ao cume e quando chegam, que fazem? Descer, ou tratar de descer discretamente, com a maior dignidade possível”*

*Gabriel García Marquez*

*“A pátria é algo que se sente, que não se pode definir. Eu a sinto muito profundamente. Se a definimos, estamos diluindo-a em palavras”*

*Jorge Luis Borge*

*“Morre lentamente quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece”*

*Pablo Neruda*

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Jaime e Marina pelo  
amor incondicional.*

*Aos meus irmãos Ruben Dario e Jaime Alberto pelo  
carinho e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, pois sem ele nada existiria.

Aos meus pais Jaime e Marina pelo amor, apoio, e pelas lições de vida.

Aos meus irmãos Ruben Dario e Jaime Alberto, pelo carinho e amizade incondicional.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho, pela orientação científica e lições de profissionalismo, por todos os ensinamentos que recebi durante esses dois anos de LABBES. Gostaria de agradecer a paciência e compressão na aprendizagem do português.

À minha amiga Jenny, por todo carinho, amizade e ajuda recebida durante esta bonita e proveitosa experiência vivida nesta terra estrangeira.

Ao Geiser, pelo apoio, pelas longas e proveitosas discussões científicas, por todos os ensinamentos, discussões no desenvolvimento deste trabalho, além da ótima amizade e conselhos.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e ao Prof. Dr. Renato Lajarim Corneiro pela ajuda à minha formação profissional, importantes lições de vida, postura profissional e discussões muito proveitosas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas, pelo apoio prestado durante meu ingresso no programa de Pós-Graduação em Química.

À Profa. Dra. Elen Romão Sartori, pela grande amizade, conselhos, ajuda e pelas discussões no desenvolvimento do meu trabalho de mestrado.

À Dra. Roberta Antigo, pelas ajudas e discussões no desenvolvimento do meu trabalho de mestrado.

À Leidy e Asdrubal pela amizade e ajuda prestada no início desta experiência.

Aos meus grandes amigos da Colômbia, Jennifer, Yuri e Cesar pela amizade incondicional e por fazerem minha vida mais alegre e divertida, diminuindo a saudade de casa.

À minha querida amiga Didy, pelo apoio e amizade que atravessa fronteiras.

Aos meus amigos de república Saidy e Hernan, pela compressão e ajuda incondicional, pessoas que sempre estiveram de braços abertos para conversar, desabafar e rir de tudo.

Ao meu grande amigo Osmundo, por todo o apoio, amizade e risadas dadas durante estes dois anos.

Ao pessoal do LABBES: Roberta, Bruna, Luzia, Lilo, Livinha, Marina, Amanda, Débora, Patrícia, Osmundo, Geiser, Cyber, Avaré, Bruno, Elson, Vagner e Tiago, pela convivência e animação nas horas de trabalho, além dos conselhos e discussões científicas que me ajudaram no aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial às secretárias da Pós-Graduação, Luciani, Ariane e Cristina, pela atenção e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

A todos os brasileiros que pagam impostos no Brasil.

Obrigado!!!

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CNTs</b>	Nanotubos de carbono
<b>CV</b>	Voltametria cíclica
<b>BZF</b>	Bezafibrato
<b>BDD</b>	Eletrodo de diamante dopado com boro
<b>DPV</b>	Voltametria de pulso diferencial
<b>GEN</b>	Genfibrozila
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MWCNTs</b>	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>SWCNTs</b>	Nanotubos de carbono de parede simples
<b>SWV</b>	Voltametria de onda quadrada

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b>	Parâmetros instrumentais otimizados da voltametria de redissolução anódica de onda quadrada.....	30
<b>Tabela 4.2</b>	Parâmetros instrumentais otimizados da voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.....	31
<b>Tabela 4.3</b>	Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de GEN usando as técnicas de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e pulso diferencial .....	32
<b>Tabela 4.4.</b>	Desvio padrão relativo da repetibilidade intra e inter-dias para soluções de GEN $2,5 \times 10^{-7}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,0) .....	33
<b>Tabela 4.5</b>	Porcentagens de recuperação para soluções de GEN $1,38 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> e $3,38 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> .....	34
<b>Tabela 4.6</b>	RSD (%) da medida de GEN $5,0 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> na presença de concomitantes nas proporções 1:1 e 1:10 (analito:concomitante).....	35
<b>Tabela 4.7</b>	Teores de GEN obtidos em amostras farmacêuticas comerciais utilizando os métodos voltamétrico proposto e o HPLC .....	37
<b>Tabela 4.8</b>	Parâmetros instrumentais otimizados para voltametria de redissolução anódica de onda quadrada.....	46
<b>Tabela 4.9</b>	Parâmetros instrumentais otimizados na voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.....	46
<b>Tabela 4. 10</b>	Parâmetros analíticos calculados para voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e para voltametria pulso diferencial, empregadas na determinação do BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE .	47
<b>Tabela 4. 11</b>	. Desvio padrão relativo para o estudo da repetibilidade intra e inter-dias para soluções de BFZ $1,0 \times 10^{-7}$ e $5,0 \times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,0) .....	49
<b>Tabela 4. 12</b>	Resultados da determinação de BZF em amostras comerciais aplicando-se o método voltamétrico proposto usando o MWCNTs-DHP/GCE e o método comparativo espectrofotométrico .....	50
<b>Tabela 4. 13</b>	Comparação dos resultados de faixa linear e limite de detecção para a determinação de BZF por diferentes técnicas citadas na literatura.....	51

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Formas alotrópicas de compostos de carbono, (A) Fulereo, (B) Grafeno, (C) Nanotubo, (D) Grafite e (E) Diamante. ....2
- Figura 1.2** Representação esquemática dos diferentes tipos de nanotubos: (A) SWCNTs (Nanotubos de Carbono de Parede Simples) e (B) MWCNTs (Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas)<sup>10</sup>. ....3
- Figura 1.3** Representação esquemática dos vetores primitivos ( $\vec{a}_1$ ) e ( $\vec{a}_2$ ), vetor quiral ( $\vec{C}_h$ ) e vetor de translação ( $\vec{T}$ ) sobre uma folha de grafeno. ....4
- Figura 1.4** Representação esquemática dos diferentes tipos de quiralidade dos nanotubos. (A) nanotubo aquiral *armchair* (B) nanotubo aquiral *zigzag* (C) nanotubo quiral. ....5
- Figura 1.5** Representação esquemática da funcionalização dos CNTs por tratamento químico. ....7
- Figura 1.6** Representação esquemática dos diferentes tipos de modificação de CNTs. (A, B) Modificação dos CNTs por ligação covalente com grupos funcionais carbonados. (C, D) Modificação dos CNTs por adsorção de proteínas. ....8
- Figura 1.7** (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível interação entre as moléculas de DHP na formação do filme sobre a superfície do eletrodo após evaporação do solvente<sup>39</sup>. ....11
- Figura 1.8** Estrutura molecular da Genfibrozila (GEN). ....12
- Figura 1.9** Estrutura molecular do Bezafibrato (BZF) .....13
- Figura 3.1** Fotografia do eletrodo de carbono vítreo.....20
- Figura 4.1** Voltamogramas cíclicos para a solução de  $K_3Fe(CN)_6$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura de potencial usando (A) DHP/GCE, (B) GCE, e (C) MWCNTs-DHP/GCE. Dependência linear de  $I_{vs} v^{1/2}$  para o cálculo da área ativa usando (D) DHP/GCE, (E) GCE e (F) MWCNTs-DHP/GCE .....25
- Figura 4.2** Imagens de MEV dos filmes: DHP (A) e MWCNTs-DHP (B).....26
- Figura 4.3** Voltamogramas cíclicos para solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando os diferentes eletrodos (em

- verde: DHP-GCE, azul: GCE, em preto: MWCNTs-DHP/GCE e em vermelho um branco de reagentes usando MWCNTs-DHP/GCE) propostos e velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  .....27
- Figura 4.4** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  usando MWCNTs-DHP/GCE em diferentes eletrólitos suporte: Tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5), Tampão Fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0), Tampão BR (pH 2,0),  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  .....28
- Figura 4.5** (A) Voltamogramas cíclicos da oxidação de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando um MWCNTs-DHP/GCE para diferentes tempos de pré-concentração do analito em velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Variação da corrente de pico com o tempo de pré-concentração do analito. ....29
- Figura 4.6** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada (com correção de linha base) para diferentes concentrações de GEN ( $0,75, 1,0, 1,8, 2,5, 3,9, 5,2, 7,8$  e  $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0),  $f = 40 \text{ Hz}$ ,  $a = 45 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ . Curva analítica para o GEN usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido),  $n = 3$ . ....31
- Figura 4.7** Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial (com correção de linha base) para diferentes concentrações de GEN ( $0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5$  e  $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0),  $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$ ,  $t = 10 \text{ ms}$ . Curva analítica para o GEN usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido),  $n = 3$ . ....32
- Figura 4.8** Cromatograma obtido para GEN  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e curva analítica obtida na faixa de concentração de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (inserida). ....36
- Figura 4.9** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada obtidos para solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  antes e após eletrólise do analito por  $900 \text{ s}$  para  $f = 40 \text{ Hz}$ ,  $a = 45 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ . ....38
- Figura 4.10** Voltamogramas cíclicos de redissolução anódica de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na faixa de velocidades de varredura de potencial de  $5$  a  $150 \text{ mV s}^{-1}$  (A). Dependência linear de  $\log I$  vs  $\log v$  (B). ....39

- Figura 4.11** Dependência linear do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) do GEM em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o MWCNTs-DHP/GCE com o  $\text{In}^{3+}$ , .....40
- Figura 4.13** Reação proposta de eletrooxidação do GEN na superfície do MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0).....41
- Figura 4.14** Voltamogramas cíclicos obtidos para BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando os diferentes eletrodos de trabalho (em preto o MWCNTs-DHP/GC, em vermelho um branco usando o MWCNTs-DHP/GC, em azul o DHP/CGE e em verde o GCE) com velocidade de varredura potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de 5 minutos.....42
- Figura 4.15** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para solução BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a diferentes pH (2,0, 3,0, 4,0 e 5,0). com velocidade de varredura potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de 5 minutos. ....43
- Figura 4.16** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  usando MWCNTs-DHP/GCE em diferentes eletrólitos suporte (ácido sulfúrico  $0,1$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, tampão BR pH 2,0 e tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0), velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de 5 minutos. ....44
- Figura 4.17** Variação da corrente de pico para diferentes tempos de pré-concentração de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando um MWCNTs-DHP/GCE.....45
- Figura 4.18** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada (com correção de linha base) para diferentes concentrações de BZF ( $0,5, 0,7, 1,0, 1,9, 2,9, 3,8, 4,7, 5,6, 6,5, 7,4, 8,2$  e  $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0),  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 7 \text{ mV}$ . Curva analítica para o BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido)  $n=3$ . ....48
- Figura 4.19** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0)  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 7 \text{ mV}$ , antes e após eletrólise do analito por 900 segundos aplicando um potencial de  $1,15 \text{ V}$  no MWCNTs-DHP/GCE. ....52
- Figura 4.20** Voltamogramas de redissolução anódica linear de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) e em diferentes velocidades de

varredura de potencial (10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200  $\text{mV s}^{-1}$ ) usando o MWCNTs-DHP/GCE e tempo de pré-concentração de 5 minutos. ....53

**Figura 4.21** Dependência linear de  $\log I$  com  $\log \nu$  para BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o MWCNTs-DHP/GCE. ....54

**Figura 4.22** Dependência linear de  $E_{\text{ox}}$  com  $\ln \nu$  para BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o MWCNTs-DHP/GCE. ....55

**Figura 4.24** Reação proposta para a eletrooxidação do BZF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) sobre o MWCNTs-DHP/GCE .....55

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE FIBRATOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE CARBONO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos voltamétricos para a determinação de genfibrozila (GEN) e bezafibrato (BZF) em formulações farmacêuticas, empregando eletrodos de carbono vítreo modificados com filme de dihexadecil hidrogênio fosfato contendo nanotubos de carbono de paredes múltiplas tratados quimicamente. Inicialmente estudou-se o comportamento voltamétrico de GEN em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0), observando-se um pico irreversível de oxidação em 1,31 V. A técnica de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada foi selecionada para a quantificação do GEN em formulações farmacêuticas, com os seguintes parâmetros avaliados: tempo de pré-concentração de 300 s, frequência de 40 Hz, amplitude de pulso de 45 mV e incremento de varredura de 4 mV. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de GEN de 7,5 × 10<sup>-8</sup> a 1,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, representada pela equação  $\Delta I (\mu\text{A}) = 0,086 + 1,05 \times 10^7 [\text{GEN}] (\text{mol L}^{-1})$ , com um coeficiente de correlação linear de 0,997 e um limite de detecção de 5,3 × 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. O procedimento desenvolvido foi empregado com sucesso na determinação de GEN em amostras farmacêuticas comerciais e os resultados obtidos foram comparados com o método de referência, descrito na farmacopeia britânica. Não houve diferença significativa (5,0 %) entre os resultados obtidos a um nível de confiança de 95%. A determinação do BZF foi realizada em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) sendo observado um pico de oxidação irreversível em 1,09 V. A técnica de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada foi selecionada para a determinação de BZF com os seguintes parâmetros otimizados: tempo de pré-concentração de 180 s, frequência de 20 Hz, amplitude de pulso de 40 mV e incremento de varredura de 7 mV. O método proposto apresentou uma curva analítica para BZF variando entre 5,0 × 10<sup>-8</sup> e 9,1 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> e um limite de detecção de 1,6 × 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. O BZF foi quantificado em amostras comerciais e os resultados comparados com o método espectrofotométrico, os erros obtidos variaram entre -2,9 e 0,5 %. Finalmente, para cada analito foram calculados o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação e foi proposto um possível mecanismo para reação de eletrooxidação destes fármacos, uma vez que, não relatos na literatura.

**ABSTRACT****VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF FIBRATES IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS USING GLASSY CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH CARBON NANOTUBES**

In this work voltammetric methods were developed from gemfibrozil (GEM) and bezafibrate (BZF) determination in pharmaceutical formulations for using modified glassy carbon electrode with dihexadecyl hydrogen phosphate containing carbon nanotubes treated chemically. Firstly was studied the voltammetric behavior of GEM in 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2.0) phosphate buffer solution, was observed an irreversible oxidation peak in 1.31 V. Square-wave adsorptive stripping voltammetry was selected for GEM quantification in pharmaceuticals formulations, with the following parameters: adsorption time of 300 s, frequency of 40 Hz, a pulse amplitude of 45 mV and scan increment of 4 mV. The analytical curve was linear over the concentration range of 7.5 × 10<sup>-8</sup> a 1.0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> of GEM, represented by following  $\Delta I (\mu A) = 0,086 + 1,05 \times 10^7 [GEM] (\text{mol L}^{-1})$ , correlation coefficient of 0.997 and detection limit of 5.3 × 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. The procedure developed was successfully applied to determine GEM in commercial pharmaceutical samples and the results were compared with the reference method, described in British pharmacopoeia. There was no significant difference (5 %) between the results obtained at a confidence level of 95%. The BZF determination was carried in 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2.0) phosphate buffer solution and an irreversible peak in 1.09 V was observed. Square-wave adsorptive stripping voltammetry technique was selected for BZF determination with the following parameters: adsorption time of 180 s, frequency of 20 Hz, pulse amplitude of 40 mV and scan increment of 7 mV. The proposed method presented a linear interval between 5.0 × 10<sup>-8</sup> a 9.1 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> and detection limited of 1.6 × 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. The BZF was quantified in commercial samples and the results were compared with de spectrophotometric method, with errors between -2.9 e 0.5 %. Finally for each analyte were calculated the number of electrons involved in the oxidation reaction and was proposed a possible mechanism for the oxidation reaction of these drugs, because there are no reports in the literature

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1 Apresentação .....	2
1.2 Nanotubos de Carbono .....	3
1.2.1 Sínteses dos CNTs .....	5
1.2.2 Tratamento dos CNTs .....	6
1.2.3 Toxicidade dos CNTs .....	8
1.2.4 Aplicações dos CNTs .....	10
1.3 Dihexadecil hidrogênio fosfato .....	11
1.4 Fibratos .....	11
1.4.1 Genfibrozila .....	12
1.4.2 Bezafibrato .....	13
<b>2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>16</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>18</b>
3.1 Instrumentação.....	18
3.2 Reagentes e soluções .....	18
3.2.1 Soluções estoque.....	19
3.3 Tratamento dos CNTs .....	19
3.4 Preparação do filme de MWCNTs-DHP/GCE .....	19
3.5 Célula eletroquímica.....	20
3.6 Amostras .....	20
3.7 Método de referência para a determinação de GEN .....	21
3.8 Método comparativo para a determinação de BZF .....	21
3.9 Eletrólise em potencial controlado.....	22
3.10 Tratamento de resíduos .....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1 Desenvolvimento do eletrodo de trabalho .....	24
4.1.1 Estudo da área eletroativa do eletrodo.....	24
4.1.2 Caracterização dos filmes por MEV .....	26

4.2	Determinação de GEN .....	26
4.2.1	Estudo do comportamento voltamétrico do GEN .....	26
4.2.2	Efeito do eletrólito suporte e do pH .....	27
4.2.3	Estudo do potencial e tempo de pré-concentração .....	28
4.2.4	Estudo das técnicas voltamétricas .....	29
4.2.4.1	Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada.....	29
4.2.4.2	Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.....	31
4.2.5	Estudo da repetibilidade.....	33
4.2.6	Estudo da adição e recuperação.....	33
4.2.7	Estudo de interferentes em potencial.....	34
4.2.8	Método de referência .....	35
4.2.9	Análises das amostras .....	36
4.3	Estudo eletroquímico do GEN.....	37
4.3.1	Eletrólise do GEN.....	37
4.3.2	Efeito da velocidade de varredura de potencial .....	38
4.3.2.1	Cálculo do número de elétrons na etapa determinante da reação.....	39
4.3.3	Reação proposta de eletrooxidação do GEN .....	40
4.4	Determinação do BZF .....	41
4.4.1	Comportamento voltamétrico do BZF.....	41
4.4.2	Estudo do eletrólito suporte.....	42
4.4.3	Estudo do potencial e tempo de pré-concentração .....	44
4.4.4	Estudo das técnicas voltamétricas .....	45
4.4.4.1	Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada.....	45
4.4.4.2	Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.....	46
4.4.5	Curva analítica .....	46
4.4.6	Estudo da repetibilidade.....	48
4.4.7	Estudo da adição e recuperação.....	49
4.4.8	Estudo de interferentes em potencial.....	49
4.4.9	Análises das amostras .....	50
4.4.10	Comparação com métodos descritos na literatura .....	51
4.5	Estudo eletroquímico do BZF.....	51
4.5.1	Eletrólise do BZF.....	52
4.5.2	Estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial.....	53
4.5.2.1	Cálculo do número de elétrons na etapa determinante da reação.....	54

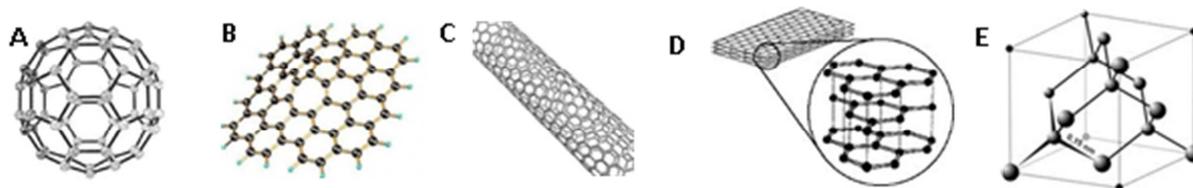
4.5.3 Reação de eletrooxidação do BZF sobre o MWCNTs-DHP/GCE .....	55
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>6 ALGUMAS PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>62</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

# **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Apresentação

O elemento químico carbono pode formar diferentes compostos de fórmula  $C_n$  denominados alótropos, a saber: grafite, diamante, fulereno, grafeno e nanotubos<sup>1,2</sup>. Esses alótropos apresentados na Figura 1.1, possuem propriedades físicas e químicas únicas que tem permitido o desenvolvimento de diversos eletrodos devido ao efeito eletrocatalítico observado em muitas oportunidades na determinação de analitos orgânicos e inorgânicos em amostras ambientais, farmacêuticas, alimentícias, biológicas entre outras<sup>3</sup>.



