

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

**Eletrodos voltamétricos à base de nanotubos de carbono
verticalmente alinhados aplicados na determinação de
estatinas em formulações farmacêuticas e fluidos
biológicos**

Tiago Almeida Silva*

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

*** Bolsista CNPq**

SÃO CARLOS

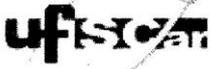
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586ev Silva, Tiago Almeida
Eletrodos voltamétricos à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados aplicados na determinação de estatinas em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos / Tiago Almeida Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
85 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Eletroanalítica. 2. Nanotubos de carbono. 3. Óxido de grafeno. 4. Estatinas. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Tiago Almeida Silva, realizada em 20/02/2015:

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
UFSCar

Prof. Dr. Evaldo José Corat
INPE

Prof. Dr. Lúcio Angnes
USP

Aos meus pais, Cleiton e Selmes, pelos seus preciosos ensinamentos que me tornaram um ser humano capaz de encarar a vida como ela é, e por também jamais medirem esforços e sacrifícios para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu irmão Marcos, que mesmo distante muito me motivou pelos seus inúmeros exemplos de dedicação e superação.

À Katia, por todo seu amor, carinho e companhia que tornou esta jornada mais prazerosa.

Amo vocês!

DEDICO

“A personalidade criadora deve pensar e julgar por si mesma, porque o progresso moral da sociedade depende exclusivamente da sua independência.”

Albert Einstein

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio têm qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Aos meus pais, Cleiton e Selmes, pela confiança em mim depositada e todo amor e carinho;

À Katia pelo seu carinho, paciência e companheirismo em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pela oportunidade de ingresso em seu grupo de pesquisa, orientação e ensinamentos concedidos durante o período de mestrado;

Ao Prof. Dr. Evaldo José Corat e Dr. Hudson Giovani Zanin do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) pela disponibilização das amostras de nanotubos de carbono verticalmente alinhados devidamente caracterizadas, e também pela pronta disponibilidade de ambos para discussão de resultados e excelentes contribuições durante a preparação dos manuscritos;

Ao Dr. Fernando Campanhã Vicentini pela sua paciência, prontidão na organização das etapas experimentais, discussão de resultados e amizade;

Aos colegas do LABBES, pelos momentos de discussão científica e também de descontração: Ademar, Anderson, Alana, Barbara, Bruna, Cássio, Cláudia, Elson, Fernando (Avaré), Gisela, Gustavo, Laís, Luiz (Cyber), Marina, Osmundo, Patrícia, Roberta, Thiago Guerreiro e Vagner;

Aos Professores do Departamento de Química da UFSCar pelos seus ensinamentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar por fornecer todo o suporte necessário para o meu bom desenvolvimento acadêmico;

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

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATOR	Atorvastatina cálcica
BDD	Diamante dopado com coró (<i>Boron-doped diamond</i>)
BPPG	Grafite pirolítico de plano basal (<i>Basal-plane pyrolytic graphite</i>)
BR	Tampão Britton-Robinson
CNTs	Nanotubos de carbono (<i>Carbon nanotubes</i>)
CPE	Eletrodo de pasta de carbono (<i>Carbon paste electrode</i>)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>)
DPAdASV	Voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial (<i>Differential pulse adsorptive anodic stripping voltammetry</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (<i>Differential pulse voltammetry</i>)
EPPG	Grafite pirolítico de plano de borda (<i>Edge-plane pyrolytic graphite</i>)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (<i>Glassy carbon electrode</i>)
HMDE	Eletrodo de gota pendente de mercúrio (<i>Hanging mercury drop electrode</i>)
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-Coenzima A
HOPG	Grafite pirolítico altamente orientado (<i>Highly ordered pyrolytic graphite</i>)
LSV	Voltametria de varredura linear (<i>Linear sweep voltammetry</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (<i>Multi-walled carbon nanotubes</i>)
MWCVD	Deposição química de vapor assistida por microondas

	<i>(Microwave chemical vapor deposition)</i>
PPY	Polipirrol (<i>Polypyrrole</i>)
ROS	Rosuvastatina cálcica
RSD	Desvio-padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
sccm	Centímetro cúbico padrão por minuto (<i>Standard cubic centimeters per minute</i>)
SWAdASV	Voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada (<i>Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetry</i>)
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples (<i>Single-walled carbon nanotubes</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square-wave voltammetry</i>)
VACNT	Nanotubos de carbono verticalmente alinhados (<i>Vertically aligned carbon nanotubes</i>)
VACNT-GO	Nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno (<i>Vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide</i>)
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (<i>X-Ray photoelectron spectroscopy</i>)
α	Coefficiente de transferência de carga
E°	Potencial formal
E_p	Potencial de pico
I_p	Corrente de pico
k° e k_s	Constante de transferência heterogênea de elétrons
n	Número de elétrons
pH_{cond}	pH condicional
ν	Velocidade de varredura
Ψ	Parâmetro cinético da equação de Nicholson

Lista de Tabelas

TABELA 4.1 - Comparação entre as áreas das bandas extraídas dos espectros Raman obtidos para as amostras de VACNT e VACNT-GO.....	29
TABELA 4.2 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica e catódica em função de $v^{1/2}$	35
TABELA 4.3 - Parâmetros experimentais estudados para as técnicas de SWAdASV e DPAdASV e os respectivos valores selecionados para a determinação de ATOR.....	49
TABELA 4.4 - Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de ATOR utilizando as técnicas de SWAdASV e DPAdASV.....	51
TABELA 4.5 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o procedimento voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de VACNT-GO e para outros procedimentos eletroanalíticos reportados na literatura.....	53
TABELA 4.6 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de ATOR a um nível de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	55
TABELA 4.7 - Resultados obtidos para os estudos de adição e recuperação de ATOR em amostras de formulações farmacêuticas.....	56
TABELA 4.8 - Determinação de ATOR em três amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (<i>P</i>) e comparativo (<i>C</i>) (n = 3).....	57
TABELA 4.9 - Resultados obtidos para a determinação voltamétrica de ATOR em amostras biológicas sintéticas de urina e soro humano (n = 3).....	57
TABELA 4.10 - Parâmetros experimentais estudados para as técnicas de SWAdASV e DPAdASV e os respectivos valores selecionados para a determinação de ROS.....	70
TABELA 4.11 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o procedimento voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de VACNT-GO e para outros procedimentos eletroanalíticos reportados na literatura.....	72

TABELA 4.12 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de ROS a um nível de concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	74
TABELA 4.13 - Resultados obtidos para os estudos de adição e recuperação de ROS em amostras de formulações farmacêuticas	75
TABELA 4.14 - Determinação de ROS em duas amostras farmacêuticas pelos métodos voltamétrico proposto (<i>P</i>) e comparativo (<i>C</i>) ($n = 3$).....	76
TABELA 4.15 - Resultados obtidos para a determinação voltamétrica de ROS em amostras biológicas sintéticas de urina e soro humano ($n = 3$).....	76

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Representação esquemática de um (a) SWCNT e (b) MWCNT..	2
FIGURA 1.2 - Representação esquemática dos mecanismos de crescimento orientado dos CNTs preparados por CVD (a) tipo “raiz” e (b) tipo “ponta”	5
FIGURA 1.3 - Representação das regiões <i>basal-plane</i> e <i>edge-plane</i> de um (a) SWCNT e (b) HOPG (Adaptado de Ref. 27).....	7
FIGURA 1.4 - Estrutura química da molécula de (a) atorvastatina cálcica e (b) rosuvastatina cálcica.....	13
FIGURA 3.1 - Esquema geral de montagem dos eletrodos de trabalho de VACNT-GO.	19
FIGURA 4.1 - Imagens de MEV obtidas dos filmes de (a-e) VACNT-GO e (f) VACNT.	26
FIGURA 4.2 - (a) Espectros Raman de primeira e segunda ordem registrados para amostras de (b) VACNT e (c) VACNT-GO.	28
FIGURA 4.3 - Espectro XPS (C1s) obtido para a amostra de VACNT (a) antes e (c) após o tratamento por plasma de oxigênio. Espectro XPS (O1s) obtido para a amostra de VACNT (b) antes e (d) após o tratamento por plasma de oxigênio.	31
FIGURA 4.4 - Imagens de microscopia ótica (ampliação de 200 vezes) do ângulo de contato entre a água deionizada e a amostra de (a) VACNT e (b) VACNT-GO.	32
FIGURA 4.5 - Voltamograma cíclico ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtido para uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se o eletrodo de VACNT-GO.	33
FIGURA 4.6 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ($10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$) para o eletrodo de VACNT-GO em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (b) Gráfico com o registro de I_p vs. $v^{1/2}$ para correntes de pico anódica (I_a) e catódica (I_c).	35