**Figura 1.1** Formas alotrópicas de compostos de carbono, (A) Fulereno, (B) Grafeno, (C) Nanotubo, (D) Grafite e (E) Diamante.

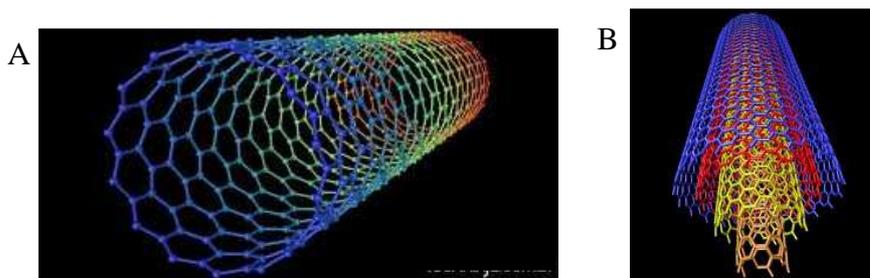
Diferentes tipos de eletrodos à base de carbono são descritos na literatura podendo ser citados os eletrodos sólidos como o eletrodo de carbono vítreo (GCE), o eletrodo de carbono pirolítico, o eletrodo de fibra de carbono, o eletrodo de diamante dopado com boro<sup>4</sup>, os eletrodos modificados com filmes contendo nanotubos de carbono (CNTs)<sup>5</sup> e grafeno<sup>6</sup>, e os eletrodos de materiais compósitos como os eletrodos de pasta de carbono<sup>7</sup> e os eletrodos de grafite suportados em polímeros. O uso de eletrodos à base de carbono foi amplamente difundido nas últimas décadas por apresentarem amplas janelas de potencial e baixas correntes residuais, permitindo assim, a substituição do eletrodo de mercúrio duramente criticado e combatido por suas implicações ambientais e toxicológicas.

Nas últimas décadas a pesquisa de novos materiais tem dado um grande avanço com o desenvolvimento da nanotecnologia. As extraordinárias propriedades mecânicas, elétricas e eletroquímicas de nanopartículas, CNTs e folhas de grafeno têm gerado grande interesse para o desenvolvimento de novos sensores e eletrodos em aplicações eletroanalíticas<sup>8</sup>. Estes materiais tem permitido o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de muitos analitos, com baixos

limites de detecção, e aumento significativo da sensibilidade e sem apresentar interferência significativa da matriz<sup>9</sup>.

## 1.2 Nanotubos de Carbono

Em forma geral, os CNTs podem ser classificados em dois tipos, os *Single Walled Carbon Nanotubes* (SWCNTs) ou em português Nanotubos de Carbono de Parede Simples (Figura 1.2 A) e os *Multi Walled Carbon Nanotubes* (MWCNTs) ou em português Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (Figura 1.2 B). Os SWCNTs são estruturalmente formados por um único tubo de carbono e os MWCNTs são formados por vários cilindros de carbono concêntricos e com espaço entre camadas de 0,3 – 0,4 nm<sup>10</sup>.



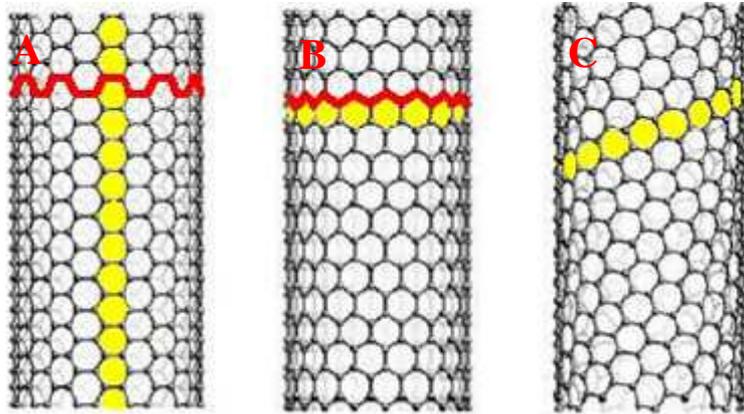
**Figura 1.2** Representação esquemática dos diferentes tipos de nanotubos: (A) SWCNTs (Nanotubos de Carbono de Parede Simples) e (B) MWCNTs (Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas)<sup>10</sup>.

Os diâmetros dos tubos normalmente estão na faixa de nanômetros, variando de 0,4 a 3 nm para os SWCNTs e de 1,4 a 100 nm para MWCNTs. É o tamanho pequeno dos CNTs que, frequentemente, responde por suas propriedades únicas e dá vantagens importantes para seu uso em eletroanálises. Propriedades como a sua grande área superficial, resistência mecânica, grande condutividade térmica e elétrica, comportamento eletrônico de semicondutor ou condutor e facilidade para promover a transferência de elétrons, permitem sua aplicação em eletroanalítica<sup>11</sup>.

Para explicar a estrutura de um nanotubo de carbono, pode se pensar em uma folha de grafeno enrolada na forma de um cilindro, mais não de forma aleatória. Define-se então um vector quiral ( $\vec{C}_h$ ), e é este vetor quiral, que caracteriza o nanotubo e pode ser definido em função de duas componentes (vetores unitários  $\vec{a}_1$



necessariamente nulo ( $n \neq m = 0$ )<sup>12</sup>. Os CNTs *armchair* e *zigzag* ganharam esses nomes devido às suas terminações, como apresentado na Figura 1.4



**Figura 1.4** Representação esquemática dos diferentes tipos de quiralidade dos nanotubos. (A) nanotubo aquiral *armchair* (B) nanotubo aquiral *zigzag* (C) nanotubo quiral.

A quiralidade dos CNTs é determinante do ponto de vista eletrônico, pois, dependendo da simetria define-se o comportamento, como metal ou semicondutor. Os CNTs do tipo *armchair* são sempre de características metálicas, todos os demais tubos apresentam caráter de semicondutor intrínseco. Cabe destacar que a condutividade elétrica nos CNTs é do tipo balístico, ou seja, seus elétrons não se chocam com os átomos da rede, como ocorre com outros tipos de condutores eletrônicos.

### 1.2.1 Sínteses dos CNTs

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram sintetizados pela primeira vez por Iijima no ano 1991<sup>13</sup>. Após esta descoberta, o interesse pela aplicação dos CNTs em diversas áreas gerou uma grande procura por novas formas para a síntese destes devido às propriedades únicas apresentadas.

A rota de síntese dos CNTs em larga escala encontra-se em fase de consolidação, pois, apesar de terem sido sintetizados pela primeira vez há mais de duas décadas, ainda não existe um protocolo que consiga controlar totalmente a quiralidade, a quantidade e a qualidade dos nanotubos sintetizados.

Existem três técnicas amplamente usadas para a síntese dos CNTs: descarga por arco elétrico, ablação por laser e deposição química de vapor (CVD)<sup>14,15</sup>.

A descarga por arco elétrico é uma técnica usada para síntese de MWCNTs e SWCNTs que consiste na geração de um arco elétrico entre dois eletrodos de grafite separados por uma distância inferior a 1 mm, sob atmosfera inerte de hélio ou argônio e sob pressão reduzida. Uma corrente entre 50 e 120 A conduzida em um potencial de aproximadamente 30 V gera um plasma de alta temperatura (> 3000°C) entre os eletrodos. Nesta condições experimentais o carbono sublima e condensa rapidamente para formar CNTs e outros produtos carbonáceos<sup>16</sup>.

A síntese de CNTs usando a técnica de ablação por laser é baseada no uso de um laser para gerar altas temperaturas em um alvo de carbono. O carbono vaporiza rapidamente, sendo em seguida resfriado por uma corrente de um gás inerte como hélio ou argônio. Para se obter os SWCNTs, o alvo de grafite é impregnado com material catalítico composto principalmente por partículas de Fe e Co<sup>17</sup>.

No método de síntese de CNTs conhecido como CVD utiliza-se um substrato preparado com uma camada de partículas metálicas catalíticas (Ni, Co, Fe ou mistura de metais), sendo o substrato aquecido entre 800-1000 °C. Dentro do reator dois gases são misturados: hidrogênio, nitrogênio ou amônia e um gás precursor (metano, etileno ou acetileno). Nestas condições, os gases precursores reagem, rompendo as ligações covalentes e os átomos liberados seguem para as bordas das partículas metálicas, onde os nanotubos são crescidos<sup>18,19</sup>.

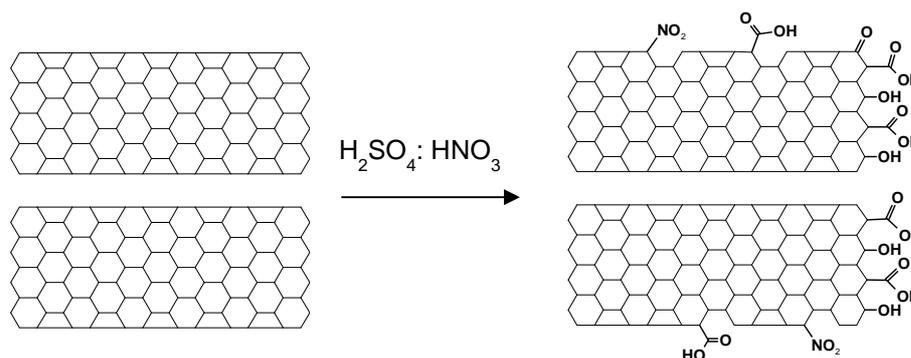
### 1.2.2 Tratamento dos CNTs

Os CNTs são macromoléculas compostas por milhares de átomos de carbono ligados por ligações químicas covalentes  $sp^2$ , formando assim um sistema aromático deslocalizado de natureza hidrofóbica. Estas propriedades dos nanotubos dificultam a dispersão dos mesmos em soluções aquosas e em solventes orgânicos como etanol, metanol e isopropanol devido à formação de aglomerados, dificultando assim a construção de eletrodos modificados com filmes contendo CNTs.

O tratamento dos CNTs ou sua funcionalização é uma estratégia empregada para modificar a estrutura química dos CNTs e melhorar as suas propriedades<sup>20</sup>. Na literatura são encontradas descritas diversas metodologias para os tratamentos dos

CNTs, de forma geral, podem ser classificadas em duas categorias: modificação covalente por meio de formação de grupos funcionais na superfície dos CNTs<sup>9</sup> e modificação por adsorção física de moléculas ou polímeros nas superfícies destes materiais<sup>8</sup>.

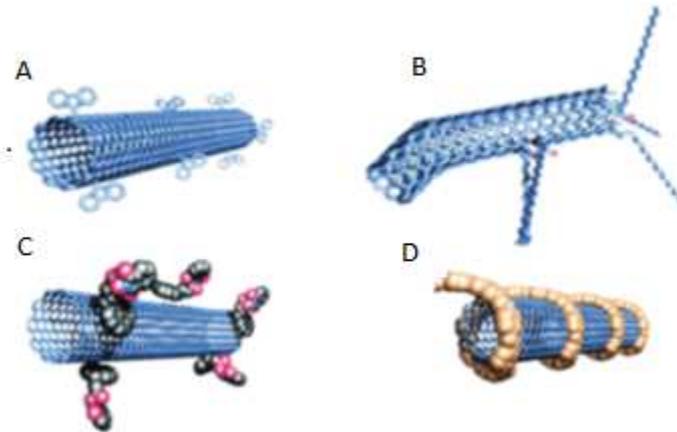
Os tratamentos eletroquímicos, fotoquímicos ou químicos são usados para modificar covalentemente os CNTs, sendo o tratamento químico o procedimento mais simples e a opção mais comumente usada para o tratamento dos CNTs e posterior confecção de eletrodos modificados com esses materiais<sup>21</sup>. Os principais procedimentos empregados no tratamento químico dos CNTs utilizam ácidos como o ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico ou suas misturas, que provocam modificações na morfologia dos CNTs. Estas modificações compreendem em diminuição do tamanho e/ou abertura das extremidades dos nanotubos, aumento dos defeitos na estrutura, rupturas das paredes e também introdução de grupos funcionais oxigenados como ácido carboxílico, álcool, hidroxila e cetona, além de grupos nitro<sup>22,23</sup> (Figura 1.5). O tratamento químico melhora a dispersão dos CNTs em soluções aquosas e elimina as impurezas de metais (purificação) remanentes dos processos catalíticos das sínteses dos nanotubos<sup>24</sup>. Outros grupos funcionais como aminas, fenóis e cadeias alifáticas com dois ou mais átomos de carbono também podem ser ligados na superfície dos CNTs como estão representados nas Figuras 1.6 A e B.



**Figura 1.5** Representação esquemática da funcionalização dos CNTs por tratamento químico.

A outra estratégia usada para tratar CNTs é a modificação não covalente, os CNTs são dispersos em soluções contendo compostos orgânicos ou polímeros que são adsorvidos na superfície dos CNTs e assim modificar suas propriedades, como é representado nas Figuras 1.6 C e D. Para melhorar a solubilidade dos CNTs,

moléculas aromáticas, porfirinas, ou surfactantes são usados na fabricação de dispersões de CNTs. Estes compostos interagem com as paredes dos CNTs por meio de interações  $\pi - \pi$ , interações eletrostáticas ou forças de Van der Waals, permitindo melhorar sua dispersão em meios aquosos. Sacarídeos, peptídeos, proteínas, DNA e outras bio-macromoléculas, assim como polímeros e polieletrólitos, também são empregados na modificação não covalente.



**Figura 1.6** Representação esquemática dos diferentes tipos de modificação de CNTs. (A, B) Modificação dos CNTs por ligação covalente com grupos funcionais carbonados. (C, D) Modificação dos CNTs por adsorção de proteínas.

### 1.2.3 Toxicidade dos CNTs

As propriedades únicas dos CNTs fazem este material promissor e atraente no desenvolvimento de materiais para uma grande gama de aplicações. Atualmente a manufatura de produtos contendo CNTs está ainda em crescimento; dispositivos eletrônicos e adesivos com resina epóxi são alguns exemplos de produtos de consumo massivo que contém CNTs, além de aplicações tecnológicas, como o desenvolvimento de membranas para captura de  $\text{CO}_2$ , materiais compósitos poliméricos, filtros para a remoção de vários compostos orgânicos voláteis e tratamento de efluentes<sup>25</sup>.

É reportado em diversos estudos que o material particulado de diâmetro nanométrico é mais tóxico que o material de diâmetro micrométrico, mas existe falta de informação sobre o verdadeiro efeito na saúde humana a curto e longo prazo do uso de nanomateriais<sup>26-28</sup>.

São pouco conhecidos os impactos ambientais e os riscos para a saúde humana relacionados à produção, manuseio e descarte de nanomateriais. SWCNTs e MWCNTs possuem uma grande área superficial e grande capacidade de interagir com biomoléculas (membranas celulares, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA). Todos os tipos de interações químicas estudadas nas diferentes aplicações e usos dos CNTs, fornece a ideia de como podem reagir dentro dos sistemas biológicos, mas ainda não é conhecido com certeza o comportamento químico dos CNTs dentro de sistemas biológicos e, especialmente, a capacidade de interagir com organelas celulares como membranas e ribossomos.<sup>29,30</sup>

Os primeiros estudos da toxicidade de CNTs foram realizados para avaliar o risco por inalação de CNTs não tratados em ratos, mostrando que altas doses induzem a granulomas, fibrose e morte animal. Estudos posteriores apresentam que a exposição aos CNTs geralmente causa estresse oxidativo, depleção da glutathione, aumento do número de células dérmicas e alopecia<sup>31</sup>.

Em seres humanos, o contato com a pele é muito provável podendo gerar respostas inflamatórias. Existe ainda muita controvérsia no uso dos CNTs em aplicações biológicas e biomédicas como reconstrução de tecidos, construção de próteses para autoplastia, placas ou parafusos para fixação de fraturas, suportes para a regeneração óssea, veiculadores de drogas, sensores químicos e biológicos, suporte para enzimas em biorreatores, entre outros, já que ainda não foi possível determinar sua biopersistência e toxicidade em humanos.<sup>32,33</sup>

Os possíveis impactos ambientais gerados pelo descarte de CNTs no ambiente, especialmente em sistema aquáticos, ainda não foram avaliados. Recentes estudos apresentam que dispersões de CNTs são altamente estáveis em ambientes aquáticos. Os ácidos húmicos, material orgânico com características aromáticas, interagem preferencialmente com os CNTs, permitindo assim a acumulação de CNTs na matéria húmica. A toxicidade dos CNTs em zooplâncton *in vitro* têm sido avaliada e 100 % de mortalidade para *Daphnia magna* foi obtida com uma concentração de 20 mg/L de SWCNTs. A ingestão de CNTs por zooplâncton gera diminuição no seu crescimento e reprodução, que pode conduzir a uma diminuição na população e, conseqüentemente, afetar o equilíbrio trófico dos ecossistemas<sup>34,35</sup>.

### 1.2.4 Aplicações dos CNTs

Os CNTs têm sido usados na fabricação de componentes eletrônicos, fabricação de filtros e membranas, em catálises e no desenvolvimento de novos sensores e eletrodos<sup>36</sup>. Nesta última área, muitos trabalhos reportam o efeito eletrocatalítico dos CNTs nas determinações de diversos analitos eletroativos.