FIGURA 4.7 - Dependência entre a separação dos potenciais de pico (ΔE_p) e a velocidade de varredura (v).....	36
FIGURA 4.8 - Gráfico de Ψ vs. $32,79 v^{-1/2}$ obtido para o eletrodo de VACNT-GO em solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	38
FIGURA 4.9 - Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de VACNT-GO.	39
FIGURA 4.10 - Voltamograma cíclico obtido para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH_{\text{cond}} = 2,0$) contendo 20% (v/v) de metanol, usando o eletrodo de VACNT-GO e um GCE. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. “Branco” se refere ao voltamograma registrado para a mistura tampão/metanol na ausência do composto ATOR.....	41
FIGURA 4.11 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em diferentes eletrólitos suporte contendo 20% (v/v) de metanol: (a) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH_{\text{cond}} = 4,5$); (b) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (c) H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; (d) tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH_{\text{cond}} = 4,5$); (e) Tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH_{\text{cond}} = 4,5$) e (f) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de VACNT-GO. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido as curvas de E_p e I_p vs. eletrólito suporte.....	42
FIGURA 4.12 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (20% v/v metanol) a diferentes pHs condicionais usando o eletrodo de VACNT-GO. Inserido E_p vs. pH e I_p vs. pH. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	44
FIGURA 4.13 - Reação de eletrooxidação proposta para a molécula de ATOR (Adaptado da Ref. ⁴⁴).....	44
FIGURA 4.14 - Efeito do (a) potencial de pré-concentração e (b) do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico anódica para a determinação de ATOR.	45

- FIGURA 4.15 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 20% (v/v) de metanol ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$) em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 75 (g) 100 (h) 150 e (i) 200 mV s^{-1} . (b) Gráfico de $\log I_p$ versus $\log v$. (c) Variação de (E_p) versus $\ln v$ 48
- FIGURA 4.16 - (a) Voltamogramas de SWAdAS obtidos para diferentes concentrações de ATOR: (a) 0,00; (b) 0,20; (c) 0,49; (d) 0,69; (e) 0,99; (f) 1,96; (g) 2,91 e (h) $3,85 \mu\text{mol L}^{-1}$. (Inserida a curva analítica obtida). (b) Voltamogramas de DPAdAS obtidos para diferentes concentrações de ATOR: (a) 0,00; (b) 0,09; (c) 0,20; (d) 0,50; (e) 0,69; (f) 0,98; (g) 1,94; (h) 2,89 e (i) $3,81 \mu\text{mol L}^{-1}$. (Inserida a curva analítica obtida). 50
- FIGURA 4.17 - Voltamogramas de SWAdAS e DPAdAS obtidos em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 20% (v/v) de metanol ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$)..... 51
- FIGURA 4.18 - Voltamograma cíclico obtido para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$), usando o eletrodo de VACNT-GO e um GCE. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. “Branco” se refere ao voltamograma registrado para o tampão fosfato na ausência do composto ROS. Inserido encontra-se os voltamogramas cíclicos obtidos para o GCE ampliados.59
- FIGURA 4.19 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em diferentes eletrólitos suporte: (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (b) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$); e (c) Tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido as curvas de E_p e I_p vs. eletrólito suporte..... 60
- FIGURA 4.20 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a diferentes pHs usando o eletrodo de VACNT-GO. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido os gráficos de E_p vs. pH e I_p vs. pH. 61

FIGURA 4.21 - Efeito do (a) potencial de pré-concentração e (b) do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico anódica para a determinação de ROS.	63
FIGURA 4.22 - Gráfico de E_p versus logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nas medidas de SWV.....	65
FIGURA 4.23 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0) em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 75 (g) 100 (h) 150 e (i) 200 mV s^{-1} . (b) Gráfico de $\log I_p$ versus $\log v$. (c) Variação da corrente de pico (I_p) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).	66
FIGURA 4.24 - Variação do logaritmo natural da corrente de pico ($\log I_p$) em função da diferença entre $E_p - E^{o'}$	68
FIGURA 4.25 - Mecanismo de eletrooxidação proposto para a molécula de ROS.	69
FIGURA 4.25 - Voltamogramas de SWAdAS obtidos para diferentes concentrações de ROS: (a) 0,0; (b) 0,48; (c) 1,9; (d) 4,7; (e) 9,4; (f) 14,1; (g) 18,8; (h) 23,5; (i) 28,1; (j) 32,8, (k) 37,4, (l) 42,1 e (m) $46,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Inserida a curva analítica obtida.	71

Resumo

ELETRODOS VOLTAMÉTRICOS À BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO VERTICALMENTE ALINHADOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTATINAS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS – Neste trabalho, a aplicação de eletrodos à base de um compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno (VACNT-GO, do inglês “Vertically Aligned Carbon Nanotubes and Graphene Oxide”) como sensor eletroquímico para a determinação de fármacos da classe das estatinas foi explorada. O compósito de VACNT-GO foi sintetizado empregando-se o método de deposição química de vapor assistido por microondas (MWCVD, do inglês “Microwave Chemical Vapour Deposition”) seguido de um tratamento por plasma de oxigênio. Utilizando-se microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, espectroscopia Raman e espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio-X, foi possível observar a exposição de folhas de grafeno funcionalizadas com grupos oxigenados (óxido de grafeno) nas pontas dos VACNT após o tratamento por plasma de oxigênio. O teor de oxigênio aumentou de 4,9% para a amostra de VACNT para 21,4% no caso da amostra de VACNT-GO. Além disso, a razão C:O foi igual a aproximadamente 1,5 para a amostra de VACNT-GO, em concordância com os teores previstos para óxido de grafeno. Ademais, por meio de medidas do ângulo de contato com a água destilada, foi notada uma mudança drástica da molhabilidade da superfície das amostras, passando de super-hidrofóbicas para os VACNT (ângulo de contato = 157°) para super-hidrofílicas para os VACNT-GO (ângulo de contanto $\approx 0^\circ$), potencializando a aplicação eletroquímica do material em sistemas aquosos. A partir de estudos de voltametria cíclica conduzidos para a sonda de hexacianoferrato (III) de potássio, foi diagnosticada uma área eletroativa equivalente a aproximadamente 80% da área geométrica e uma elevada constante de transferência heterogênea

de elétrons ($3,4 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$) para o eletrodo de VACNT-GO, mostrando o bom desempenho eletroquímico do material eletródico proposto. Em seguida, métodos voltamétricos para a determinação das estatinas atorvastatina cálcica (ATOR) e rosuvastatina cálcica (ROS) foram desenvolvidos. Utilizando-se a técnica de voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial (DPAdASV, do inglês “Differential Pulse Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) sob condições otimizadas, a curva analítica construída para a ATOR foi linear no intervalo de $9,0 \times 10^{-8}$ a $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $9,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. No caso do fármaco ROS, a técnica de voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada (SWAdASV, do inglês “Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) apresentou um melhor desempenho analítico, e sob condições otimizadas, a curva analítica construída para a ROS foi linear no intervalo de $4,8 \times 10^{-7}$ a $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Ambos os procedimentos voltamétricos foram eficientemente aplicados na determinação de ATOR e ROS em amostras de formulações farmacêuticas e biológicas sintéticas (urina e soro humano).