Eletrodos e biossensores empregando-se os CNTs têm sido descritos na literatura<sup>5,22</sup>, como os biossensores para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>37,38</sup>, glicose<sup>39</sup> e pesticidas<sup>40,41</sup>. Eletrodos modificados com filmes diversos contendo CNTs dispersados para a determinação de drogas em formulações farmacêuticas<sup>42,43</sup> e eletrodos modificados com filmes de CNTs dispersados em líquidos iônicos para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NADH<sup>44</sup> também foram propostos.

Dentre os eletrodos mais empregados em eletroanalítica como o de carbono vítreo, compósitos, de pasta de carbono, grafite, diamante dopado com boro, platina, ouro entre outros, o eletrodo de carbono vítreo é o mais empregado na fabricação de eletrodos modificados com filmes poliméricos contendo CNTs imobilizados. O filme contendo os CNTs deve ter boa estabilidade, boa aderência no eletrodo de trabalho e não deve impedir a transferência eletrônica e/ou do analito da interface eletrodo/solução. Os CNTs vem sendo empregados na elaboração de muitos eletrodos modificados em voltametria/amperometria devido a sua boa capacidade de transferência eletrônica e efeitos eletrocatalíticos na determinação de diversos analitos eletroativos.

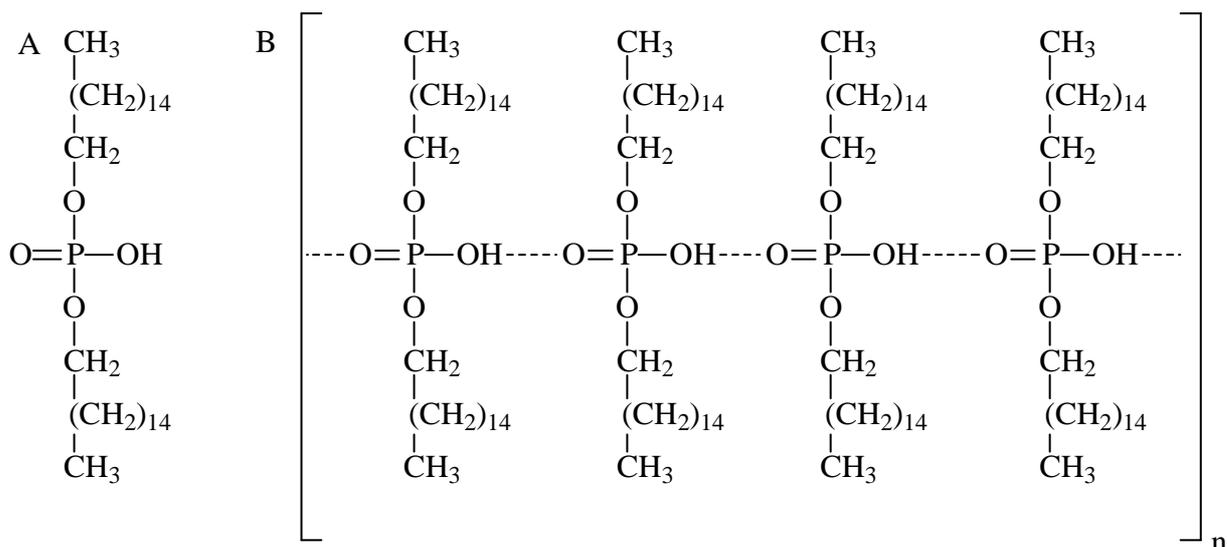
Há diversos trabalhos na literatura envolvendo eletrodos eletroquímicos à base de filmes de CNTs. Wang *et al*<sup>45</sup> propuseram a fabricação de um GCE modificado com filme de poli(3-metiltofeno) sobre Nafion/SWCNTs para a determinação de dopamina. Yin *et al*<sup>46</sup> reportaram o uso de um CGE modificado com polianilina e MWCNTs incorporados em β-ciclodextrina para a determinação de dopamina na presença de ácido ascórbico. Yi *et al*<sup>47</sup> desenvolveram um sensor pela modificação de um GCE com azul brilhante eletropolimerizado com DHP dispersado em MWCNTs para determinação de epinefrina, um importante neurotransmissor.

As determinações eletroquímicas de cátions metálicos são amplamente estudadas usando eletrodos modificados com filmes. Por exemplo, Sun *et al*<sup>48</sup> reportam a determinação de Cd<sup>2+</sup> usando um GCE modificado com SWCNTs-Nafion. A rutina, um importante flavonóide glicosídico foi determinado por Zeng *et al*<sup>49</sup>

usando um eletrodo de ouro modificado com SWCMTs. Determinações de analitos em amostras complexas como alimentos têm sido feitas com eletrodos modificados. Por exemplo, no nosso grupo de pesquisa, Sartori *et al*<sup>6</sup> determinaram sulfito em alimentos usando um GCE modificado com hidrocloreto de polialilamina e CNTs.

### 1.3 Dihexadecil hidrogênio fosfato

O dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP) é um surfactante formado estruturalmente por um grupo fosfato ligado a duas cadeias carbônicas apolares como é apresentado na Figura 1.7A<sup>50</sup>. Este composto pode ser disperso em água por agitação ultrassônica e sua dispersão pode formar uma película estável na superfície do eletrodo após a evaporação da água, provavelmente, por polimerização devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato (Figura 1.7B)<sup>39,51,52</sup>.



**Figura 1.7** (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível interação entre as moléculas de DHP na formação do filme sobre a superfície do eletrodo após evaporação do solvente<sup>39</sup>.

### 1.4 Fibratos

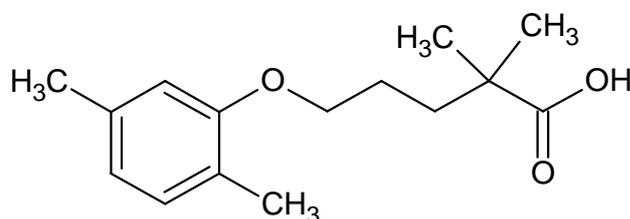
Os fibratos são compostos orgânicos não esteroidais, derivados do ácido fíbrico, usados como agentes antilipídêmicos<sup>53</sup>. Estes fármacos reduzem os

níveis de lipídeos (colesterol e triglicerídeos) no sangue. O primeiro composto pertencente a essa classe (Clofibrato) foi descrito no início dos anos 1960, na busca de novos compostos orgânicos com atividade redutora de colesterol em ratos<sup>54</sup>. Mais recentemente, foi demonstrado que os fibratos inibem várias etapas das vias metabólicas da biossíntese do colesterol. Genfibrozila, bezafibrato, fenofibrato, clofibrato e ciprofibrato são medicamentos amplamente indicados em pacientes para os quais os testes confirmaram um aumento endógeno na concentração de triglicerídeos devido à má alimentação<sup>55</sup>.

### 1.4.1 Genfibrozila

A genfibrozila (GEN) é o nome genérico dado ao ácido 5-(2, 5-dimetilfenoxi)-2, 2-dimetilpentanóico representado na Figura 1.8. Esta molécula é um composto regulador de lipídeos, indicado para reduzir o nível de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e triglicerídeos. Além disso, eleva o nível de lipoproteína de alta densidade (HDL), sendo indicada para os seguintes casos<sup>55,56</sup>:

- Prevenção primária de doença arterial coronariana e infarto do miocárdio em pacientes com hipercolesterolemia, dislipidemia mista e hipertrigliceridemia.
- Tratamento de paciente adultos com níveis séricos elevados de triglicerídeos (hiperlipidemia tipos IV e V) que apresentam risco de pancreatite e que não respondam adequadamente a um determinado esforço dietético para controlá-los.



**Figura 1.8** Estrutura molecular da Genfibrozila (GEN).

A GEN possui uma meia-vida de eliminação plasmática de aproximadamente 1,5 horas e é ministrada duas vezes ao dia. A dose diária recomendada é de 900-1200 mg, não devendo ultrapassar a dose máxima de 1500 mg/dia.

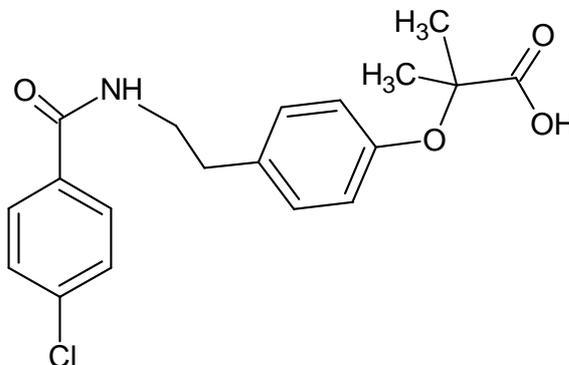
A Farmacopeia britânica<sup>57</sup> recomenda a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica analítica a ser usada na quantificação da GEN em formulações farmacêuticas.

Na literatura alguns métodos analíticos são descritos para a determinação de GEN em produtos farmacêuticos e fluídos biológicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência<sup>58-62</sup>, cromatografia gasosa<sup>63,64</sup>, espectrofluorometria<sup>65</sup>, micro extração em fase sólida<sup>66</sup>, e potenciometria<sup>67</sup>.

Xu *et al*<sup>68</sup>, propuseram a determinação de GEN usando polarografia sendo obtido um limite de detecção de  $9,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e curva analítica no intervalo de concentração de GEN entre  $1,8 \times 10^{-7}$  e  $2,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Esse foi o único trabalho encontrado na literatura envolvendo a voltametria para a determinação de GEN, abrindo assim perspectivas de novos estudos e propostas de métodos eletroanalíticos para a sua determinação em compostos farmacêuticos empregando-se GCE modificados com filmes poliméricos contendo CNTs imobilizados.

#### 1.4.2 Bezafibrato

O Bezafibrato (BZF) é um agente redutor dos níveis de triglicerídeos e colesterol no sangue, possui o nome químico de ácido 2-[4-[2-[(4-clorobenzoil)amino]etil]fenoxi]-2-metilpropanóico, e está representado na Figura 1.9, sendo empregado no tratamento de vários tipos de hiperlipidemias. O BZF diminui o nível plasmático de triglicerídeos e aumenta o nível de HDL no sangue reduzindo, significativamente, o número de casos de incidentes cardiovasculares em pacientes tratados com este fármaco<sup>55</sup>.



**Figura 1.9** Estrutura molecular do Bezafibrato (BZF)

A Farmacopeia britânica<sup>57</sup> recomenda o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de BZF em formulações farmacêuticas. Na literatura são relatadas outras técnicas usadas na determinação de BZF, incluindo, cromatografia<sup>69-72</sup>, espectrofotometria<sup>73,74</sup> e eletroforese capilar<sup>75</sup>, não sendo reportadas determinações voltamétricas de BZF.

## **CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS**

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de eletrodos de carbono vítreo modificados com filme de dihexadecil hidrogênio fosfato contendo nanotubos de carbono tratados quimicamente, para a quantificação de genfibrozila e bezafibrato em formulações farmacêuticas.

O emprego deste eletrodo modificado para a determinação do GEN e BZF pode ser justificado por diversos motivos, como por exemplo ao fato de que há um manuscrito na literatura para a determinação do GEN utilizando técnicas voltamétricas e não há citações de trabalhos para determinações voltamétricas de BZF. Além disso, a Farmacopéia britânica preconiza para ambos os fármacos a técnica de HPLC, método que utiliza instrumentação custosa e razoável quantidade (volume) de solventes orgânicos.

## **CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL**

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão relatados os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do trabalho, assim como, uma descrição da instrumentação (equipamentos, eletrodos e célula eletroquímica).

### 3.1 Instrumentação

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) interfaciado a um computador e gerenciado pelo programa GPES 4.0.

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro Orion, modelo EA 940.

As pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de  $\pm 0,01$  mg e uma balança analítica Mettler, modelo H10, com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

Para a homogeneização das dispersões dos CNTs foi usado um banho ultrassom UNIQUE, modelo ultraclean 1400 A.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10AT, com detector de UV-vis, modelo SPD-M10AVP com uma coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack CLC-ODS (4.6 × 150 mm, 5  $\mu$ m) e um injetor manual com alça de amostragem de 20  $\mu$ L.

As medidas de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2550 usando uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

### 3.2 Reagentes e soluções

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (20-30 nm de diâmetro, 1-2 nm de espessura de parede e 0,5 - 2,0  $\mu$ m de comprimento, com a pureza de >95 %), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Genfibrozila, bezafibrato e diexadecil hidrogênio fosfato foram obtidos da Sigma-Aldrich. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q. A

solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0), utilizada como eletrólito suporte, foi preparada a partir de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% v/v e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.2.1 Soluções estoque

As soluções estoque de GEN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 5,00 mg de GEN (Sigma-Aldrich) em 2,0 mL de etanol.

As soluções estoque de BZF  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 7,20 mg de BZF (Sigma) em 2,0 mL de etanol.

Todas as diluições, à partir das soluções estoque, foram feitas em eletrólito suporte.

### 3.3 Tratamento dos CNTs

Foram misturados 50,00 mg de MWCNTs em 50 mL de uma solução dos ácidos sulfúrico e nítrico concentrados na proporção 3:1 v/v, respectivamente. Essa mistura foi agitada durante 12 h a temperatura ambiente. Após esse tempo, lavou-se os nanotubos de carbono com água ultrapura até atingir um pH entre 6,5 - 7,0. A separação da água da suspensão dos nanotubos de carbono foi realizada com o auxílio de uma centrífuga. Após a separação por centrifugação, a porção de água sobrenadante foi retirada utilizando uma bomba peristáltica. Finalizando-se o processo, os CNTs funcionalizados foram secos por 12 h em uma estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>22</sup>.

### 3.4 Preparação do filme de MWCNTs-DHP/GCE

O eletrodo de carbono vítreo de 3,7 mm de diâmetro (Figura 3.1) foi polido sequencialmente sobre um pano para polimento humedecido com suspensões de alumina 0,10 e 0,05  $\mu\text{m}$  para a obtenção de uma superfície espelhada. Em seguida, lavou-se e sonicou-se com água ultrapura, por 5 minutos.

Uma massa de 1,00 mg de DHP e 1,00 mg de MWCNTs tratados quimicamente foram adicionadas a 1,00 mL de água ultrapura. A mistura foi deixada em banho ultrassônico por 2 h para dispersar homoganeamente o DHP e os MWCNTs, afim de formar uma suspensão estável<sup>39</sup>.



**Figura 3.1** Fotografia do eletrodo de carbono vítreo

Um volume de 15  $\mu\text{L}$  da suspensão de DHP e MWCNTs foram gotejados na superfície polida do GCE com o auxílio de uma micropipeta e deixou-se secar por 12 horas à temperatura ambiente.

### 3.5 Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de vidro de compartimento único de 15 mL, confeccionada em vidro Pyrex, contendo uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte e um sistema de três eletrodos descritos a seguir:

- Eletrodo de trabalho: eletrodo de GCE modificado com filme de DHP e MWCNTs.
- Eletrodo de referência: eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).
- Eletrodo auxiliar: uma placa de platina.

### 3.6 Amostras

Para as determinações de GEN e BZF em formulações farmacêuticas foram adquiridas várias amostras no comércio local. Quatro amostras de 600 e 900 mg de GEN por comprimido e quatro amostras de 200 mg de BZF por comprimido foram analisadas em triplicata usando-se o método de adição múltipla de padrão.

Para a determinação de GEN, dez comprimidos foram pesados e macerados com ajuda de um almofariz e pistilo. Uma massa de 0,1858 g das amostras contendo 600 mg de GEN por comprimido ou uma massa de 0,1740 g das amostras contendo 900 mg de GEN por comprimido foram transferidas respectivamente para

um balão volumétrico de 50 mL contendo 25 mL de etanol. A solução resultante foi deixada em banho ultrassônico por 15 minutos e o balão foi completado com etanol até 50 mL. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram diluídas para 2 mL com eletrólito suporte. Para as medidas voltamétricas, 250  $\mu\text{L}$  da solução diluída de GEN foi adicionada na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte e o sistema de três eletrodos.

Para a determinação do BZF dez comprimidos foram pesados e macerados com ajuda de um almofariz e pistilo. Uma massa correspondente a 0,2829 g desta mistura foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, contendo 25 mL de etanol. A solução foi deixada em banho ultrassom por 15 minutos e diluída com etanol até 50 mL. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram diluídas para 2 mL com eletrólito suporte. Para as medidas voltamétricas uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da solução diluída de BZF foi adicionada na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte e o sistema de três eletrodos.

### **3.7 Método de referência para a determinação de GEN**

O método de referência utilizado para avaliar o desempenho do procedimento voltamétrico proposto para a determinação de GEN foi a cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção UV-vis, conforme recomendado na Farmacopeia Britânica<sup>57</sup>. Foi usada como fase móvel uma solução acetonitrila/água (70:30, v/v) e pH 2,5 (ajustado com ácido ortofosfórico 85 % v/v), a vazão da fase móvel foi de 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , o volume injetado foi de 50  $\mu\text{L}$  e um comprimento de onda de 232 nm foi selecionado.

### **3.8 Método comparativo para a determinação de BZF**

O método comparativo empregado para a determinação de BZF foi a espectrofotometria UV-Vis como descrito por J. de Melo *et al*<sup>74</sup>.

Uma massa macerada de comprimido equivalente a 50 mg de BZF foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL contendo 25 mL de NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ . A solução resultante foi deixada em banho ultrassônico por 15 minutos e completada com solução de NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  até 50 mL. A solução obtida foi filtrada em papel filtro qualitativo. As medidas de absorbância foram feitas no

espectrofotômetro em um comprimento de onda de 230 nm, usando uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

### **3.9 Eletrólise em potencial controlado**

A eletrólise foi realizada usando cronoamperometria. Uma solução do analito (GEN ou BZF) em eletrólito suporte foi oxidada durante 900 s. Durante o experimento, a solução foi agitada e o potencial do eletrodo de trabalho foi fixado em um valor superior ao potencial de oxidação de cada fármaco<sup>76</sup>. Foram registrados os voltamogramas de redissolução de onda quadrada antes e depois da eletrólise e a carga obtida durante a eletrólise.

### **3.10 Tratamento de resíduos**

As soluções de descarte contendo fármacos e MWCNTs foram coletadas e armazenadas para ser devidamente tratadas pela central de resíduos da UFSCar. O restante das soluções empregadas foram neutralizadas e descartadas.

# **CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente são apresentados os estudos da área ativa e morfologia do eletrodo de carbono vítreo, do eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de DHP (DHP/GCE) e do eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de MWCNTs e DHP (MWCNTs-DHP/GCE), seguido da apresentação dos resultados obtidos do desenvolvimento dos métodos voltamétricos para a determinação de GEN e BZF em fármacos.