Abstract

VOLTAMMETRIC ELECTRODES BASED ON VERTICALLY ALIGNED CARBON NANOTUBES APPLIED IN THE DETERMINATION OF STATINS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND BIOLOGICAL FLUIDS – In this work the application of electrodes based on a composite of Vertically Aligned Carbon Nanotubes and Graphene Oxide (VACNT-GO) as electrochemical sensor for the determination of pharmaceuticals from the statin class was explored. The VACNT-GO composite was synthesized by the Microwave Chemical Vapour Deposition (MWCVD) method, followed by oxygen plasma treatment. Using high-resolution scanning electron microscopy, Raman spectroscopy and X-Ray photoelectron spectroscopy, it was possible to verify the exposition of graphene sheets functionalized with oxygenated groups (graphene oxide) in the VACNT tips after the oxygen plasma treatment. The oxygen content increased from 4.9% for the VACNT sample to 21.4% in the VACNT-GO sample case. Furthermore, the C:O ratio was equal to approximately 1.5 for the VACNT-GO sample, in accordance with the expected range for graphene oxide. Moreover, by measurements of the contact angle with distilled water, it was noted a drastic change of the sample surface wettability, changing from superhydrophobic for VACNT (contact angle = 157°) to superhydrophilic for VACNT-GO (contact angle $\approx 0^\circ$), enhancing the electrochemical application of the material in aqueous systems. From cyclic voltammetry assays conducted for the potassium hexacyanoferrate (III) probe, it was diagnosed an electroactive area equivalent to approximately 80% of the geometric area and a high heterogeneous electron transfer rate constant ($3.4 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$) for the VACNT-GO electrode, demonstrating the good electrochemical performance of the proposed electrodic material. Next, voltammetric methods for determination of the statins atorvastatin calcium (ATOR) and rosuvastatin calcium (ROS) were developed. Using Differential

Pulse Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry (DPAdASV) under optimized conditions, the constructed analytical curve for ATOR was linear in the range from 9.0×10^{-8} to 3.8×10^{-6} mol L⁻¹, with a limit of detection of 9.4×10^{-9} mol L⁻¹. In the ROS drug case, the Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry (SWAdASV) technique showed the better analytical performance, and also under optimized conditions, the analytical curve was linear in the ROS concentration range from 4.8×10^{-7} to 4.7×10^{-5} mol L⁻¹, with a limit of detection of 6.0×10^{-8} mol L⁻¹. Both the voltammetric procedures were successfully applied in the ATOR and ROS determination in pharmaceutical formulations and synthetic biological samples (urine and human serum).

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Nanotubos de carbono	1
1.2 - Sensores eletroquímicos à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados	5
1.3 - Estatinas	11
2 - OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivo geral	15
2.2 - Objetivos específicos	15
3 - PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1 - Reagentes e soluções	16
3.2 - Instrumentação.....	16
3.3 - Síntese e caracterização do compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno.....	18
3.4 - Montagem dos eletrodos de trabalho à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno.....	19
3.5 - Procedimentos analíticos	20
3.5.1 - Preparação das amostras de formulações farmacêuticas	21
3.5.2 - Preparação das amostras biológicas sintéticas.....	21
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 - Síntese, caracterização e comportamento eletroquímico do compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno	23
4.1.1 - Microscopia eletrônica de varredura.....	24
4.1.2 - Espectroscopia Raman	26
4.1.3 - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X	29
4.1.4 - Ângulo de contato	31
4.1.5 - Comportamento eletroquímico	32
4.1.5.1 - Determinação da área eletroativa do eletrodo de VACNT-GO..	34

4.1.5.2 - Determinação da constante de transferência heterogênea de elétrons e estabilidade de resposta para o eletrodo de VACNT-GO.....	35
4.2 - Determinação voltamétrica de atorvastatina cálcica utilizando o eletrodo de VACNT-GO	39
4.2.1 - Comportamento eletroquímico da molécula de atorvastatina cálcica.....	40
4.2.2 - Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	41
4.2.3 - Estudo do efeito do potencial e do tempo de pré-concentração	44
4.2.4 - Determinação da constante de transferência heterogênea de elétrons para a eletrooxidação da molécula de atorvastatina cálcica	46
4.2.5 - Determinação de atorvastatina cálcica por voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada e por pulso diferencial	48
4.2.6 - Estudos de repetibilidade, interferentes e adição/recuperação	53
4.2.7 - Determinação de atorvastatina cálcica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas	56
4.3 - Determinação voltamétrica de rosuvastatina cálcica utilizando o eletrodo de VACNT-GO	58
4.3.1 - Comportamento eletroquímico da molécula de rosuvastatina cálcica.....	58
4.3.2 - Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	59
4.3.3 - Estudo do efeito do potencial e do tempo de pré-concentração.....	62
4.3.4 - Determinação do número de elétrons e da constante de transferência heterogênea de elétrons para a eletrooxidação da molécula de rosuvastatina cálcica.....	63
4.3.5 - Determinação de rosuvastatina cálcica por voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada	70
4.3.6 - Estudos de repetibilidade, interferentes e adição/recuperação	73
4.3.7 - Determinação de rosuvastatina cálcica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas	75

5 - CONCLUSÕES	77
6 - REFERÊNCIAS.....	80

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Nanotubos de carbono

Desde que os primeiros nanotubos de carbono (CNTs, do inglês “Carbon Nanotubes”) foram apresentados por Iijima em 1991¹ e 1993², estes materiais tem despertado enorme interesse pelos mais diversos setores do desenvolvimento tecnológico, sendo um dos materiais mais amplamente estudados e aplicados no campo da nanotecnologia^{3,4}. Um nanotubo de carbono pode ser compreendido como uma folha de grafeno (composta por átomos de carbono com hibridização sp^2) enrolada em torno de um eixo central, formando assim uma estrutura cilíndrica (tubo)^{4,5}. As extremidades ou pontas dos nanotubos são abertas ou fechadas em uma forma hemisférica tipo fulereno³.

Os CNTs são classificados em duas classes: os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, do inglês “Single-Walled Carbon Nanotubes”) e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês “Multi-Walled Carbon Nanotubes”). A diferença estrutural básica entre os SWCNT e os MWCNT está no número de camadas de folhas de grafeno. Como o próprio nome sugere, os SWCNT possuem apenas uma camada de folha de grafeno enrolada na forma de um tubo, e os MWCNT consistem de várias camadas de folhas de grafeno cilíndricas concêntricas³⁻⁵. Na Figura 1.1 são apresentadas esquematicamente as formas dos nanotubos de carbono supracitadas.

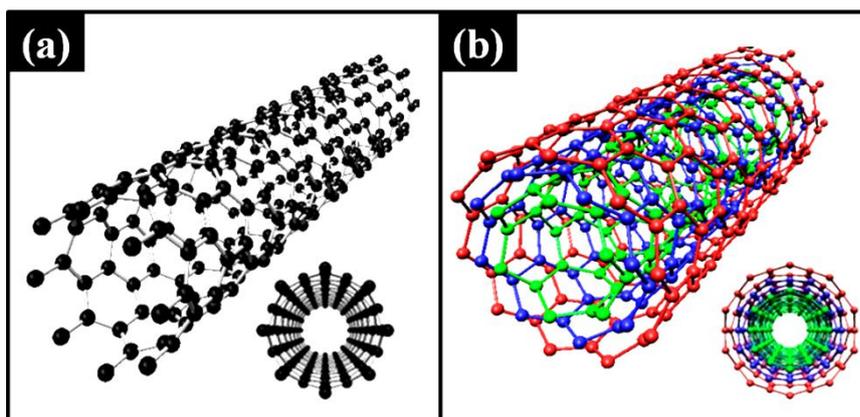


FIGURA 1.1 - Representação esquemática de um (a) SWCNT e (b) MWCNT.