### 4.1 Desenvolvimento do eletrodo de trabalho

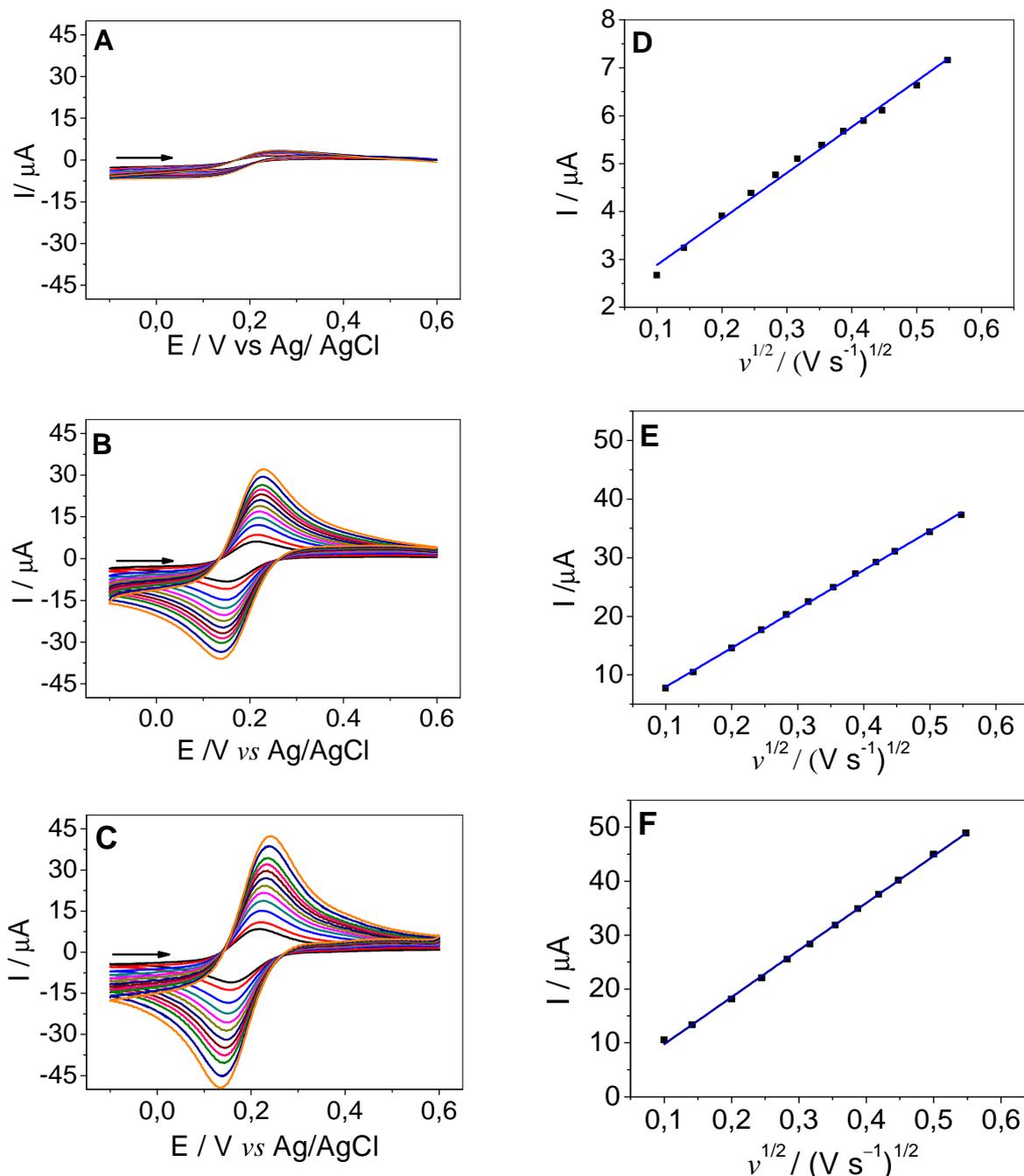
A dispersão de MWCNTs e DHP foram preparadas com 1,0 mg de MWCNTs, 1,0 mg de DHP e 1,0 mL de água. Essa composição empregada nessa dissertação foi a mesma obtidas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa<sup>39</sup>, por apresentar as melhores respostas voltamétricas e a melhor estabilidade e aderência do filme contendo os CNTs sobre o eletrodo de carbono vítreo.

#### 4.1.1 Estudo da área eletroativa do eletrodo.

A área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo e dos eletrodos de carbono vítreo modificados com DHP ou MWCNTs-DHP foram estimadas utilizando a equação de Randles-Sevcik (Eq. 1) utilizando a técnica de voltametria cíclica, empregando-se uma solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas cíclicos em diversas velocidades de varredura foram obtidos e são apresentados na Figura 4.1:

$$I = 2,69 \times 10^5 A n^{3/2} C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

Sendo  $I$  a corrente de pico (A),  $A$  a área eletroativa ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $n$  é o número de elétrons transferidos na reação,  $\nu$  a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ) e  $C$  a concentração da espécie em solução ( $\text{mol cm}^{-3}$ ). Um coeficiente de difusão ( $D$ ) igual a  $6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para o  $K_3[Fe(CN)_6]$  foi usado neste trabalho<sup>77</sup>.



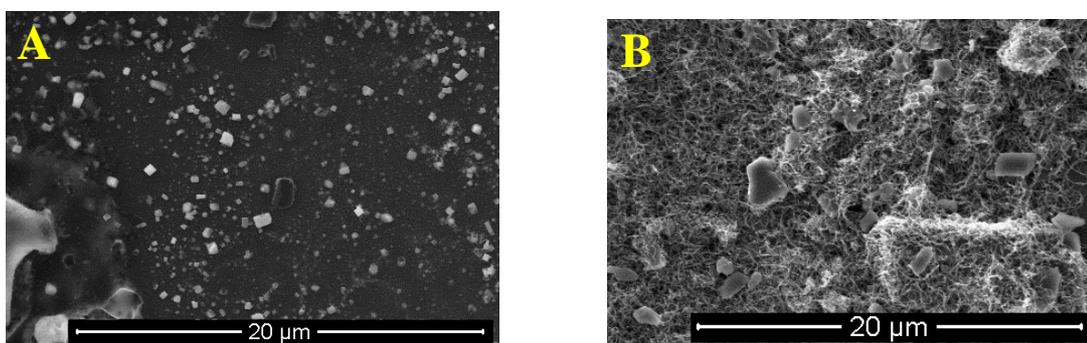
**Figura 4.1** Voltamogramas cíclicos para a solução de  $K_3Fe(CN)_6$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$  em KCl  $0,1$  mol  $L^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura de potencial usando (A) DHP/GCE, (B) GCE, e (C) MWCNTs-DHP/GCE. Dependência linear de  $I$  vs  $v^{1/2}$  para o cálculo da área ativa usando (D) DHP/GCE, (E) GCE e (F) MWCNTs-DHP/GCE

As áreas eletroativas foram estimadas para os eletrodos MWCNTs-DHP/GCE, DHP/GCE e GCE com valores de  $0,111$ ,  $0,014$  e  $0,086$   $cm^2$ , respectivamente. A presença dos nanotubos de carbono aumentaram a área eletroativa do eletrodo em comparação com o GCE. O eletrodo de DHP/GCE apresenta uma área eletroativa

menor que a do CGE provavelmente devido ao recobrimento da superfície do eletrodo com o filme de DHP limitando assim a transferência de elétrons entre o  $K_3Fe(CN)_6$  e o GCE. No caso do MWCNTs-DHP/GCE, o aumento da área eletroativa é devido aos CNTs na superfície e no meio do filme polimérico, que facilitam as transferências de elétrons entre o indicador de oxidação e redução e a superfície base do eletrodo de carbono vítreo.

#### 4.1.2 Caracterização dos filmes por MEV

Para a caracterização dos filmes de DHP e MWCNTs-DHP foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pode-se observar na Figura 4.2 (A) a imagem obtida para o filme de DHP, onde as partículas dispersas do DHP, recobrem a superfície do GCE formando um filme. Na Figuras 4.2 (B) apresenta-se a imagem obtida para o filme de MWCNTs-DHP, onde podem ser observadas as partículas de DHP dispersas com os MWCNTs para formar um filme que recobre a superfície do GCE.



**Figura 4.2** Imagens de MEV dos filmes: DHP (A) e MWCNTs-DHP (B)

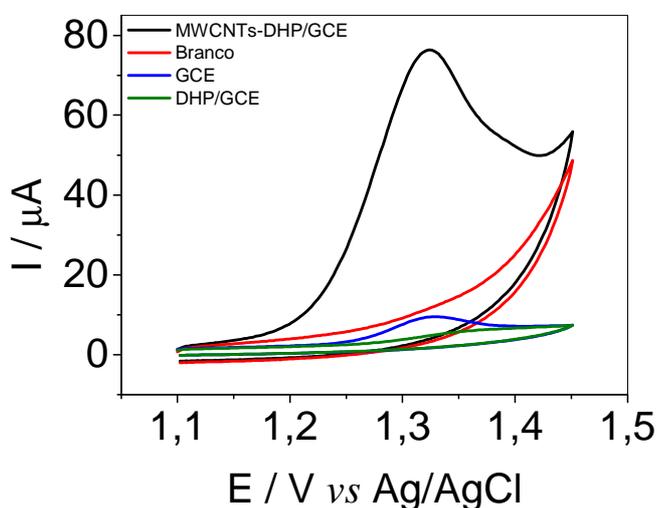
## 4.2 Determinação de GEN

### 4.2.1 Estudo do comportamento voltamétrico do GEN

Inicialmente estudou-se o comportamento voltamétrico do GEN com os eletrodos GCE, DHP/GCE e MWCNTs-DHP/GCE, utilizando a técnica de voltametria cíclica. Os estudos foram realizados nas seguintes condições: tampão fosfato 0,1

mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) como eletrólito suporte na presença de GEN 5 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>.

O perfil voltamétrico para o GEN nos diferentes eletrodos é apresentado na Figura 4.3. No eletrodo de MWCNTs-DHP/GCE o GEN apresentou uma melhor definição de pico em relação aos outros eletrodos e houve um deslocamento do potencial de trabalho para potenciais menores. Esse deslocamento pode ser explicado pelo efeito eletrocatalítico proporcionado pelos nanotubos de carbono. Além disso, o voltamograma para a solução de GEN neste eletrodo, apresentou um aumento significativo da intensidade de corrente de pico (aumento do sinal analítico), devido ao aumento na área eletroativa do eletrodo de trabalho.

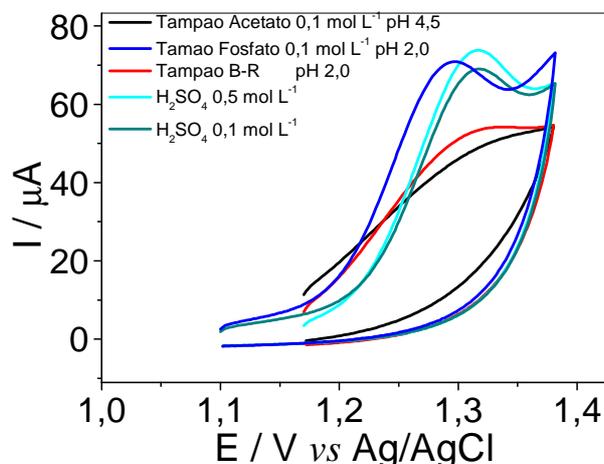


**Figura 4.3** Voltamogramas cíclicos para solução de GEN 5,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) usando os diferentes eletrodos (em verde: DHP-GCE, azul: GCE, em preto: MWCNTs-DHP/GCE e em vermelho um branco de reagentes usando MWCNTs-DHP/GCE) propostos e velocidade de varredura de potencial de 50 mV s<sup>-1</sup>

#### 4.2.2 Efeito do eletrólito suporte e do pH

O comportamento voltamétrico do GEN 5,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> foi investigado em diferentes eletrólitos suporte, a saber: ácido sulfúrico 0,1 e 0,5 mol L<sup>-1</sup>, tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,5), tampão BR na faixa de pH de 2,0 a 10 e tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> na faixa de pH de 2,0 a 10,0 (Figura 4.4). Foi selecionado o tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) como eletrólito suporte por apresentar boa intensidade

de corrente de pico e a melhor repetibilidade entre medidas sucessivas quando comparado com os outros eletrólitos estudados .

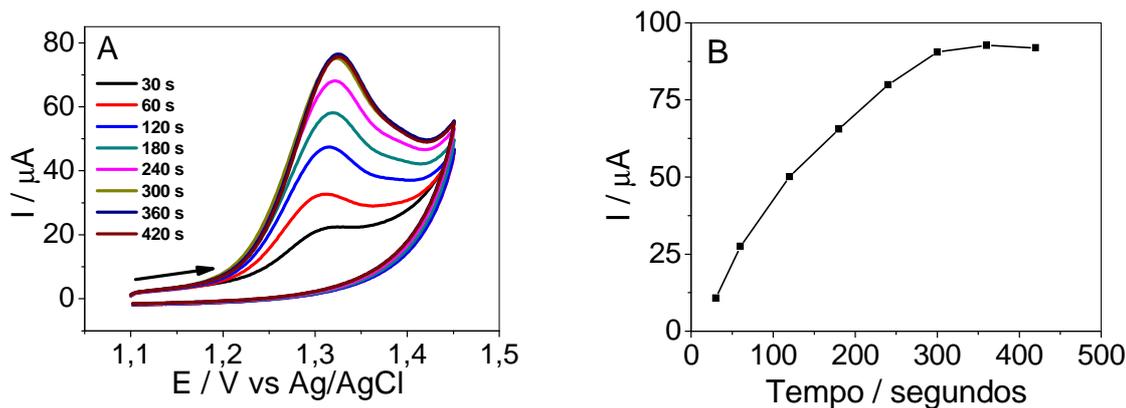


**Figura 4.4** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de GEM  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  usando MWCNTs-DHP/GCE em diferentes eletrólitos suporte: Tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5), Tampão Fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0), Tampão BR (pH 2,0),  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$

#### 4.2.3 Estudo do potencial e tempo de pré-concentração

O potencial de pré-concentração do analito para uma solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi estudado em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) em velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  no intervalo de potencial de  $0,2 \text{ V}$  a  $1,0 \text{ V}$  empregando-se um MWCNTs-DHP/GCE, sendo que o sinal analítico (corrente de pico) teve uma variação máxima de  $5 \%$  no intervalo de potencial estudado. Sendo assim, as determinações de GEN foram feitas sem a aplicação de potencial na etapa de pré-concentração, ou seja, em circuito aberto.

O tempo de pré-concentração para uma solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi investigado utilizando-se um MWCNTs-DHP/GCE, a faixa de tempo estudada foi de  $30$  a  $420 \text{ s}$ . Como pode ser observado na Figura 4.5, após  $300 \text{ s}$ , a corrente de pico de oxidação do analito permaneceu constante, devido a saturação da superfície do eletrodo de trabalho com o GEN adsorvido, sendo então esse tempo selecionado.



**Figura 4.5** (A) Voltamogramas cíclicos da oxidação de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando um MWCNTs-DHP/GCE para diferentes tempos de pré-concentração do analito em velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Variação da corrente de pico com o tempo de pré-concentração do analito.

#### 4.2.4 Estudo das técnicas voltamétricas

No desenvolvimento do método para determinação de GEN foram estudadas as técnicas de voltametria de onda quadrada (SWV) e a voltametria de pulso diferencial (DPV).

A determinação do GEN foi realizada com o MWCNTs-DHP/GCE, empregando-se um tempo de pré-concentração do analito de 300 s e tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). Esta etapa de pré-contração realizada antes das medidas voltamétricas, permitiu aumentar significativamente o sinal analítico e a sensibilidade de cada uma das determinações.

##### 4.2.4.1 Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada

A resposta voltamétrica do GEN foi estudada usando-se a técnica de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. Os parâmetros instrumentais que influenciam na resposta voltamétrica, frequência ( $f$ ), amplitude de pulso de potencial ( $a$ ) e o incremento de varredura de potencial ( $\Delta E$ ) foram otimizados, selecionando-se os parâmetros instrumentais que permitiram o registro de corrente de pico de maior intensidade e melhor resolução. Na Tabela 4.1 são apresentados os parâmetros, as faixas estudadas e os valores selecionados para cada parâmetro.

**Tabela 4.1** Parâmetros instrumentais otimizados da voltametria de redissolução anódica de onda quadrada

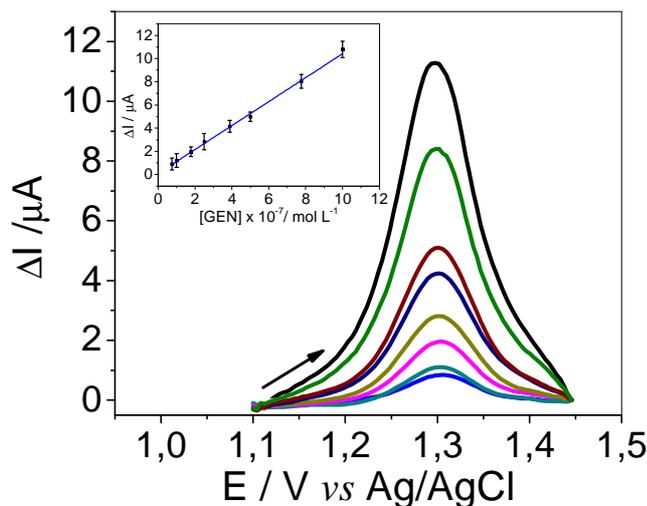
Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência (Hz)	10 – 65	40
Amplitude (mV)	10 – 60	45
Incremento de varredura ( $\Delta E$ )	1 – 6	4

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, e escolhidas as melhores condições experimentais, foi possível construir uma curva analítica na faixa de concentração de  $7,5 \times 10^{-8}$  a  $9,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de  $5,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão relativo da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, obtidas das correntes medidas no mesmo potencial de pico de oxidação do GEN e a relação:

$$LD = \frac{3s}{m} \quad \text{Eq 2}$$

onde s é o desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e m o valor do coeficiente angular da curva analítica.

A Figura 4.6 apresenta os voltamogramas obtidos por voltametria anódica de redissolução de onda quadrada para diferentes concentrações (0,75, 1,0, 1,8, 2,5, 3,9, 5,2, 7,8 e  $9,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) de GEN em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) empregando-se um MWCNTs-DHP/GCE. A curva analítica inserida nesta mesma figura apresentou a seguinte equação:  $\Delta I$  ( $\mu A$ ) = 0,086 +  $1,05 \times 10^7$  [GEN] (mol L<sup>-1</sup>) e coeficiente de correlação de 0,997.



**Figura 4.6** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada (com correção de linha base) para diferentes concentrações de GEN ( $0,75, 1,0, 1,8, 2,5, 3,9, 5,2, 7,8$  e  $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0),  $f = 40 \text{ Hz}$ ,  $a = 45 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ . Curva analítica para o GEN usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido),  $n = 3$ .