O grande investimento registrado no desenvolvimento de tecnologias com base nos CNTs se deve às suas propriedades ópticas, eletrônicas e mecânicas únicas³⁻⁵. Dentre as inúmeras aplicações dos CNTs, se destacam as áreas de desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, dispositivos de armazenamento de energia, catálise, tratamento de efluentes como adsorvente, sensores para gases e sensores biológicos (biossensores), e quando combinados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas^{3,6-10}.

Os CNTs podem ser produzidos por três métodos principais, a saber: a) método de descarga por arco elétrico, b) método de ablação por laser e c) método de deposição química de vapor (CVD, do inglês “Chemical Vapour Deposition”)^{11,12}.

O método de descarga por arco elétrico consiste na produção de uma descarga elétrica entre dois eletrodos de grafite sob uma atmosfera inerte de argônio ou hélio, podendo os eletrodos de grafite ser ou não carregados por catalisadores metálicos¹³. A aplicação de uma elevada diferença de potencial entre os eletrodos provoca a geração de um plasma de elevadas temperaturas (~4000 K), superior à temperatura de sublimação do carbono¹³. Com isso, o carbono é sublimado no eletrodo positivo e transferido para o eletrodo negativo¹³. Ao final do processo, uma fuligem negra e escura é depositada no

eletrodo negativo e nas paredes internas da câmara, rica em fulereno e MWCNT^{13,14}. Esse processo permite a produção de CNTs em larga escala, no entanto, o inconveniente do método é a presença de partículas de catalisador nos nanotubos produzidos, sendo necessários processos posteriores de tratamento químico para remoção dos resíduos de catalisadores¹⁴⁻¹⁶.

No método de ablação por laser, um alvo de grafite é submetido a um feixe de laser que acarreta um aumento de temperatura do alvo permitindo a sublimação dos átomos de carbono¹³. O vapor produzido é transportado por um fluxo de gás inerte até um coletor metálico onde é resfriado e uma fuligem escura é depositada, rica em MWCNT¹²⁻¹⁴. A impregnação do alvo de grafite com nanopartículas metálicas de catalisador possibilita a produção de SWCNT^{12-14,17}. A principal desvantagem deste método é a pequena quantidade de CNTs sintetizados¹⁷.

Outro método de produção de CNTs que se encontra bem estabelecido é o método de deposição química de vapor, que consiste na deposição de CNTs a partir de um gás precursor aquecido a 800-1000 °C (tipicamente metano ou acetileno) sobre um substrato modificado com catalisadores nanométricos^{13,14,17,18}. As nanopartículas catalisadoras além de ativar a decomposição das moléculas do gás precursor, funcionam como molde para o crescimento dos CNTs. O método CVD possibilita a geração de CNTs em quantidades relativamente grandes, o que permitiu a sua aplicação a nível industrial. Além disso, uma característica interessante do método é a sua versatilidade no controle da produção dos CNTs, sendo possível a obtenção de CNTs orientados sobre o substrato com diâmetro e comprimento facilmente controláveis^{14,18,19}. Ademais, o método CVD é mais barato do que os métodos de descarga por arco elétrico e ablação por laser, e outra vantagem importante, é o menor gasto energético do método, que é conduzido a temperaturas bem inferiores^{14,18}. Embora sejam várias as vantagens do método CVD, os CNTs produzidos geralmente possuem muitos defeitos estruturais e partículas de

catalisador, e com isso, variações do método têm sido desenvolvidas. Uma destas consiste no método de deposição química de vapor assistido por microondas (MWCVD, do inglês “Micro Wave Chemical Vapour Deposition”). O método MWCVD provê a produção de CNTs com elevado grau de pureza, contendo baixíssimas concentrações de partículas metálicas de catalisador sobre a superfície dos CNTs²⁰. Além disso, o crescimento controlado dos CNTs também é facilmente conseguido por esta técnica, incluindo, o controle do diâmetro, comprimento, orientação, estrutura e concentração de nanotubos por unidade de área²⁰⁻²².

Um tópico em discussão se refere à proposição do mecanismo envolvido durante o crescimento orientado dos CNTs por CVD e, especialmente, por MWCVD. Algumas conclusões confirmadas experimentalmente são comuns aos mecanismos de crescimento propostos até o momento. Primeiramente, após iniciado o crescimento dos CNTs através da ação do catalisador metálico, o diâmetro dos CNTs permanece praticamente constante durante o crescimento, independentemente do comprimento dos CNTs¹³. Em segundo lugar, o diâmetro dos CNTs sintetizados é similar ao das nanopartículas metálicas catalisadoras, sugerindo que cada nanopartícula gera apenas um CNT¹³. Assim, considerando-se estas constatações práticas, dois tipos de mecanismos para o crescimento dos CNTs têm sido apresentados: crescimento tipo “raiz” e tipo “ponta”^{13,23-25}. Na Figura 1.2 é apresentado um esquema dos dois tipos de mecanismo de crescimento mencionados.

No mecanismo de crescimento tipo “raiz”, a nanopartícula metálica interage fortemente com a superfície do substrato, e o hidrocarboneto precursor é decomposto na superfície lateral da nanopartícula e os átomos de carbono se difundem para a parte superior da nanopartícula dando início ao crescimento dos CNTs^{13,23-25}. A nanopartícula metálica permanece, portanto, como uma raiz do CNTs. No caso do mecanismo tipo “ponta”, a interação entre a nanopartícula metálica e o substrato é mais fraca, e o hidrocarboneto é decomposto na parte

superior da nanopartícula e os átomos de carbono se difundem pelas laterais e iniciam a formação dos CNTs na parte inferior da nanopartícula, sendo, então, a nanopartícula metálica mantida na ponta do CNT durante a síntese^{13,23-25}.

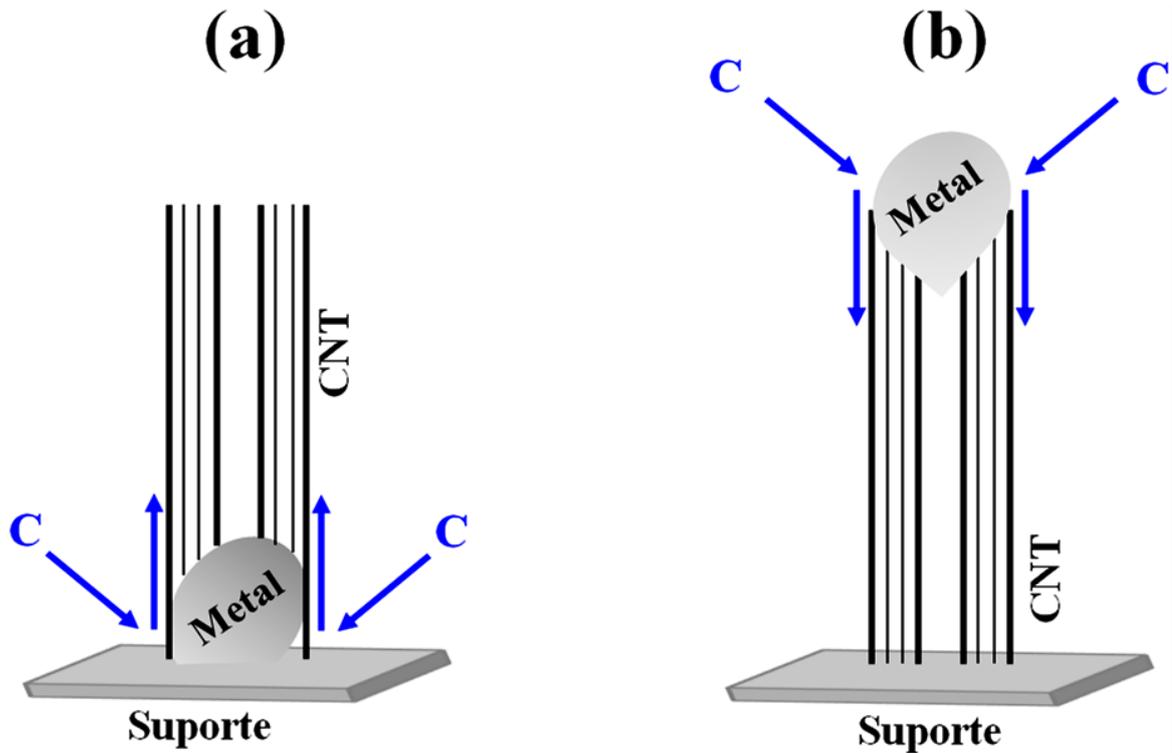


FIGURA 1.2 - Representação esquemática dos mecanismos de crescimento orientado dos CNTs preparados por CVD (a) tipo “raiz” e (b) tipo “ponta”.