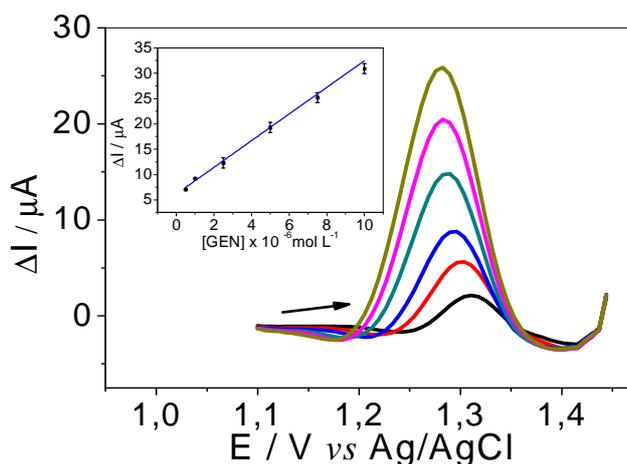
#### 4.2.4.2 Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

A segunda técnica voltamétrica estudada para a determinação de GEN foi a voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial. Para utilizar esta técnica foram otimizados os parâmetros instrumentais, a saber: velocidade de varredura de potencial ( $\nu$ ), amplitude ( $a$ ) e tempo de modulação ( $t$ ). Na Tabela 4.2 estão os intervalos de valores estudados para cada parâmetro e os valores destes parâmetros que foram selecionados para os experimentos seguintes.

**Tabela 4.2** Parâmetros instrumentais otimizados da voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

Parâmetro	Faixa estudada	Valor escolhido
Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )	10 – 100	70
Amplitude (mV)	10 – 90	70
Tempo de modulação (ms)	3 – 30	10

Na Figura 4.7 são apresentados os voltamogramas obtidos por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial para diferentes concentrações de GEN (0,5, 1,0 2,5, 5,0, 7,5 e 9,9 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) com limite de detecção de 1,4 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> calculado aplicando a equação 2. A curva analítica foi construída com os valores da media de três determinações e foi linear de acordo com a seguinte equação  $\Delta I$  ( $\mu\text{A}$ ) = 6,32 + 2,49 × 10<sup>6</sup> [GEN] (mol L<sup>-1</sup>) com coeficiente de correlação 0,997.



**Figura 4.7** Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial (com correção de linha base) para diferentes concentrações de GEN (0,5, 1,0 2,5, 5,0, 7,5 e 9,9 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0),  $\nu = 70 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$ ,  $t = 10 \text{ ms}$ . Curva analítica para o GEN usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido),  $n = 3$ .

Uma comparação dos parâmetros analíticos obtidos para cada uma das técnicas voltamétricas estudadas são apresentadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de GEN usando as técnicas de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e pulso diferencial

Parâmetro	SWV	DPV
Linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	7,5 × 10 <sup>-8</sup> a 9,9 × 10 <sup>-7</sup>	5,0 × 10 <sup>-7</sup> a 9,9 × 10 <sup>-6</sup>
Coeficiente de correlação ( <i>r</i> )	0,997	0,997
Coeficiente angular ( $\mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$ )	1,05 × 10 <sup>7</sup>	2,5 × 10 <sup>6</sup>
Coeficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,086	6,32
Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	5,3 × 10 <sup>-8</sup>	1,4 × 10 <sup>-7</sup>

Diante destes resultados, a voltametria de redissolução anódica de onda quadrada foi então selecionada para desenvolver o procedimento eletroanalítico para a determinação de GEN em formulações farmacêuticas por apresentar a melhor faixa linear, a melhor sensibilidade e o menor limite de detecção.

#### 4.2.5 Estudo da repetibilidade

A repetibilidade intra-dia e a repetibilidade inter-dias para o método proposto foi avaliada em duas diferentes concentrações  $2,5 \times 10^{-7}$  e  $7,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Para o estudo da repetibilidade intra-dia, um conjunto de 10 medidas foram realizadas nas mesmas condições experimentais no mesmo dia e com o mesmo eletrodo, sendo calculados os respectivos desvios padrões relativos (RSD) que estão apresentados na Tabela 4.4. A repetibilidade inter-dias foi avaliada por diferentes medidas realizadas em cinco diferentes dias renovando o filme de MWCNTs-DHP a cada dia e usando as mesmas condições experimentais. Os RSD calculados são apresentados na Tabela 4.4. Como pode ser observado o método voltamétrico proposto apresenta boa repetibilidade intra-dia e inter-dias, representadas em baixos RSD (%), uma indicação da precisão do método analítico.

**Tabela 4.4.** Desvio padrão relativo da repetibilidade intra e inter-dias para soluções de GEN  $2,5 \times 10^{-7}$  e  $7,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0)

Repetibilidade	[GEN] $\times 10^7$ mol L <sup>-1</sup>	RSD (%)
Intra-dia <sup>a</sup>	2,5	1,7
	7,5	2,8
Inter-dias <sup>ab</sup>	2,5	2,2
	7,5	3,1

<sup>a</sup> n=10    <sup>b</sup> 5 dias

#### 4.2.6 Estudo da adição e recuperação

Os efeitos de interferência da matriz das amostras na determinação do GEN, usando o método proposto foram também estudados. Os valores obtidos na

recuperação para adições de  $1,38 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,38 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de GEN variaram entre 94,5 % a 102,8% como apresentado na Tabela 4.5. Estes valores indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de GEN empregando o método voltamétrico proposto.

**Tabela 4.5** Porcentagens de recuperação para soluções de GEN  $1,38 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,38 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

[GEN] $\times 10^7 \text{ mol L}^{-1}$		%
Adicionado	Recuperado	
1,38	1,42	102,8
1,38	1,31	94,9
1,38	1,32	95,7
3,38	3,19	94,5
3,38	3,44	101,8
3,38	3,25	96,2

#### 4.2.7 Estudo de interferentes em potencial

A interferência em potencial de alguns concomitantes na determinação de GEN em formulações farmacêuticas foi avaliado em termos de RSD (%) para os concomitantes normalmente presentes em amostras comerciais (Tabela 4.6). As substâncias avaliadas foram sorbitol, amido, metilcelulose e álcool polivinílico, substâncias geralmente encontradas nas formulações farmacêuticas. O estudo foi realizado adicionando-se cada concomitante à solução inicial nas razões de concentrações de 1:1, 1:10 (analito:concomitante) e o sinal obtido foi comparado com aquele obtidos usando-se apenas a solução padrão de GEN  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Na Tabela 4.6 estão os RSD (%) obtidos para GEN  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de cada composto.

**Tabela 4.6** RSD (%) da medida de GEN  $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> na presença de concomitantes nas proporções 1:1 e 1:10 (analito:concomitante)

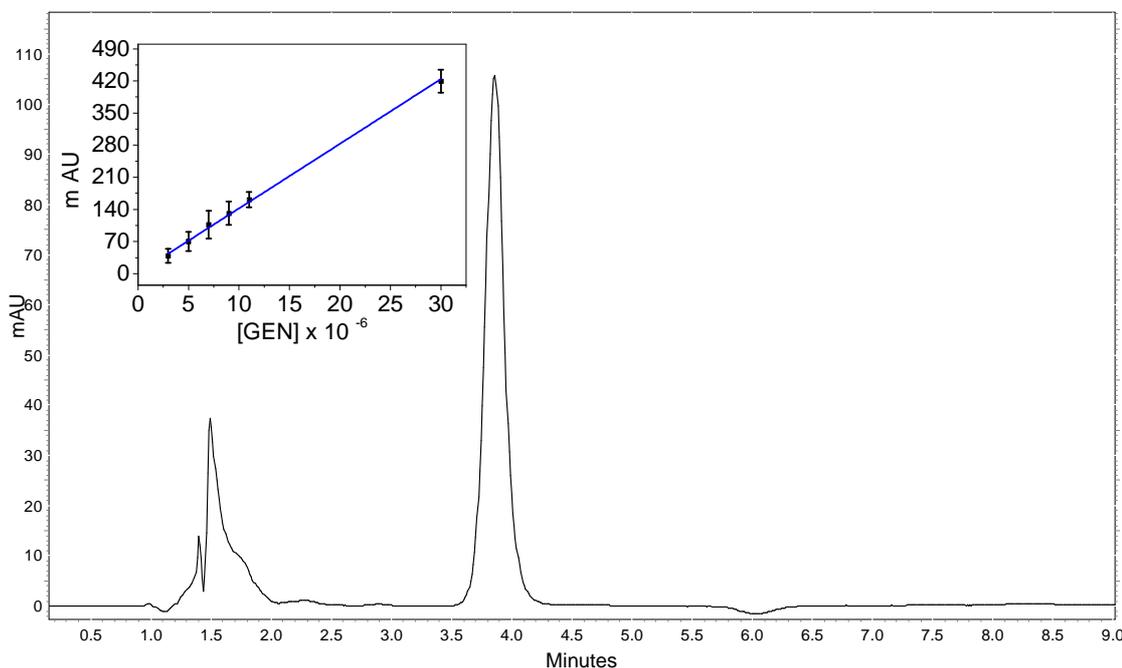
Composto	Proporção	RSD (%)
Sorbitol	1:1	0,67
	1:10	3,23
Amido	1:1	2,49
	1:10	2,45
Metilcelulose	1:1	3,85
	1:10	6,00
Álcool polivinílico	1:1	1,29
	1:10	4,53
Todos juntos	1:1	0,85
	1:10	1,45

Pode-se observar na Tabela 4.6 que nenhum composto estudado apresentou interferência significativa nas determinações de GEN. O concomitante que gerou a maior variação na resposta voltamétrica foi a metilcelulose (6,00 % na proporção 1:10). Considerando-se que as formulações farmacêuticas, geralmente, possuem uma proporção de metilcelulose menor, pode-se afirmar que esse composto não deveria interferir nas determinações voltamétricas.

#### 4.2.8 Método de referência

O método voltamétrico proposto, foi comparado com o método cromatográfico (HPLC) de referência como recomendado pela Farmacopeia Britânica<sup>57</sup>. Empregando-se as condições cromatográficas descritas na parte experimental, o GEN apresentou um tempo de retenção de 3,9 minutos com um tempo de volume morto de 1,5 minutos, como pode ser observado na Figura 4.8. O cromatograma líquido de alta eficiência foi obtido empregando-se uma solução de GEN  $1,0 \times 10^{-4}$

$\text{mol L}^{-1}$ , sendo que a curva analítica para esse analito foi linear no intervalo de concentração de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (ver inserção na Figura 4.8).



**Figura 4.8** Cromatograma obtido para GEN  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e curva analítica obtida na faixa de concentração de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (inserida).

#### 4.2.9 Análises das amostras

O método voltamétrico proposto foi aplicado na determinação de GEN em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos empregando o método cromatográfico de referência. Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados obtidos dos teores de GEN nas amostras farmacêuticas empregando-se os procedimentos proposto e o de referência.

Para comparar os resultados obtidos empregando-se os dois métodos analíticos, aplicou-se o teste *t-pareado*<sup>78</sup> a um nível de confiança de 95 %. Como o valor de *t* calculado ( $t_{\text{exp}} = 0,101$ ) foi menor que o valor de *t* crítico ( $t_{\text{crítico}} = 3,18$ ,  $\alpha = 0,05$ ), pode-se afirmar que não há diferença significativa, a um nível de 95 % de confiança, entre os teores de GEN nos produtos farmacêuticos. Ademais, os erros relativos encontrados variaram de -0,9 a 1,7 %, indicando uma boa exatidão do método proposto.

**Tabela 4.7** Teores de GEN obtidos em amostras farmacêuticas comerciais utilizando os métodos voltamétrico proposto e o HPLC

Amostras	GEN (mg/comprimido)		Erro relativo <sup>b</sup> (%)
	HPLC <sup>a</sup>	Voltamétrico <sup>a</sup>	
<b>A</b>	914 ± 14	920 ± 10	0,7
<b>B</b>	923 ± 15	939 ± 9	1,7
<b>C</b>	622 ± 7	610 ± 7	- 1,9
<b>D</b>	601 ± 8	593 ± 7	- 1,3

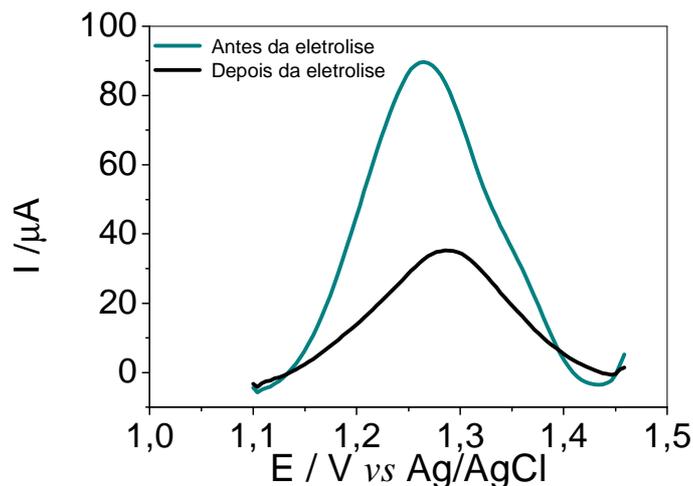
<sup>a</sup>  $n = 3$  medidas; <sup>b</sup>  $[100 \times (\text{método voltamétrico} - \text{método HPLC})] / \text{método HPLC}$

### 4.3 Estudo eletroquímico do GEN

Nesta parte do trabalho são apresentados os resultados da determinação do número de elétrons envolvidos na oxidação do GEN, o estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial na resposta voltamétrica do GEN, a determinação do coeficiente de difusão e é proposto um mecanismo da eletrooxidação do GEN na superfície do MWCNTs-DHP/GCE.

#### 4.3.1 Eletrólise do GEN

A eletrólise do GEN na superfície do eletrodo MWCNTs-DHP/GCE foi realizada por cronoamperometria. As condições experimentais empregadas foram: solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , tempo da eletrólise de 900 s em potencial constante do eletrodo de trabalho de 1,4 V. A Figura 4.9 apresenta os voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada registrados antes e depois da eletrooxidação do GEN<sup>57</sup>.



**Figura 4.9** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada obtidos para solução de GEN  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  antes e após eletrólise do analito por 900 s para  $f = 40 \text{ Hz}$ ,  $a = 45 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 4 \text{ mV}$ .

O valor de  $n$  (número de elétrons) foi calculado utilizando a equação de Faraday (Eq. 3)<sup>79</sup>:

$$Q = n\Delta NF \quad \text{Eq. 3}$$

Onde  $Q$  é a carga em coulombs,  $n$  é o número de elétrons transferidos na reação,  $\Delta N$  é a variação do número de mol (quantidade de matéria) durante a eletrólise e  $F$  a constante de Faraday,  $96485 \text{ C mol}^{-1}$

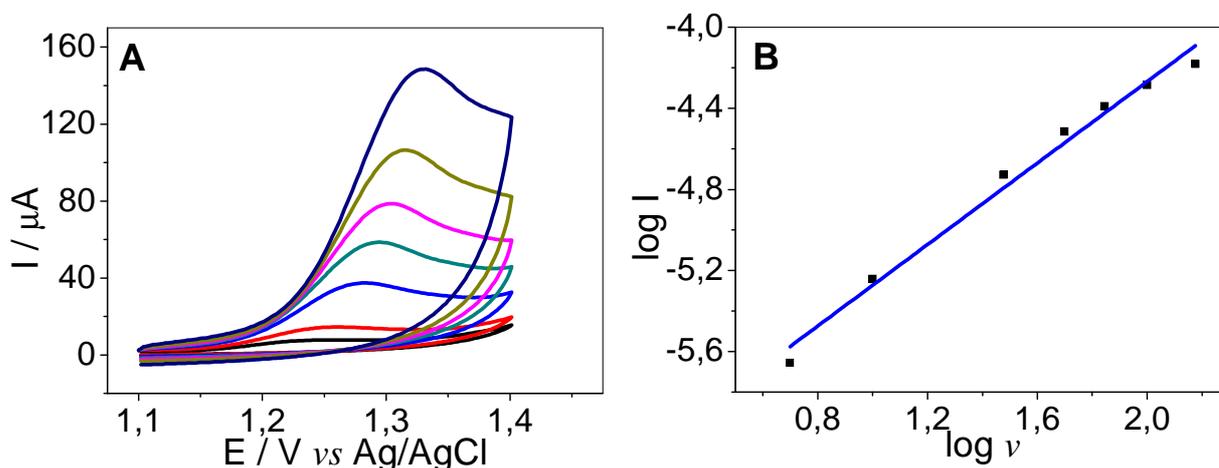
Durante a eletrólise foi registado uma carga de 60,2 mC e o valor de  $\Delta N$  ( $3,05 \times 10^{-7} \text{ mol}$ ) foi calculado a partir da diferença entre os números de mols antes e após a eletrólise usando-se as correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada. Utilizando-se a equação de Faraday, o valor calculado para  $n$  foi de  $2,1 \approx 2$ , que indica que a oxidação do GEN envolve a transferência de dois elétrons por molécula desse analito.

#### 4.3.2 Efeito da velocidade de varredura de potencial

O comportamento voltamétrico do GEN foi estudado em diferentes velocidades de varredura de 5 a  $150 \text{ mV s}^{-1}$  e os voltamogramas cíclicos são apresentados na Figura 4.10. O sinal analítico aumentou com o aumento da velocidade de varredura de potencial e houve um deslocamento do potencial de

oxidação para potenciais mais positivos, evidenciando assim, o comportamento de um sistema irreversível. Ademais, a ausência de pico quando se varreu o potencial no sentido contrário, corrobora com a irreversibilidade do sistema estudado.

Para determinar se a oxidação do GEN na superfície do MWCNTs-DHP/GCE é um processo controlado pela adsorção das espécies na superfície do eletrodo ou se é um processo controlado pela difusão das moléculas do analito, foi construído um gráfico que correlaciona o logaritmo do valor da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura de potencial (Figura 4.10). Como a dependência de  $\log I$  foi linear com o  $\log v$  e o coeficiente angular da reta obtida foi de aproximadamente 1, pode-se inferir que o processo redox na superfície do eletrodo de trabalho é controlado pela adsorção do analito na superfície do eletrodo<sup>80</sup>.



**Figura 4.10** Voltamogramas cíclicos de redissolução anódica de GEN  $5,0 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1$  mol  $L^{-1}$  na faixa de velocidades de varredura de potencial de  $5$  a  $150$   $mV s^{-1}$  (A). Dependência linear de  $\log I$  vs  $\log v$  (B).

#### 4.3.2.1 Cálculo do número de elétrons na etapa determinante da reação

O número de elétrons na etapa determinante da reação foi calculado usando-se as equações de Laviron para sistemas irreversíveis (Eq. 4)<sup>81</sup>. Essa equação relaciona o potencial de oxidação da espécie química em estudo com o logaritmo natural da velocidade de varredura de potencial.