1.2 - Sensores eletroquímicos à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados

Os CNTs reúnem um conjunto de características intrínsecas que justificam os intensos esforços que têm sido dedicados ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados nestas nanoestruturas. Em linhas gerais, são bons condutores, apresentando elevadas taxas de transferência de elétrons, possuem alta área superficial e quando funcionalizados podem ser facilmente utilizados como matriz para a imobilização de inúmeras espécies químicas e biológicas, tais como complexos metálicos, enzimas, proteínas, etc^{18,19}. A

melhoria das taxas de transferência de elétrons possibilita a detecção de analitos em potenciais de trabalho menores do que os apresentados por outros tipos de eletrodos, e, além disso, o uso de CNTs acarreta um aumento do sinal analítico, o que pode gerar procedimentos eletroanalíticos mais sensíveis e com níveis de detectabilidade cada vez menores^{4,26}.

Estudos desenvolvidos com o intuito de investigar as variáveis que afetam o comportamento eletroquímico dos CNTs como modificador ou mesmo como o próprio material de eletrodo demonstraram a influência de um conjunto de fatores físicos e químicos destes nanomateriais, como dimensões (comprimento e diâmetro), pureza, orientação e funcionalização química dos CNTs.

BANKS e COMPTON²⁷ reportaram um artigo de revisão onde a origem da atividade eletrocatalítica dos CNTs foi amplamente discutida. Observando-se a estrutura dos CNTs, duas regiões podem ser distinguidas: a região do plano das paredes (*basal-plane*) e a região do plano das pontas/bordas dos CNTs (*edge-plane*). Na Figura 1.3 (a) é destacado o posicionamento destas duas regiões dos CNTs, as quais podem ser correlacionadas com aquelas típicas para o grafite pirolítico altamente orientado (HOPG, do inglês “Highly Ordered Pyrolytic Graphite”), Figura 1.3 (b). O uso de eletrodos de HOPG preparados de forma a expor as regiões específicas *basal-plane* e *edge-plane* forneceu informação fundamental sobre a contribuição de cada uma das duas regiões para a resposta eletroquímica observada e, conseqüentemente, serviu como base para elucidação do comportamento eletroquímico dos eletrodos à base de CNTs. Recorrendo-se ao uso da sonda eletroquímica de hexacianoferrato (III) de potássio e da técnica de voltametria cíclica, um eletrodo de grafite pirolítico de plano de borda (EPPG, do inglês, “Edge-Plane Pyrolytic Graphite”) apresentou um valor de ΔE_p (diferença de potencial entre os potenciais de pico anódico e catódico) igual a 78 mV, em contraste com o valor de 350 mV observado para um eletrodo de grafite pirolítico de plano basal (BPPG, do inglês “Basal-Plane

Pyrolytic Graphite²⁷). Este resultado permitiu constatar a lenta taxa de transferência heterogênea de elétrons através dos sítios no plano basal (*basal-plane*), menor que aquela registrada para os sítios no plano de borda (*edge-plane*).

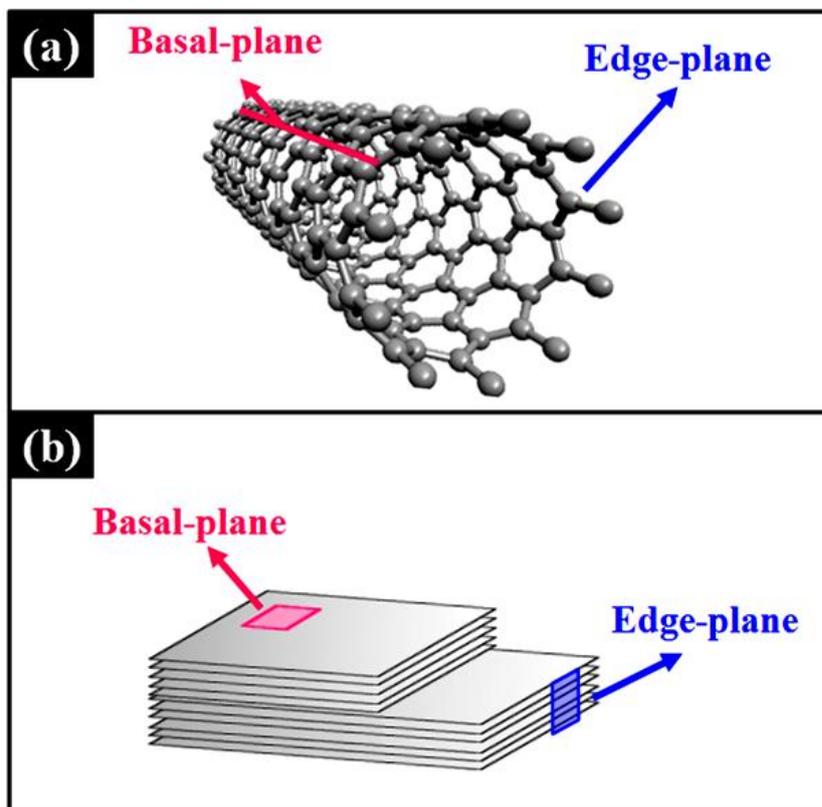


FIGURA 1.3 - Representação das regiões *basal-plane* e *edge-plane* de um (a) SWCNT e (b) HOPG (Adaptado de Ref. 27).

Inspirado nos resultados obtidos utilizando-se EPPG, e conhecendo-se que CNTs também podem ser identificados como tendo sítios *basal-plane* e *edge-plane*, investigações foram desenvolvidas de forma a tentar correlacionar o bom desempenho eletroquímico dos eletrodos à base de CNTs com a atividade dos sítios *edge-plane*. BANKS et al.²⁸ avaliaram a resposta eletroquímica da sonda de hexacianoferrato (III) de potássio e da epinefrina sobre eletrodos de EPPG, BPPG, e BPPG modificados com fulereno C_{60} e MWCNTs. Utilizando-se os eletrodos de BPPG e BPPG modificado com fulereno C_{60} (BPPG- C_{60}), uma lenta cinética de transferência de elétrons foi notada para ambas as

moléculas eletroativas investigadas. No caso da molécula de epinefrina, um pico de oxidação irreversível em +0,57 V e +0,64 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) foi registrado utilizando-se os eletrodos de BPPG e BPPG-C₆₀, respectivamente. Em contrapartida, utilizando-se os eletrodos de EPPG e BPPG modificado com MWCNT (BPPG-MWCNT), um comportamento quase-reversível foi diagnosticado para a molécula de epinefrina, com separação de picos em torno de 180 mV. Posteriormente, trabalhando-se com a sonda de hexacianoferrato (III) de potássio, resultados similares àqueles coletados para a epinefrina foram observados, ou seja, sobre os eletrodos de BPPG e BPPG-C₆₀ uma lenta cinética de transferência de elétrons foi verificada, com valores de ΔE_p de 350 e 550 mV, respectivamente, enquanto que os valores de 58 e 78 mV foram obtidos para os eletrodos de EPPG e BPPG-MWCNT. Tais resultados reafirmam a proposta da importante contribuição da região *edge-plane* para os processos de transferência eletrônica no caso de eletrodos de HOPG, podendo ser estendida para o caso dos MWCNT, uma vez que eletrodos de BPPG modificados com este nanomaterial apresentaram resposta eletroquímica idêntica ou próxima àquela fornecida por eletrodos de EPPG.

Os estudos demonstrando que a aparente atividade eletrocatalítica dos CNTs advém da transferência majoritária de elétrons pelos sítios *edge-plane*, ou seja, através das extremidades ou pontas abertas dos CNTs, serviram de base para trabalhos posteriores relacionados à investigação do efeito da orientação dos CNTs sobre a performance eletroquímica destes nanomateriais. A ideia nestes estudos foi aplicar eletrodos contendo CNTs verticalmente alinhados (VACNT, do inglês “Vertically Aligned Carbon Nanotubes”) relativamente ao substrato de deposição, onde, naturalmente, haveria uma maximização do número de *edge-planes* (pontas) expostos.

LIU et al.²⁹ avaliaram o comportamento eletroquímico da enzima glicose oxidase imobilizada sobre uma camada auto-montada de SWCNT verticalmente alinhados depositada sobre um eletrodo de ouro. A obtenção de

SWCNT verticalmente alinhados sobre o substrato de ouro foi conseguida por meio da molécula de cistamina, cujo átomo de enxofre interagiu fortemente com a superfície do ouro e o átomo de nitrogênio do grupo amina presente na outra extremidade da molécula interagiu com os grupos carboxila presentes nas pontas dos SWCNT. Em uma análise do comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro modificado com SWCNT verticalmente alinhados, um valor de ΔE_p igual a 59 mV foi verificado para a sonda de ferricianeto. Fazendo-se a mesma análise para um eletrodo de ouro contendo SWCNT aleatoriamente orientados, o valor de ΔE_p obtido foi de 99 mV. Portanto, a orientação dos SWCNT forneceu uma melhora significativa no desempenho eletroquímico, atribuído à exposição dos *edge-planes* para a solução eletrolítica. Resultados similares foram reportados por CHOU et al.³⁰ utilizando SWCNT verticalmente alinhados preparados da mesma forma, corroborando, assim, com a premissa anterior de uma possível melhora do desempenho eletroquímico de eletrodos à base de VACNT.

O favorecimento da resposta eletroquímica dos eletrodos à base de VACNT tem sido explorado no uso desta arquitetura como sensor eletroquímico para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. YE et al.³¹ reportaram o uso de VACNT depositados sobre um substrato de Ta utilizando um método CVD para a determinação seletiva de ácido úrico. Para uso como eletrodo de trabalho o substrato de Ta contendo os VACNT foi fixado sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês “Glassy Carbon Electrode”) utilizando-se cola condutiva de prata. A resposta voltamétrica do ácido úrico foi investigada na presença de ácido ascórbico, uma vez que são encontrados juntos em amostras de fluidos biológicos, como sangue e urina. Utilizando-se o GCE, houve evidente sobreposição dos picos de oxidação desses analitos nos seguintes potenciais (*vs.* Ag/AgCl (KCl 1,0 mol L⁻¹)): ácido úrico em 323 mV e ácido ascórbico em 357 mV. Portanto, a separação dos potenciais de pico no caso do GCE foi de apenas 34 mV, impossibilitando assim a determinação de ácido úrico devido à interferência do ácido ascórbico. No entanto, utilizando o GCE

modificado com VACNT, houve uma diminuição diferencial dos potenciais de oxidação para ácido úrico e ácido ascórbico, assumindo os seguintes valores (*vs.* Ag/AgCl (KCl 1,0 mol L⁻¹)): ácido úrico em 253 mV e ácido ascórbico em -111 mV. Com isso, a separação dos potenciais de pico aumentou significativamente para 364 mV. A partir da melhoria da resolução dos picos desses analitos, o ácido úrico foi determinado utilizando-se voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês “Differential Pulse Voltammetry”) no intervalo de concentrações de $2,0 \times 10^{-7}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Ademais, o método voltamétrico desenvolvido foi empregado na determinação de ácido úrico em amostras de urina humana.

WANG et al.³² também fizeram uso de um GCE modificado com uma membrana de VACNT para a determinação de dopamina, e construção de um biossensor utilizando-se a enzima glicose oxidase. Os VACNT foram sintetizados por um método CVD utilizando-se substratos de silício cobertos com camadas de Al₂O₃ e Fe. O substrato de silício contendo a membrana de VACNT foi transferido e levemente pressionado sobre a superfície de um GCE coberta por uma solução de Nafion. Após a secagem total da solução de Nafion, foi obtido o GCE modificado com VACNT, denominado pelos autores como CNT/Nafion GCE. Quando utilizado na determinação de dopamina, esta molécula apresentou comportamento quase-reversível sobre o CNT/Nafion GCE, com picos anódico e catódico bem definidos. Comparativamente, tanto o GCE não modificado quanto o GCE modificado apenas com Nafion não foram sensíveis à determinação de dopamina, sem a ocorrência de processos eletródicos possivelmente associados à oxidação ou redução deste analito. Analiticamente, usando-se a técnica de voltametria cíclica, os autores propuseram que limites de detecção inferiores a $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ podem ser obtidos para a dopamina com o uso do eletrodo de CNT/Nafion GCE. Finalmente, a enzima glicose-oxidase (GOD) foi eficientemente imobilizada sobre a arquitetura CNT/Nafion GCE, e o biossensor obtido utilizado na

determinação de glicose. A curva analítica construída para a glicose foi linear no intervalo de $2,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A arquitetura de CNTs alinhados serviu como excelente meio para a transferência de elétrons entre o eletrodo base e a enzima GOD, demonstrando a potencialidade do uso de VACNT para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

Em um artigo de comunicação, MORAES et al.³³ avaliaram o efeito da organização de CNTs sobre a determinação de bisfenol A, um disruptor endócrino. VACNT foram obtidos sobre a superfície de um eletrodo de Au utilizando DNA com terminações em tiol como agente de fixação e orientação dos CNTs. Para efeitos de comparação, o eletrodo de Au também foi modificado com CNTs orientados aleatoriamente, preparado pela simples deposição de uma dispersão de SWCNT sobre o eletrodo de Au, e deixado secar o volume do solvente da dispersão. O eletrodo à base de VACNT apresentou melhor desempenho para a determinação de bisfenol A relativamente ao uso de CNTs dispersos randomicamente, com uma diminuição do sobrepotencial de trabalho e aumento da corrente de pico de oxidação. Ademais, utilizando-se o eletrodo de VACNT e DPV, a curva analítica construída apresentou maior faixa linear de concentrações e sensibilidade analítica, e um menor limite de detecção foi estimado para a determinação de bisfenol A.

1.3 - Estatinas

As estatinas são um grupo de fármacos utilizados para o tratamento de hiperlipidemias, atuando na redução dos níveis de colesterol LDL no plasma sanguíneo^{34,35}. A ação das estatinas é resultante da sua atividade sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-coenzima A redutase), que catalisa a conversão da HMG-CoA a ácido mevalônico, precursor da síntese de colesterol^{34,35}. As estatinas, portanto, inibe a ação enzimática da HMG-CoA

redutase, bloqueando a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, e por consequência a biossíntese de colesterol^{34,35}. As estatinas podem ser subdivididas em dois grupos: naturais e sintéticas. No grupo das estatinas naturais estão incluídas a lovastatina, pravastatina e sinvastatina, e no grupo das estatinas sintéticas têm-se a atorvastatina cálcica, pravastatina, fluvastatina e rosuvastatina cálcica. Em termos gerais, as diversas estatinas se diferem quanto à potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade^{34,35}.

Relativamente aos métodos de análise e quantificação das estatinas em formulações farmacêuticas e amostras biológicas, são encontrados na literatura trabalhos envolvendo o uso de cromatografia líquida de alta eficiência^{36,37}, eletroforese capilar³⁸ e espectrometria UV-vis³⁹. Em parte destes métodos, equipamentos de alto custo são necessários, além do tempo de análise ser consideravelmente alto, devido às pré-etapas de preparo de amostras. Desta forma, torna-se relevante a procura por métodos alternativos, simples, econômicos e rápidos para a determinação das estatinas. Neste contexto, os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens interessantes em relação aos métodos tradicionais, que justificam o desenvolvimento de procedimentos analíticos com base nestas técnicas. Dentre estas, destacam-se que em muitos casos as amostras podem ser analisadas diretamente ou após tratamentos simples, eliminando as etapas de digestão/preparo de amostras mais sofisticados, amostras coloridas podem ser analisadas sem problemas e são mais rápidos e baratos^{40,41}.