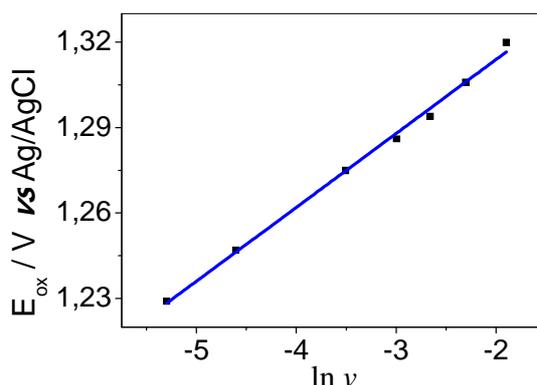
$$E_{ox} = E^o - \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln \left( \frac{RT K_s}{\alpha n F} \right) + \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln v \quad \text{Eq. 4}$$

Onde  $E_{ox}$ , é o potencial de pico anódico,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de elétrons,  $\nu$  é a velocidade de varredura ( $V s^{-1}$ ),  $k_s$  é a constante de transferência heterogênea de elétrons ( $s^{-1}$ ),  $E^\circ$  é o potencial formal de oxidação.

A Figura 4.11 apresenta o gráfico que relaciona  $E_{ox}$  em função de  $\ln \nu$ . A dependência do potencial de oxidação com o logaritmo natural de velocidade de varredura de potencial foi linear na faixa de velocidades de varredura de potencial estudada de acordo com a seguinte equação:

$$E_{ox} = 1,366 + 0,0259 \ln \nu; \quad r = 0,992$$

Assim, com o valor do coeficiente angular (0,0259) e tomando  $T = 298 K$ ,  $R = 8.314 J K^{-1} mol^{-1}$  e  $F = 96485 C mol^{-1}$ , o valor calculado para  $\alpha n$  foi igual a 0,990. Para compostos orgânicos,  $\alpha$  é geralmente assumido como sendo igual a  $0,5^{77}$  e o valor do número de elétrons calculado foi de  $1,98 \approx 2$ .



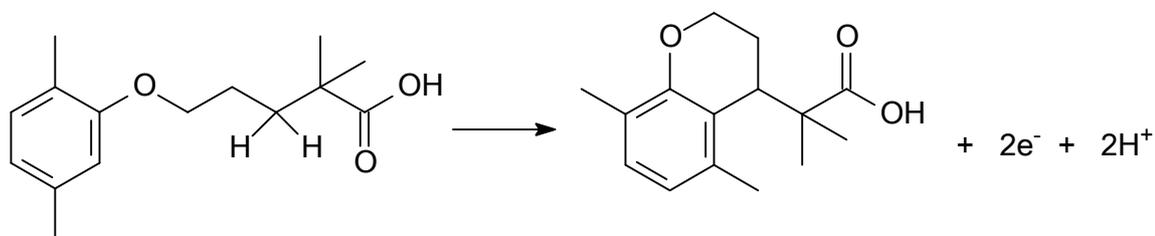
**Figura 4.11** Dependência linear do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) do GEM em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o MWCNTs-DHP/GCE com o  $\ln \nu$ .

Estes resultados mostram que a oxidação do GEN envolve a transferência de dois elétrons na etapa determinante da reação, corroborando assim com o resultado anterior encontrado,

### 4.3.3 Reação proposta de eletrooxidação do GEN

Os estudos da eletrólise do GEN indicaram que a oxidação voltamétrica deste composto orgânico em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) envolve a transferência de dois elétrons por molécula oxidada. Levando-se em consideração esse resultado

e também estudos prévios de degradação do GEN por fotofenton<sup>82</sup>, propõe-se a seguinte reação de eletrooxidação do GEN (Figura 4.13) sobre o eletrodo MWCNTs-DHP/GCE.



**Figura 4.12** Reação proposta de eletrooxidação do GEN na superfície do MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0).

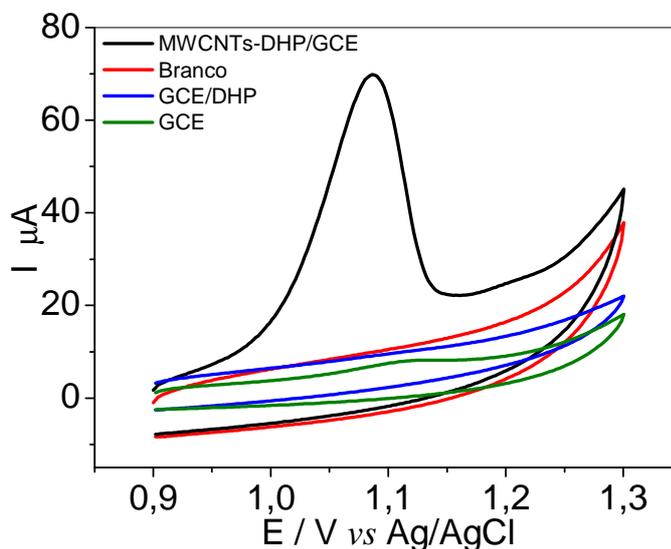
#### 4.4 Determinação do BZF

Para o desenvolvimento do método voltamétrico proposto para a determinação do BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE foram estudadas diferentes variáveis experimentais e escolhidas as melhores condições de trabalho. Sendo investigados: o eletrólito suporte, potencial e tempo de pré-concentração e os parâmetros instrumentais das técnicas voltamétricas para, finalmente, aplicar o método voltamétrico selecionado na quantificação do BZF em formulações farmacêuticas.

##### 4.4.1 Comportamento voltamétrico do BZF

O comportamento voltamétrico do BZF foi estudado por voltametria cíclica usando os eletrodos GCE, DHP/GCE e MWCNTs-DHP/GCE, na presença de BZF  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de potencial de 50 mV s<sup>-1</sup>. A Figura 4.14 apresenta os voltamogramas cíclicos para a oxidação do BZF na faixa de potencial de 0,9 V a 1,3 V, podendo ser observado um pico de oxidação do BZF em 1,09 V, com valor de corrente de 70,0  $\mu$ A utilizando o MWCNTs-DHP/GCE. O voltamograma cíclico obtido empregando-se o eletrodo de carbono vítreo apresenta um pico de corrente de

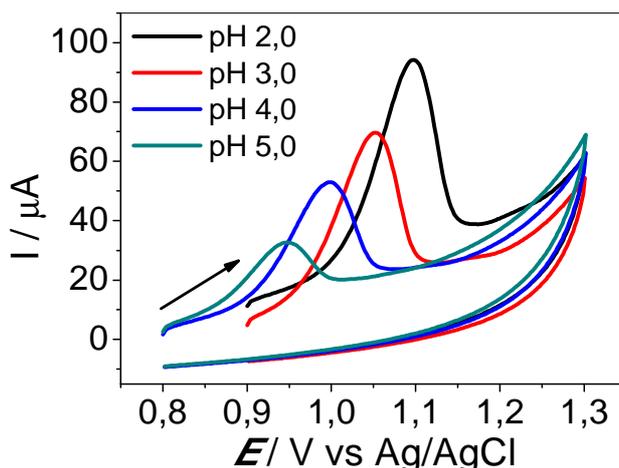
oxidação de aproximadamente 1,13 V e um valor de corrente de 1,09  $\mu\text{A}$ , valor muito menor quando comparado com o valor registrado usando o eletrodo contendo MWCNTs. Este aumento significativo no valor do pico de corrente pode ser explicado devido ao aumento na área ativa do eletrodo atribuído a presença dos MWCNTs no filme cobrindo a superfície eletrodo.



**Figura 4.13** Voltamogramas cíclicos obtidos para BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando os diferentes eletrodos de trabalho (em preto o MWCNTs-DHP/GC, em vermelho um branco usando o MWCNTs-DHP/GC, em azul o DHP/CGE e em verde o GCE) com velocidade de varredura potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de 5 minutos.

#### 4.4.2 Estudo do eletrólito suporte

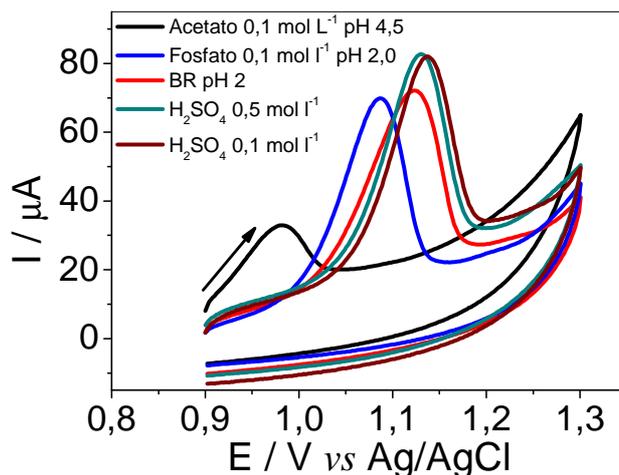
Experimentos iniciais de voltametria cíclica com velocidade de varredura potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  foram realizados com uma solução de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  variando o pH na faixa de 2,0 a 5,0, com o objetivo de se avaliar o efeito do pH sobre a oxidação do BZF. Como pode ser observado na Figura 4.15, ao aumentar o valor do pH do eletrólito suporte, tanto o potencial de oxidação do BZF como a intensidade da corrente de pico diminuíram. Este comportamento indica que o pH tem influência direta sobre a oxidação do BZF, devendo assim a concentração hidrogeniônica ser controlada em todas as soluções dos eletrólitos suporte. Sendo assim, nos estudos posteriores trabalhou-se com diversos eletrólitos suporte em vários valores de pH, objetivando-se obter o melhor desempenho analítico do método voltamétrico.



**Figura 4.14 (A)** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a diferentes pH (2,0, 3,0, 4,0 e 5,0). com velocidade de varredura potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de 5 minutos.

Utilizando a voltametria cíclica e o MWCNTs-DHP/GCE, foram investigados diferentes eletrólitos suporte, a saber: ácido sulfúrico  $0,1$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, tampão BR pH 2,0 e tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0. Os voltamogramas cíclicos obtidos para o BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 4.16.

O eletrólito suporte que proporcionou uma melhor resposta para a oxidação do BZF foi o tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0, com um perfil voltamétrico bem definido, boa intensidade de pico de corrente e ainda, apresentou um potencial de oxidação menor, quando comparado com os eletrólitos suporte que apresentaram intensidade de pico de corrente similar. O ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou a maior corrente de pico, no entanto este eletrólito não foi selecionado por não proporcionar respostas voltamétricas reproduzíveis.

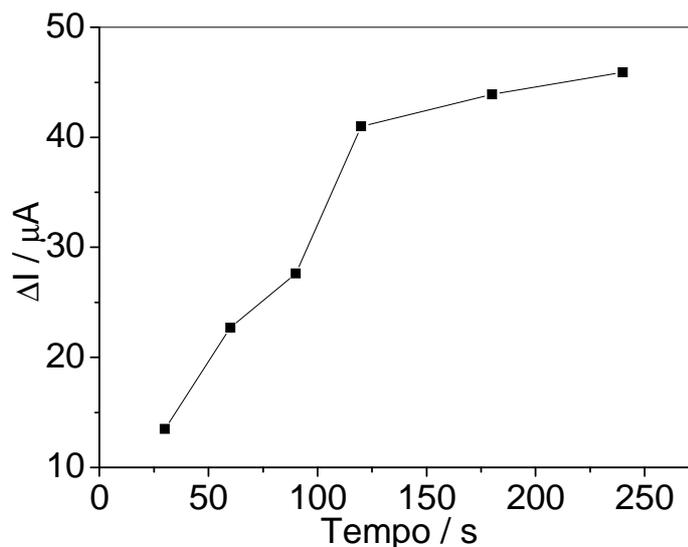


**Figura 4.15** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  usando MWCNTs-DHP/GCE em diferentes eletrólitos suporte (ácido sulfúrico  $0,1$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH  $4,5$ , tampão BR pH  $2,0$  e tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH  $2,0$ ), velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e tempo de acumulação de  $5$  minutos.

#### 4.4.3 Estudo do potencial e tempo de pré-concentração

O potencial de pré-concentração do BZF foi estudado por voltametria cíclica com velocidade de varredura de potencial de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  em uma solução de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH  $2,0$ ) usando um MWCNTs-DHP/GCE. Foram empregados um tempo de pré-concentração de  $240 \text{ s}$  com potenciais que variaram na faixa de  $0,0 \text{ V}$  a  $1,0 \text{ V}$ . O sinal analítico (corrente de pico) teve uma variação inferior a  $5 \%$  no intervalo de potencial estudado. Sendo assim, as determinações posteriores do BZF foram realizadas sem aplicação de potencial na etapa de pré-concentração, ou seja, em circuito aberto.

O efeito no tempo de pré-concentração foi também estudado empregando-se uma solução de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH  $2,0$ ) no intervalo de tempo entre  $30$  a  $240 \text{ s}$ , como mostrado na Figura 4.17. Pode ser observado nesta figura que para tempos superiores a  $180 \text{ s}$ , a intensidade do pico de corrente permaneceu praticamente constante, indicando assim uma saturação da superfície do eletrodo com o BZF adsorvido, sendo então esse tempo selecionado.



**Figura 4.16** Variação da corrente de pico para diferentes tempos de pré-concentração de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando um MWCNTs-DHP/GCE.

#### 4.4.4 Estudo das técnicas voltamétricas

Para o desenvolvimento do método voltamétrico proposto, utilizando um MWCNTs-DHP/GCE para a determinação de BZF, foram estudadas as técnicas de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e a voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial. Foram otimizados os parâmetros instrumentais e posteriormente foram construídas as respectivas curvas analíticas.

##### 4.4.4.1 Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada

A resposta voltamétrica (corrente de pico) para a oxidação de BZF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) usando um MWCNTs-DHP/GCE foi estudada por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. Os parâmetros instrumentais da técnica ( $f$ ,  $a$ ,  $\Delta E$ ) foram otimizados. Na Tabela 4.8 são apresentados as faixas estudadas e os valores selecionados para cada parâmetro.

**Tabela 4.8** Parâmetros instrumentais otimizados para voltametria de redissolução anódica de onda quadrada

Parâmetro	Faixa estudada	Valor escolhido
Amplitude (mV)	10 – 60	40
Frequência (Hz)	10 – 65	20
Incremento de varredura (mV)	3 – 16	7

#### 4.4.4.2 Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

A resposta voltamétrica para a determinação de BZF utilizando um MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) foi avaliada usando a voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial. Para utilizar esta técnica foram otimizados os parâmetros instrumentais, a saber: velocidade de varredura de potencial ( $v$ ), amplitude ( $a$ ) e tempo de modulação ( $t$ ). Na Tabela 4.9 são apresentados os intervalos de valores estudados para cada parâmetro e os valores destes parâmetros que foram selecionados.

**Tabela 4.9** Parâmetros instrumentais otimizados na voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial

Parâmetro	Faixa estudada	Valor escolhido
Velocidade de varredura (mV s <sup>-1</sup> )	10 – 110	70
Amplitude (mV)	10 – 150	90
Tempo de modulação (ms)	3 – 16	13

#### 4.4.5 Curva analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais, eletrólito suporte, tempo e potencial de pré-concentração e dos parâmetros instrumentais das técnicas voltamétricas, foram construídas as respectivas curvas analíticas. Foram registrados os voltamogramas após cada adição da solução padrão de BZF e com os valores médios de três determinações da corrente de pico ( $n = 3$ ) foi construídas a curva analítica. Os parâmetros analíticos para cada técnica (linearidade, coeficiente de

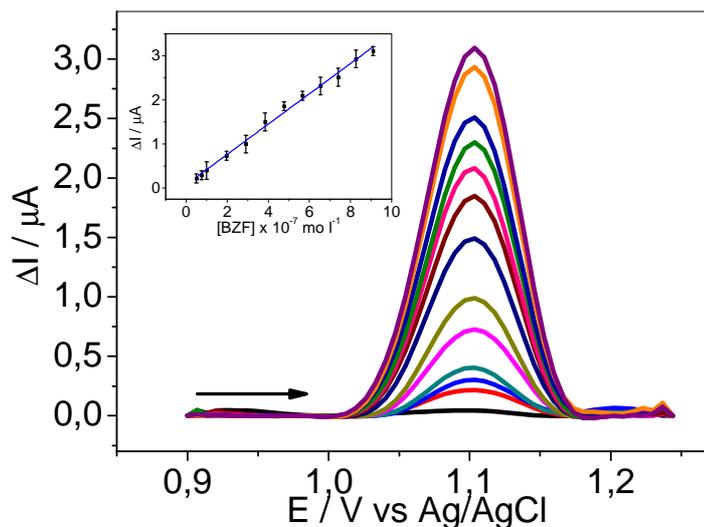
correlação, coeficiente angular, coeficiente linear e limite de detecção) foram calculados e comparados, como é apresentado na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10** Parâmetros analíticos calculados para voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e para voltametria pulso diferencial, empregadas na determinação do BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE

Parâmetro analítico	SWV	DPV
Linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	$5,0 \times 10^{-8}$ a $9,1 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$ a $9,1 \times 10^{-7}$
Coeficiente de correlação ( <i>r</i> )	0,997	0,991
Coeficiente angular ( $\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$ )	$3,40 \times 10^6$	$6,26 \times 10^{-6}$
Coeficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,078	0,82
Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	$1,6 \times 10^{-8}$	$3,8 \times 10^{-8}$

A voltametria de redissolução anódica de onda quadrada apresentou o menor limite de detecção e, a curva analítica, o maior intervalo linear de concentração, diante destes resultados, esta técnica foi então escolhida para as determinações de BZF.

A Figura 4.18 apresenta os voltamogramas obtidos para a construção da curva analítica, esta apresentou uma relação linear entre a corrente de pico de oxidação e a concentração do BZF representada na equação  $\Delta I (\mu\text{A}) = 0,078 + 3,4 \times 10^6 [\text{GEN}] (\text{mol L}^{-1})$ , com coeficiente de correlação 0,997 para diferentes concentrações de BZF, a saber: 0,50, 0,75, 1,00, 1,96, 2,91, 3,84, 4,76, 5,66, 6,54, 7,40, 8,26 e  $9,10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $1,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  calculado pela aplicação a equação 2.



**Figura 4.17** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada (com correção de linha base) para diferentes concentrações de BZF ( $0,5, 0,7, 1,0, 1,9, 2,9, 3,8, 4,7, 5,6, 6,5, 7,4, 8,2$  e  $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0),  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 7 \text{ mV}$ . Curva analítica para o BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE (inserido)  $n=3$ .

#### 4.4.6 Estudo da repetibilidade

O estudo da repetibilidade intra-dia do método proposto para a determinação do BZF foi realizado utilizando um MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) contendo BZF  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ou BZF  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Os desvios padrões relativos foram menores do que 5 % para 10 determinações sucessivas de BZF (Tabela 4.11). A repetibilidade inter-dias das medidas foi avaliada por medidas diárias de BZF nas mesmas concentrações supramencionadas durante 5 dias consecutivos, renovando-se o filme do eletrodo em cada dia. Os desvios padrões relativos das medidas estão apresentados na Tabela 4.11 e, em todos os casos, são inferiores a 5 %.