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos voltamétricos para a quantificação das estatinas atorvastatina cálcica (ATOR) e rosuvastatina cálcica (ROS), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 1.4. Como pode ser observado, em ambos os casos, dois íons aniônicos formados pela desprotonação dos grupos carboxílicos possuem como contra-íon um cátion de cálcio.

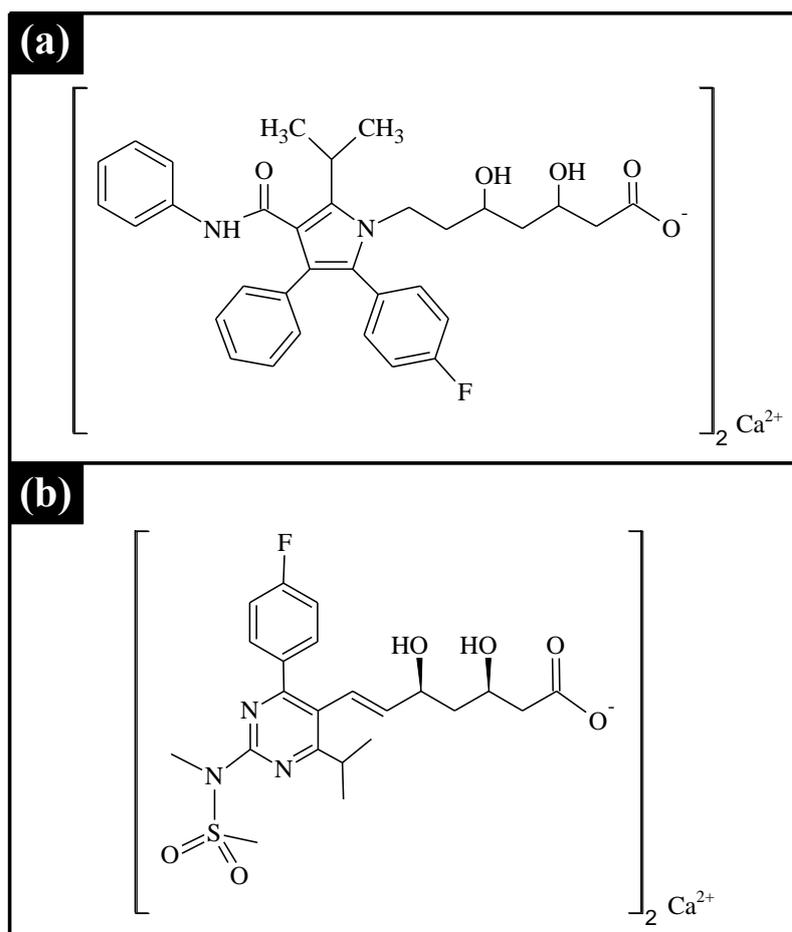


FIGURA 1.4 - Estrutura química da molécula de (a) atorvastatina cálcica e (b) rosuvastatina cálcica.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos envolvendo a determinação voltamétrica destes fármacos. No caso da atorvastatina cálcica os procedimentos voltamétricos reportados são baseados no uso de eletrodos de carbono vítreo^{42,43}, diamante dopado com boro⁴², pasta de carbono na presença de surfactante⁴⁴ e GCE modificado com filme de polipirrol (PPY, do inglês “Polypyrrole”) contendo CNTs⁴⁵. Dentre os métodos propostos para a determinação voltamétrica de atorvastatina cálcica, destacam-se o uso do eletrodo de pasta de carbono associado ao surfactante brometo de cetiltrimetilamônio, com limite de detecção de $4,08 \text{ nmol L}^{-1}$ ⁴⁴ e a modificação do GCE com PPY contendo CNTs incorporados, com limite de detecção de $1,50 \text{ nmol L}^{-1}$ ⁴⁵.

A determinação voltamétrica de ROS tem sido feita utilizando eletrodos de mercúrio^{46,47}, com excelentes parâmetros analíticos.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O presente trabalho de mestrado teve como objetivo geral investigar o comportamento eletroquímico de novos eletrodos à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno e sua aplicabilidade como sensor eletroquímico no desenvolvimento de procedimentos voltamétricos para a determinação de estatinas (atorvastatina cálcica e rosuvastatina cálcica) em amostras farmacêuticas e biológicas.

2.2 - Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno (VACNT-GO, do inglês “Vertically Aligned Carbon Nanotubes and Graphene Oxide”) utilizando o método de deposição química de vapor assistido por microondas (MWCVD, do inglês “Microwave Chemical Vapor Deposition”) seguido por tratamento por plasma de oxigênio, em parceria com pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE);
- Investigar as propriedades eletroquímicas do eletrodo à base de VACNT-GO utilizando sondas eletroquímicas;
- Desenvolver procedimentos voltamétricos para a detecção de atorvastatina cálcica e rosuvastatina cálcica em amostras de formulações farmacêuticas e biológicas sintéticas.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Reagentes e soluções

Padrões de atorvastatina cálcica (ATOR) e rosuvastatina cálcica (ROS) foram adquiridos da Farmácia de Manipulação Calêndula (Grau de pureza > 99%). Metanol de grau HPLC foi adquirido da Merck. Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida em um sistema Millipore Milli-Q (Billerica, EUA).

Soluções estoque de ATOR e ROS, ambas em uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, foram preparadas diariamente utilizando metanol como solvente. Soluções de tampão fosfato de força iônica 0,2 mol L⁻¹ com pH variando de 2,0 a 8,0 foram preparadas a partir da diluição do volume adequado de H₃PO₄Conc. e dissolução das respectivas massas de KH₂PO₄, K₂HPO₄ e K₃PO₄. A solução de tampão acetato de força iônica 0,2 mol L⁻¹ e pH = 4,5 foi preparada pela diluição do volume adequado de CH₃COOH glacial e dissolução da respectiva massa de CH₃COONa. Soluções de tampão Britton-Robinson (BR) com pH igual a 2,0 e 4,5 foram preparadas a partir do ajuste do pH com solução concentrada de NaOH de uma solução de CH₃COOH, K₃PO₄ e H₃BO₃ todos a 0,04 mol L⁻¹. No caso das análises voltamétricas de ATOR, uma porcentagem de metanol (20% v/v) foi utilizada no eletrólito suporte para completa dissolução do fármaco.

3.2 - Instrumentação

Para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL6330. Os espectros

Raman foram coletados em um Espectroscópio Raman Renishaw 2000, com laser de argônio com comprimento de onda de excitação de 514,5 nm. Para medição dos ângulos de contato foi empregado um goniômetro Krüss modelo Easy Drop no modo *sessile drop* e usando água destilada. Todos estes equipamentos encontram-se instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos. Medidas de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS, do inglês “X-Ray Photoelectron Spectroscopy”) foram feitas utilizando um sistema VSW - HA100, empregando como fonte excitadora a radiação Al(K α) com energia de 1486,6 eV, o qual encontra-se instalado no Laboratório de Física de Superfícies (GFS) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

Um pHmetro modelo Orion EA 94 equipado com um eletrodo de vidro e um eletrodo de referência externo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) foi usado na determinação do pH das soluções.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-12 (Eco Chemie, Holanda) controlado pelo software GPES 4.9. Uma célula eletroquímica tradicional de três eletrodos de compartimento único (15 mL) foi empregada utilizando como eletrodo de trabalho o eletrodo de VACNT-GO, um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e uma folha de platina como contra-eletrodo. No caso dos ensaios voltamétricos realizados para a determinação de ATOR, foi utilizado um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) de dupla junção, pois foi necessário o uso de eletrólito suporte contendo uma porcentagem de metanol para a adequada solubilização do fármaco.

Um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 foi utilizado para a realização dos ensaios do método comparativo para a determinação de ATOR e ROS nas formulações farmacêuticas.