**Tabela 4.11** . Desvio padrão relativo para o estudo da repetibilidade intra e inter-dias para soluções de BFZ  $1,0 \times 10^{-7}$  e  $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0)

Repetibilidade	Concentração [ $10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> ]	RSD (%)
Intra-dia <sup>a</sup>	1,0	4,3
	5,0	3,8
Inter-dias <sup>ab</sup>	1,0	3,5
	5,0	4,8

<sup>a</sup> n=10    <sup>b</sup> 5 dias

No estudo da estabilidade do filme, empregou-se voltametria cíclica com uma velocidade de varredura de potencial de 50 mV s<sup>-1</sup> para uma solução de BZF  $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) até que houvesse uma variação de corrente de pico igual a  $\pm 5\%$ . Foi possível se obter 50 voltamogramas cíclicos com um % RSD na corrente de pico inferior a 5%. Após a 50 medidas os voltamogramas cíclicos obtidos apresentaram deslocamento do potencial de oxidação e diminuição da corrente de pico.

#### 4.4.7 Estudo da adição e recuperação

Para determinar a influência da matriz das amostras na resposta voltamétrica (corrente de pico), foram realizados experimentos de adição e recuperação. Quantidades de BZF  $3,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> foram adicionadas na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte e 50  $\mu$ L de amostra. As recuperações obtidas variaram entre 94 % a 104 %, indicando, assim, que não houve interferência significativa da matriz das amostras nas determinações voltamétricas de BZF usando o MWCNTs-DHP/GCE.

#### 4.4.8 Estudo de interferentes em potencial

A interferência em potencial de alguns concomitantes (geralmente encontrados nas amostras comerciais) na resposta voltamétrica para a

determinação do BZF foi investigada. Para tal, medidas voltamétricas de redissolução anódica de onda quadrada foram feitas usando o MWCNTs-DHP/GCE tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) contendo cada concomitante estudado (álcool polivinílico, amido, metilcelulose e estearato de magnésio) na presença de BZF na proporção 1:10 e 1:1 de analito:concomitante. Entre as substâncias estudadas, nenhuma causou interferência significativa quando comparadas as intensidade de corrente de pico do BZF com e sem concomitantes, obtendo-se um RSD inferior a 5% para todas as medidas

#### 4.4.9 Análises das amostras

O teor de BZF foi determinado em quatro amostras adquiridas no comércio local contendo BZF na dosagem de 200 mg por comprimido. A Tabela 4.12 apresenta os resultados obtidos para os teores de BZF determinados pelo método voltamétrico usando o MWCNTs-DHP/GCE e por um método comparativo (espectrofotométrico)<sup>74</sup>.

**Tabela 4.12** Resultados da determinação de BZF em amostras comerciais aplicando-se o método voltamétrico proposto usando o MWCNTs-DHP/GCE e o método comparativo espectrofotométrico

Amostra	BZF (mg/comprimido)		Erro relativo <sup>b</sup> (%)
	espectrofotométrico <sup>a</sup>	Voltamétrico <sup>a</sup>	
A	212 ± 1	209 ± 2	-1,4
B	210 ± 2	204 ± 1	-2,9
C	209 ± 1	210 ± 2	0,5
D	211 ± 1	207 ± 1	-1,9

<sup>a</sup> n = 3 medidas;

<sup>b</sup> [100 × (método voltamétrico – método espectrofotométrico)] / método espectrofotométrico

Aplicou-se o teste *t* pareado<sup>79</sup> entre o método proposto e o método comparativo ( $t_{\text{exp}} = 2,4$  foi menor do que o valor  $t_{\text{critico}} = 3.18$ ,  $\alpha = 0.05$ ). Sendo assim, não há diferença significativa entre os teores de BZF obtidos empregando-se o método de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e aqueles obtidos empregando-se o método espectrofotométrico, a um nível de confiança de

95%. Ademais, os erros relativos encontrados estão entre  $-2,9\%$  e  $0,5\%$ , indicando uma boa exatidão do método proposto.

#### 4.4.10 Comparação com métodos descritos na literatura

O intervalo de concentração da curva analítica e o limite de detecção do obtidos empregando-se o método voltamétrico proposto utilizando o MWCNTs-DHP/GCE foram comparados com os resultados de outros trabalhos descritos na literatura empregando-se métodos distintos como HPLC e espectrofotometria. A Tabela 4.18 apresenta os resultados para os diferentes trabalhos, podendo-se observar que o método voltamétrico proposto neste trabalho de mestrado apresenta a melhor faixa linear e o menor limite de detecção.

**Tabela 4.13** Comparação dos resultados de faixa linear e limite de detecção para a determinação de BZF por diferentes técnicas citadas na literatura.

Método	Faixa linear (mol L <sup>-1</sup> )	Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )
<b>Eletroforese capilar</b> <sup>75</sup>	$5,5 \times 10^{-4} - 2,2 \times 10^{-3}$	-
<b>HPLC</b> <sup>72</sup>	$6,9 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-7}$
<b>HPLC</b> <sup>83</sup>	$2,8 \times 10^{-7} - 4,1 \times 10^{-5}$	-
<b>HPLC</b> <sup>74</sup>	$2,8 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-5}$	$6,4 \times 10^{-7}$
<b>Espectrofotometria</b> <sup>74</sup>	$6,9 \times 10^{-6} - 4,1 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-6}$
<b>Espectrofotometria</b> <sup>73</sup>	$1,7 \times 10^{-7} - 8,3 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-8}$
<b>Proposto</b>	$5,0 \times 10^{-8} - 9,1 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-8}$

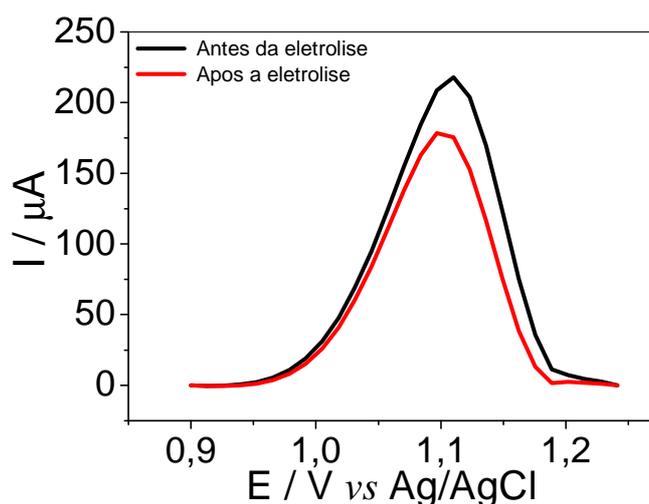
#### 4.5 Estudo eletroquímico do BZF

A seguir apresentar-se-ão os resultados obtidos da determinação do número de elétrons envolvidos na reação de eletrooxidação do BZF, o efeito da velocidade varredura de potencial e o valor do coeficiente de difusão usando as condições experimentais descritas, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) como eletrólito suporte

e tempo de pré-concentração de 180 s empregando-se um MWCNTs-DHP/GCE como eletrodo de trabalho

#### 4.5.1 Eletrólise do BZF

A eletrólise de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi estudada por cronoamperometria em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0), aplicando-se um potencial de 1,15 V durante 900 s e empregando-se o MWCNTs-DHP/GCE. A carga registrada no experimento foi de 9,49 mC e, usando-se as correntes de pico dos voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada (Figura 4.19) foi calculada uma variação do número de mol ( $\Delta N$ ) de  $5,1 \times 10^{-8} \text{ mol}$  (diferença entre a quantidade de matéria (mol) antes e após da eletrólise).

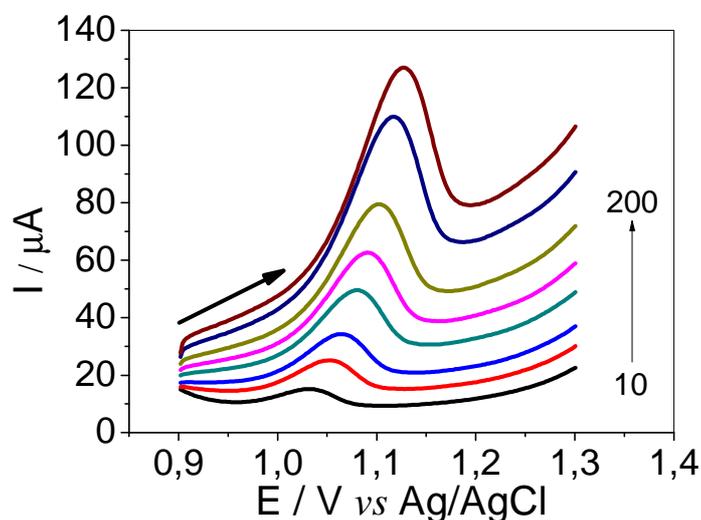


**Figura 4.18** Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0)  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 7 \text{ mV}$ , antes e após eletrólise do analito por 900 segundos aplicando um potencial de 1,15 V no MWCNTs-DHP/GCE.

O valor de  $\Delta N$  foi substituído na equação de Faraday (Eq. 3)<sup>79</sup> junto com o valor de  $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$  e foi calculado o número de elétrons envolvidos na oxidação deste analito sobre a superfície do eletrodo como sendo igual a 2.

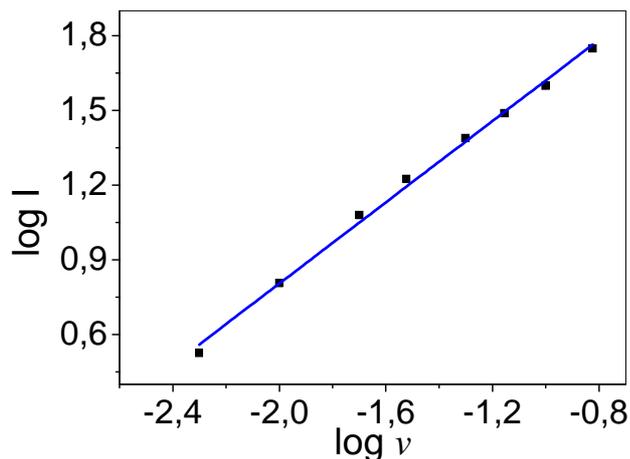
#### 4.5.2 Estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial

O efeito da velocidade de varredura de potencial na oxidação do BZF foi estudado com auxílio da voltametria linear na faixa de 10 a 200  $\text{mV s}^{-1}$ . A Figura 4.20 apresenta os voltamogramas de redissolução anódica linear registrados para diferentes velocidades de varredura de solução de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). Pode-se observar que a corrente de pico aumenta com o aumento da velocidade de varredura e que o valor do potencial de oxidação é deslocado para potenciais mais positivos, comportamento característico de sistemas redox irreversíveis<sup>80</sup>.



**Figura 4.19** Voltamogramas de redissolução anódica linear de BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) e em diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200  $\text{mV s}^{-1}$ ) usando o MWCNTs-DHP/GCE e tempo de pré-concentração de 5 minutos.

Para determinar se a oxidação do BZF na superfície do MWCNTs-DHP/GCE é um processo controlado pela adsorção das espécies na superfície do eletrodo ou controlado pela difusão das espécies, foi construído um gráfico que correlaciona o logaritmo do valor da corrente de pico de oxidação em função do logaritmo do valor da velocidade de varredura (Figura 4.21). Como pode ser observado nesta figura, uma dependência linear do logaritmo da corrente com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial com um coeficiente angular de aproximadamente 1, indica que o processo redox na superfície do eletrodo de trabalho é controlado por adsorção do analito na superfície do eletrodo<sup>80</sup>.



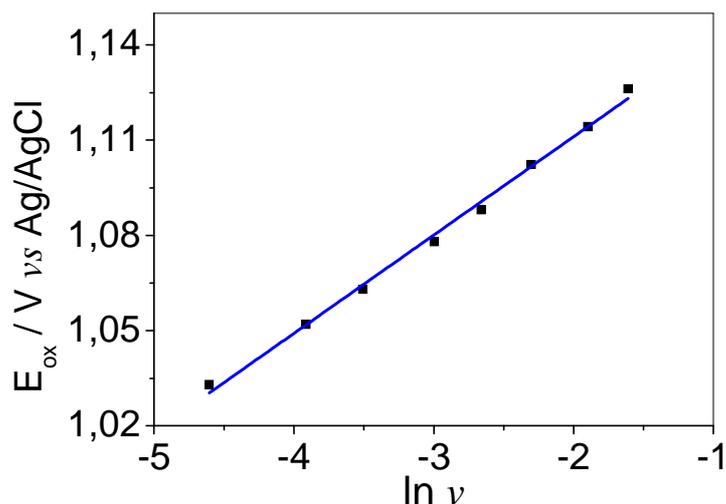
**Figura 4.20** Dependência linear de log I com log  $\nu$  para BZF  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> utilizando o MWCNTs-DHP/GCE.

#### 4.5.2.1 Cálculo do número de elétrons na etapa determinante da reação

O número de elétrons na etapa determinante da oxidação do BZF na superfície do MWCNTs-DHP/GCE foi calculado usando a equação de Laviron para sistemas irreversíveis (Eq 4)<sup>81</sup> que relaciona o potencial de oxidação com o logaritmo natural da velocidade de varredura de potencial. A Figura 4.22 apresenta o gráfico que relaciona  $E_{ox}$  em função do  $\ln \nu$ . Essa função foi linear de acordo com a seguinte equação:

$$E_{ox} = 1,165 + 0,029 \ln \nu; r = 0,998$$

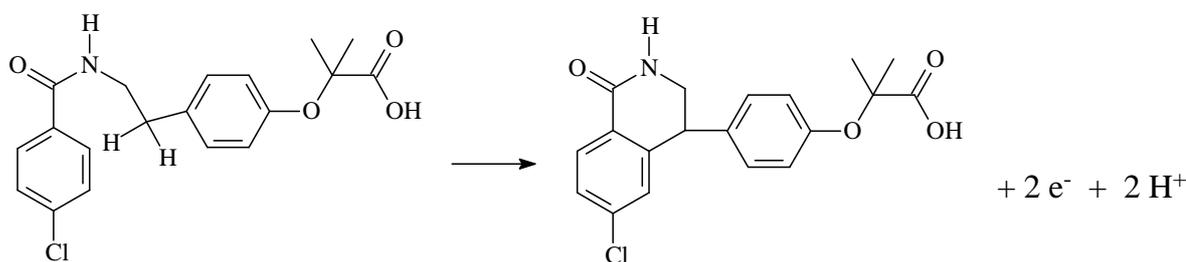
Assim, com o valor do coeficiente angular (0,029) e considerando  $T = 298$  K,  $R = 8.314$  J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, e  $F = 96485$  C mol<sup>-1</sup> o valor calculado para  $an$  foi de 0,89. Para moléculas orgânicas,  $\alpha$  é assumido como 0,5 e o valor do número de elétrons calculado foi de  $1,78 \approx 2$ .



**Figura 4.21** Dependência linear de  $E_{ox}$  com  $\ln v$  para BZF  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o MWCNTs-DHP/GCE.

#### 4.5.3 Reação de eletrooxidação do BZF sobre o MWCNTs-DHP/GCE

Os estudos da eletrólise do BZF indicam que a oxidação voltamétrica deste composto em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) envolve a transferência de dois elétrons por molécula oxidada. Levando-se em consideração esta informação e estudos prévios de degradação do BZF por fotofenton<sup>82</sup> foi proposto a reação de eletrooxidação do BZF sobre a superfície do eletrodo. Como pode ser observado na Figura 4.24, a reação de eletrooxidação do BZF envolve a perda de dois elétrons e dois prótons.



**Figura 4.22** Reação proposta para a eletrooxidação do BZF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) sobre o MWCNTs-DHP/GCE

## **CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

O uso do DHP na preparação de dispersões aquosas de MWCNTs permite melhorar a estabilidade das dispersões, assim como, melhorar a aderência do filme no eletrodo de carbono vítreo, uma vez que foi possível o uso do mesmo eletrodo para aproximadamente 50 medidas voltamétricas, com apenas uma perda de 5% do sinal analítico.

O aumento do sinal analítico bem como a diminuição no potencial de trabalho na determinação do GEN e BZF foi observado nos eletrodos de carbono vítreo modificados com MWCNTs, indicando que a presença dos MWCNTs melhora a resposta voltamétrica quando comparado com aquela do GCE, devido as propriedades dos MWCNTs como facilidade de transferência de elétrons e aumento da área superficial.

O eletrodo usado (MWCNTs-DHP/GCE) e a técnica de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada podem ser convenientemente usados para a quantificação de GEN e BZF em formulações farmacêuticas, com alta sensibilidade, baixos limites de detecção, facilidade de operação, além de pré-tratamento simples da amostra.

Os estudos realizados por voltametria cíclica do GEN usando como eletrodo de trabalho o MWCNTs-DHP/GCE e eletrólito suporte tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) permitiram concluir que este composto orgânico apresenta oxidação irreversível em 1,31 V, e envolve a transferência de dois elétrons por molécula oxidada.

O método voltamétrico proposto para a quantificação do GEN apresentou uma curva analítica de  $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $5,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Neste intervalo de concentrações, as determinações do teor do GEN em amostras farmacêuticas comerciais foram realizadas com sucesso e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se um método de referência (HPLC) apresentando erros que variaram entre  $-1,9$  a  $0,7 \%$  e nível de confiança de 95%.

O comportamento voltamétrico do BZF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) foi estudado por voltametria cíclica e utilizando como eletrodo de trabalho o MWCNTs-DHP/GCE. Os resultados indicam uma reação de oxidação irreversível do BZF em 1,09 V com a transferência de dois elétrons por molécula oxidada.

A faixa linear de trabalho para a quantificação do BZF usando o método voltamétrico proposto foi de  $5,0 \times 10^{-8}$  a  $9,1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> com limite de detecção de  $1,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Assim, as quantificações do teor de BZF foram realizadas com sucesso em amostras farmacêuticas comerciais com erros que variaram entre -2,9 e 0,5 % quando comparadas com o método espectrofotométrico, a um nível de confiança de 95%.

O método voltamétrico proposto para a determinação do BZF apresenta a melhor faixa linear e o menor limite de detecção quando comparado com aqueles trabalhos descritos na literatura

# **CAPÍTULO 6 – ALGUMAS PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS**

## **6 ALGUMAS PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS**

Aplicar o MWCNTs-DHP/GCE na determinação do GEN ou BZF em amostras biológicas como urina e soro sanguíneo.

Aplicar o eletrodo de trabalho estudado na determinação de outros fármacos e em outras configurações de célula eletroquímica como em sistemas de análises em fluxo.

Estudar outros compostos poliméricos para o desenvolvimento de novos eletrodos contendo os MWCNTs imobilizados na superfície de um eletrodo de carbono vítreo.

Com o auxílio de outras técnicas como cromatografia, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, caracterizar os produtos da eletrólise de GEN e BZF, respectivamente.

# **CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NIU, H.; CHEN, X.-Q.; WANG, S.; LI, D.; MAO, W.L. & LI, Y., "Families of superhard crystalline carbon allotropes constructed via cold compression of graphite and nanotubes". *Phys. Rev. Lett.* **108**(13): 135501, 2012.
2. HIRSCH, A., "The era of carbon allotropes". *Nat. Mater.* **9**(11): 868, 2010.
3. DEMBINSKI, R.; BARTIK, T.; BARTIK, B.; JAEGER, M. & GLADYSZ, J.A., "Toward metal-capped one-dimensional carbon allotropes: Wirelike C-6-C-20 polyynediyl chains that span two redox-active (eta(5)-C5Me5)Re(NO)(PPh3) endgroups". *J. Am. Chem. Soc.* **122**(5): 810, 2000.
4. MEDEIROS, R.A.; ROCHA, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode". *Food Chem.* **123**(3): 886, 2010.
5. SARTORI, E.R.; TAKEDA, H.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film for the voltammetric determination of sulfite in foods". *Electroanalysis.* **23**(11): 2526, 2011.
6. TIAN, X.Q.; CHENG, C.M.; YUAN, H.Y.; DU, J.; XIAO, D.; XIE, S.P. & CHOI, M.M.F., "Simultaneous determination of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles-beta-cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry". *Talanta.* **93**: 79, 2012.
7. TEIXEIRA, M.F.S.; MARCOLINO, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O.; MORAES, F.C. & NUNES, R.S., "Determination of analgesics (dipyron and acetaminophen) in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry at a copper(II) hexacyanoferrate(III) modified carbon paste electrode". *Curr. Anal. Chem.* **5**(4): 303, 2009.
8. SCHNORR, J.M. & SWAGER, T.M., "Emerging applications of carbon nanotubes". *Chem. Mat.* **23**(3): 646, 2011.

9. WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C. & COMPTON, R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis". *Microchim. Acta.* **152**(3-4): 187, 2006.
10. KAVAN, L.; RAPTA, P.; DUNSCH, L.; BRONIKOWSKI, M.J.; WILLIS, P. & SMALLEY, R.E., "Electrochemical tuning of electronic structure of single-walled carbon nanotubes: In-situ Raman and vis-NIR study". *J. Phys. Chem. B.* **105**(44): 10764, 2001.
11. WONG, E.W.; SHEEHAN, P.E. & LIEBER, C.M., "Nanobeam mechanics: Elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes". *Science.* **277**(5334): 1971, 1997.
12. JISHI, R.A.; VENKATARAMAN, L.; DRESSELHAUS, M.S. & DRESSELHAUS, G., "Symmetry properties of chiral carbon nanotubes". *Phys. Rev. B.* **51**(16): 11176, 1995.
13. IJIMA, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature.* **354**(6348): 56, 1991.
14. ZHAO, X.L.; WANG, M.; OHKOHCHI, M. & ANDO, Y., "Morphology of carbon nanotubes prepared by carbon arc". *Jpn J Appl Phys 1.* **35**(8): 4451, 1996.
15. DOUVEN, S.; PIRARD, S.L.; HEYEN, G.; TOYE, D. & PIRARD, J.P., "Kinetic study of double-walled carbon nanotube synthesis by catalytic chemical vapour deposition over an Fe-Mo/MgO catalyst using methane as the carbon source". *Chem Eng J.* **175**: 396, 2011.
16. LI, M.W.; HU, Z.; WANG, X.Z.; WU, Q.A.; LU, Y.N. & CHEN, Y., "Synthesis of carbon nanotube array using corona discharge plasma-enhanced chemical vapor deposition". *Chinese Sci Bull.* **48**(6): 534, 2003.
17. SEE, C.H. & HARRIS, A.T., "A review of carbon nanotube synthesis via fluidized-bed chemical vapor deposition". *Ind Eng Chem Res.* **46**(4): 997, 2007.
18. ZHANG, Y.H.; QIN, Y.H.; SUN, X.; ZHANG, J.Y. & JING, C.B., "Synthesis of carbon nanotube using cesium carbonate catalyst by chemical vapor deposition". *Mater Lett.* **62**(21-22): 3776, 2008.

19. LI, Y.L.; KINLOCH, I.A. & WINDLE, A.H., "Direct spinning of carbon nanotube fibers from chemical vapor deposition synthesis". *Science*. **304**(5668): 276, 2004.
20. DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TASIS, D.; SIOKOU, A.; KALLITSIS, I. & GALIOTIS, C., "Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes". *Carbon*. **46**(6): 833, 2008.
21. BALASUBRAMANIAN, K. & BURGHARD, M., "Chemically functionalized carbon nanotubes". *Small*. **1**(2): 180, 2005.
22. JANEGITZ, B.C.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; CAMPANA, S.P.; FARIA, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan". *Sens. Actuators B: Chem.* **142**(1): 260, 2009.
23. KIM, B. & SIGMUND, W.M., "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir*. **20**(19): 8239, 2004.
24. BEKYAROVA, E.; DAVIS, M.; BURCH, T.; ITKIS, M.E.; ZHAO, B.; SUNSHINE, S. & HADDON, R.C., "Chemically functionalized single-walled carbon nanotubes as ammonia sensors". *J Phys Chem B*. **108**(51): 19717, 2004.
25. RAJAVEL, K.; MINITHA, C.R.; RANJITH, K.S. & KUMAR, R.T.R., "Recent Progress on the Synthesis and Applications of Carbon Based Nanostructures". *Recent Pat. Nanotechnology*. **6**(2): 99, 2012.
26. MANZETTI, S. & ANDERSEN, O., "Toxicological aspects of nanomaterials used in energy harvesting consumer electronics". *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**(4): 2102, 2012.
27. SHARIFI, S.; BEHZADI, S.; LAURENT, S.; FORREST, M.L.; STROEVE, P. & MAHMOUDI, M., "Toxicity of nanomaterials". *Chem. Soc. Rev.* **41**(6): 2323, 2012.
28. BAKAND, S.; HAYES, A. & DECHSAKULTHORN, F., "Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure". *Inhal. Toxicol.* **24**(2): 125, 2012.

29. KNYAZEV, A.; LOUISE, L.; VEBER, M.; LANGEVIN, D.; FILORAMO, A.; PRINAMELLO, A. & CAMPIDELLI, S., "Selective adsorption of proteins on single-wall carbon nanotubes by using a protective surfactant". *Chem.-Eur. J.* **17**(51): 14663, 2011.
30. ALLOY, M.M. & ROBERTS, A.P., "Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction". *Ecotox. Environ. Safe.* **74**(7): 1839, 2011.
31. HORIE, M.; KATO, H.; FUJITA, K.; ENDOH, S. & IWAHASHI, H., "In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles". *Chem. Res. Toxicol.* **25**(3): 605, 2012.
32. ZHAO, J.S. & CASTRANOVA, V., "Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine". *J. Toxicol. Env. Health-Pt b-Crit. Rev.* **14**(8): 593, 2011.
33. FRANCHI, L.P.; SANTOS, R.A.; MATSUBARA, E.Y.; DE LIMA, J.C.; ROSOLEN, J.M. & TAKAHASHI, C.S., "Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanotubes". *Quim. Nova.* **35**(3): 571, 2012.
34. SAEED, K., "Review on properties, dispersion and toxicology of carbon nanotubes". *J. Chem. Soc. Pak.* **32**(4): 559, 2010.
35. CICCHETTI, R.; DIVIZIA, M.; VALENTINI, F. & ARGENTIN, G., "Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: Geno-cytotoxic risk". *Toxicol. Vitro.* **25**(8): 1811, 2011.
36. XU, G.H.; ZHENG, C.; ZHANG, Q.; HUANG, J.Q.; ZHAO, M.Q.; NIE, J.Q.; WANG, X.H. & WEI, F., "Binder-free activated carbon/carbon nanotube paper electrodes for use in supercapacitors". *Nano Res.* **4**(9): 870, 2011.
37. LIU, H.J.; YANG, D.W. & LIU, H.H., "A hydrogen peroxide sensor based on the nanocomposites of poly(brilliant cresyl blue) and single walled-carbon nanotubes". *Anal. Methods.* **4**(5): 1421, 2012.
38. ZHANG, Y.; YUAN, R.; CHAI, Y.Q.; WANG, J.F. & ZHONG, H.A., "Amperometric biosensor for nitrite and hydrogen peroxide based on hemoglobin immobilized on

- gold nanoparticles/polythionine/platinum nanoparticles modified glassy carbon electrode". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**(4): 570, 2012.
39. JANEGITZ, B.C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; BRETT, C.M.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film". *Sens. Actuators B: Chem.* **158**(1): 411, 2011.
40. ZENG, Y.B.; YU, D.J.; YU, Y.Y.; ZHOU, T.S. & SHI, G.Y., "Differential pulse voltammetric determination of methyl parathion based on multiwalled carbon nanotubes-poly(acrylamide) nanocomposite film modified electrode". *J. Hazard. Mater.* **217**: 315, 2012.
41. LIU, G.Z.; WANG, S.; LIU, J.Q. & SONG, D.D., "An Electrochemical immunosensor based on chemical assembly of vertically aligned carbon nanotubes on carbon substrates for direct detection of the pesticide endosulfan in environmental water". *Anal. Chem.* **84**(9): 3921, 2012.
42. AFKHAMI, A. & GHAEDI, H., "Multiwalled carbon nanotube paste electrode as an easy, inexpensive and highly selective sensor for voltammetric determination of Risperidone". *Anal. Methods.* **4**(5): 1415, 2012.
43. TAVANA, T.; KHALILZADEH, M.A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A.A.; BEITOLLAHI, H. & ZAREYEE, D., "Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode". *J. Mol. Liq.* **168**: 69, 2012.
44. BAI, L.; WEN, D.; YIN, J.Y.; DENG, L.; ZHU, C.Z. & DONG, S.J., "Carbon nanotubes-ionic liquid nanocomposites sensing platform for NADH oxidation and oxygen, glucose detection in blood". *Talanta.* **91**: 110, 2012.
45. WANG, H.S.; LI, T.H.; JIA, W.L. & XU, H.Y., "Highly selective and sensitive determination of dopamine using a Nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode". *Biosens. Bioelectron.* **22**(5): 664, 2006.
46. YIN, T.J.; WEI, W.Z. & ZENG, J.X., "Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid by use of glassy-carbon electrodes modified with both

- polyaniline film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated beta-cyclodextrin". *Anal. Bioanal. Chem.* **386**(7-8): 2087, 2006.
47. YI, H.C.; ZHENG, D.Y.; HU, C.G. & HU, S.S., "Functionalized multiwalled carbon nanotubes through in situ electropolymerization of brilliant cresyl blue for determination of epinephrine". *Electroanalysis.* **20**(10): 1143, 2008.
48. SUN, D.; XIE, X.F.; CAI, Y.P.; ZHANG, H.J. & WU, K.B., "Voltammetric determination of Cd<sup>2+</sup> based on the bifunctionality of single-walled carbon nanotubes-Nafion film". *Anal. Chim. Acta.* **581**(1): 27, 2007.
49. ZENG, B.Z.; WEI, S.H.; XIAO, F. & ZHAO, F.Q., "Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode". *Sens. Actuator B-Chem.* **115**(1): 240, 2006.
50. ZHANG, Z. & RUSLING, J.F., "Electron transfer between myoglobin and electrodes in thin films of phosphatidylcholines and dihexadecylphosphate". *Biophys. Chem.* **63**(2-3): 133, 1997.
51. WEN, X.Q.; FEI, J.J.; CHEN, X.M.; YI, L.H.; GE, F. & HUANG, M.H., "Electrochemical analysis of trifluralin using a nanostructuring electrode with multi-walled carbon nanotubes". *Environ. Pollut.* **156**(3): 1015, 2008.
52. WEI, Y.L.; SHAO, C. & LIU, J.B., "Voltammetric determination of ethamsylate in bulk solution and pharmaceutical tablet by nano-material composite-film coated electrode". *Mater. Sci Eng. C.* **29**(8): 2442, 2009.
53. ABOURBIH, S.; FILION, K.B.; JOSEPH, L.; SCHIFFRIN, E.L.; RINFRET, S.; POIRIER, P.; PILOTE, L.; GENEST, J. & EISENBERG, M.J., "Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: A systematic review". *Am. J. Med.* **122**(10): 962, 2009.
54. TAKEDA, H.H.; JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; MATTOSO, L.H.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Sensor Actuat B-Chem.* **161**(1): 755, 2012.

55. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. & GILMAN, A.G., *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 12 ed. 2010, New York: McGraw-Hill.
56. CARTER BORGESA, N.; DUARTE MENDES, G.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R.E.; ZAPPIB, E.; DUARTE MENDES, F. & NUCCIA, G., "Comparative bioavailability study with two gemfibrozil tablet formulations in healthy volunteers". *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **55**(7): 382, 2005.
57. R GAUR; M AZIZI; J GAN; P HANSAL; K HARPER; R MANNAN; A PANCHAL; K PATEL; M PATEL; N PATEL; J RANA & ROGOWSKA, A., *British Pharmacopoeia Volume I & II*. 1 ed. Vol. 1. 2009, London.
58. ULU, S.T., "LC determination of gemfibrozil in tablets". *Chromatographia.* **64**(7-8): 447, 2006.
59. SU, L.N.; GUO, J.W.; XIA, H.M.; LIU, G.M.; CHEN, J. & JIANG, X.G., "LC Determination and pharmacokinetic study of gemfibrozil in human plasma". *Chromatographia.* **71**(9-10): 833, 2010.
60. TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G. & RIGAS, P., "Automated zone-sampling dilution by coupling sequential injection analysis to high-throughput HPLC for the direct determination of gemfibrozil". *J Sep Sci.* **32**(15-16): 2819, 2009.
61. ROWER, J.E.; BUSHMAN, L.R.; HAMMOND, K.P.; KADAM, R.S. & AQUILANTE, C.L., "Validation of an LC/MS method for the determination of gemfibrozil in human plasma and its application to a pharmacokinetic study". *Biomed Chromatogr.* **24**(12): 1300, 2010.
62. NAKAGAWA, A.; SHIGETA, A.; IWABUCHI, H.; HORIGUCHI, M.; NAKAMURA, K. & TAKAHAGI, H., "Simultaneous determination of gemfibrozil and its metabolites in plasma and urine by a fully automated high-performance liquid-chromatographic system". *Biomed Chromatogr.* **5**(2): 68, 1991.
63. SOLIMAN, M.A.; PEDERSEN, J.A. & SUFFET, I.H., "Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water". *J. Chromatogr. A.* **1029**(1-2): 223, 2004.

64. RANDINITIS, E.J.; KINKEL, A.W.; NELSON, C. & PARKER, T.D., "Gas-chromatographic determination of gemfibrozil and its metabolites and plasma and urine". *J. Chromatogr.* **307**(1): 210, 1984.
65. MANZOORI, J.L. & AMJADI, M., "Spectrofluorimetric and micelle-enhanced spectrofluorimetric methods for the determination of gemfibrozil in pharmaceutical preparations". *J. Pharm. Biomed.* **31**(3): 507, 2003.
66. ROADCAP, B.A.; MUSSON, D.G.; ROGERS, J.D. & ZHAO, J.J., "Sensitive method for the quantitative determination of gemfibrozil in dog plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. B.* **791**(1-2): 161, 2003.
67. XU, F.; SUN, L.X.; MATSUDA, N.; OKADA, T.; TAN, Z.C. & LIANG, J.G., "The study on a PVC membrane electrode for gemfibrozil". *Biol. Pharm. Bull.* **25**(2): 165, 2002.
68. XU, M.T.; SONG, J.F.; GUO, W. & LI, N., "Polarographic behavior of gemfibrozil in the presence of dissolved oxygen and its analytical application". *Electroanalysis.* **16**(12): 1038, 2004.
69. KUBLIN, E.; KACZMARSKA-GRACZYK, B.; MALANOWICZ, E. & MAZUREK, A.P., "Methods of chromatographic determination of medicines decreasing the level of cholesterol". *Acta Pol. Pharm.* **67**(5): 455, 2010.
70. ANCHISI, C.; FADDA, A.M.; MACCIONI, A.M. & DESSI, S., "Determination of bezafibrate concentration by high performance liquid-chromatography in serum of rats treated with lead nitrate". *Farmaco.* **53**(10-11): 690, 1998.
71. DE MELO, J.; HURTADO, F.K.; POITEVIN, F.S.; FLORES, F.C.; ZIMMERMANN, E.S.; DALMORA, S.L. & ROLIM, C.M.B., "HPLC determination of bezafibrate in human plasma and its application to pharmacokinetics studies". *J. Chromatogr. Sci.* **48**(5): 362, 2010.
72. MASNATTA, L.D.; CUNIBERTI, L.A.; REY, R.H. & WERBA, J.P., "Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. B.* **687**(2): 437, 1996.

73. KREBS, A.; STARCZEWSKA, B. & LESZCZYNSKA, E., "Spectrophotometric determination of bezafibrate by ternary complex formation with palladium(II) chloride and eosin". *Anal Lett.* **39**(12): 2453, 2006.
74. DE MELO, J.; HURTADO, F.K.; PRADO, A.W.; SOUZA, M.J.E. & ROLIM, C.M.B., "Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations". *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **31**(2): 269, 2008.
75. KOMSTA, Ł.; MISZTAL, G.; MAJCHRZAK, E. & HAUZER, A., "Separation of fibrate-type antihyperlipidemic drugs by capillary electrophoresis and their quantitation in pharmaceuticals". *J. Pharm. Biom. Anal.* **41**(2): 408, 2006.
76. UKUMARA, F., *Estudo Voltamétrico e desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana*, in Instituto de Química de São Carlos. 2009, Univesidad de São Paulo: São Paulo. p. 56.
77. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* ed. INC, J.W.S. 2001, New York,.
78. MILLER, J.C. & MILLER, J.N., *Statistics for analytical chemistry*. 3 ed. 1993, New York: Prentice Hall.
79. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. & CROUCH, S.R., *Fundamentals of analytical chemistry*. 8 ed. 2000, US: Brooks Cole.
80. GROSSER, D.K., *Cyclic voltammetry simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1994, New York: VCH Publisher.
81. LAVIRON, E., "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems". *J. Electroanal. Chem.* **101**(1): 19, 1979.
82. RAZAVI, B.; SONG, W.H.; COOPER, W.J.; GREAVES, J. & JEONG, J., "Free-radical-induced oxidative and reductive degradation of fibrate pharmaceuticals: kinetic studies and degradation mechanisms". *J. Phys. Chem. A.* **113**(7): 1287, 2009.

83. ZHANG, W.; XIANG, B.R.; ZHAN, Y.; YU, L.Y.; WANG, T. & WANG, C.Y., "HPLC method for the determination of bezafibrate in human plasma and application to a pharmacokinetic study of bezafibrate dispersible tablet". *J. Chromatogr. Sci.* **46**(10): 844, 2008.