3.3 - Síntese e caracterização do compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno

Inicialmente, filmes de nanotubos de carbono verticalmente alinhados (VACNT) foram sintetizados empregando-se o método de deposição química de vapor assistido por microondas (MWCVD), usando um reator de plasma de microondas a uma frequência de 2,45 GHz, potência de 800 W e pressão de 30 Torr durante todos os experimentos^{48,49}. Como substrato para a deposição dos filmes de VACNT foi utilizada uma folha de Ti com dimensões 10 mm × 10 mm × 0,5 mm, recoberta com uma camada de Ni (10 nm) depositada por evaporação por feixe de elétrons. O substrato de Ti contendo a camada de Ni foi aquecido em um plasma de N₂/H₂ (10/90 sccm) de 350 a 800 °C por um período de 5 minutos, o que provocou a formação de nanoilhas de Ni que atuaram em seguida como partículas catalisadoras para o crescimento dos VACNT. Após a etapa de formação das partículas catalisadoras, foi inserido na câmara do reator o gás precursor CH₄ (vazão de 14 sccm) durante 1 min, mantendo-se a temperatura do substrato constante e igual a 800 °C.

Os filmes de VACNT obtidos foram em seguida submetidos a um tratamento por plasma de oxigênio, de forma a esfoliar as pontas dos nanotubos de carbono e inserir grupos funcionais oxigenados nestes, tais como –OH, –COOH e =O. Esta etapa de funcionalização e esfoliação foi realizada usando um reator de plasma DC pulsado (–700 V e frequência de pulso de 20 kHz) com uma vazão de oxigênio de 1 sccm a uma pressão de 150 mTorr^{48,49}. Após este procedimento, as amostras de VACNT foram renomeadas como compósitos de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno (VACNT-GO). Todas as amostras de VACNT e VACNT-GO foram caracterizadas por MEV, espectroscopia Raman, XPS e medida do ângulo de contato.

Os sistemas de reatores utilizados para a síntese dos materiais VACNT e VACNT-GO também encontram-se instalados no Laboratório

Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos.

3.4 - Montagem dos eletrodos de trabalho à base de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno

Os substratos de Ti contendo filmes de VACNT-GO foram utilizados na construção de eletrodos de trabalho. Para isso, os referidos substratos foram fixados sobre um suporte de cobre adequadamente desenhado (Figura 3.1) com o uso de cola condutiva de prata. Após a secagem da cola de prata o material obtido foi selado com resina epóxi de 2 minutos de secagem, e uma área eletródica de aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$ foi delimitada. O material de eletrodo foi eletroquimicamente caracterizado utilizando a sonda eletroquímica de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

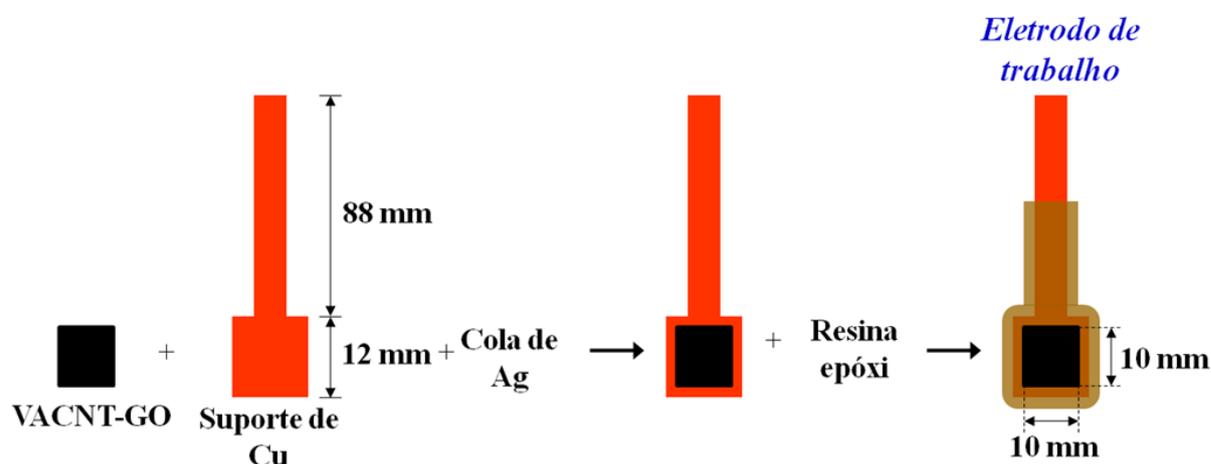


FIGURA 3.1 - Esquema geral de montagem dos eletrodos de trabalho de VACNT-GO.

3.5 - Procedimentos analíticos

No desenvolvimento dos procedimentos voltamétricos para a determinação das estatinas ATOR e ROS foram seguidas etapas semelhantes, como descritas a seguir.

Primeiramente, foi identificado o melhor eletrólito suporte (composição e pH) para a resposta voltamétrica dos fármacos. Em seguida, as técnicas voltamétricas de Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Onda Quadrada (SWAdASV, do inglês “Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) e por Pulso Diferencial (DPAAdASV, do inglês “Differential Pulse Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) foram empregadas para determinação dos analitos, e, conseqüentemente, todos os parâmetros experimentais de cada técnica foram sistematicamente otimizados. Sob as condições ótimas, as respectivas curvas analíticas para cada técnica voltamétrica foram construídas. Assim, a partir das curvas analíticas obtidas os parâmetros de desempenho analítico, tais como faixa linear de concentrações, sensibilidade (coeficiente angular da curva analítica) e limite de detecção, foram estimados e a técnica com os melhores resultados selecionada para a continuidade dos estudos analíticos.

A precisão do procedimento voltamétrico foi verificada a partir de estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 10$) e inter-dias ($n = 3$). O procedimento voltamétrico desenvolvido foi empregado na análise de amostras farmacêuticas e amostras biológicas sintéticas dopadas com uma concentração conhecida de cada analito. Nas seções seguintes são descritos os procedimentos adotados para preparação das amostras supracitadas.

As amostras farmacêuticas também foram analisadas empregando-se um método comparativo para a avaliação da exatidão dos procedimentos voltamétricos estabelecidos. Foi empregada como método comparativo a espectroscopia UV-Vis em ambos os casos ($\lambda = 244 \text{ nm}$)^{50,51}.

3.5.1 - Preparação das amostras de formulações farmacêuticas

Três amostras de formulações farmacêuticas de ATOR e duas de ROS foram adquiridas em drogarias locais, sendo estas nomeadas como: amostras de ATOR – A: 10 mg/comprimido, B e C: 20 mg/comprimido; amostras de ROS – A: 10 mg/comprimido e B: 20 mg/comprimido. Para preparação destas amostras, dez comprimidos de cada amostra foram pesados, triturados e/ou pulverizados utilizando-se um almofariz e pistilo. Em seguida, a massa de pó equivalente a um comprimido da amostra foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com o solvente metanol. As amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 10 min e os sólidos não dissolvidos separados por filtração. Desta forma, foram obtidas as respectivas soluções-estoque de cada amostra.

3.5.2 - Preparação das amostras biológicas sintéticas

De forma a investigar a potencialidade dos procedimentos voltamétricos desenvolvidos para a determinação de ATOR e ROS em amostras biológicas reais de urina e soro humano, substitutos sintéticos para tais amostras foram preparados contendo alguns dos componentes químicos presentes em amostras reais, seguindo procedimentos pré-estabelecidos na literatura^{52,53}.

Para preparação da amostra de urina sintética, 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl₂.2H₂O, 0,56 g de Na₂SO₄, 0,35 g de KH₂PO₄, 0,25 g de NH₄Cl e 6,25 g de ureia foram dissolvidos em água em um balão volumétrico de 250 mL. No caso das amostras de soro humano 3,0 g de NaCl, 0,16 g de NaHCO₃, 3,5 mg de triptofano, 2,3 mg de glicina, 3,2 mg de serina, 3,7 mg de tirosina, 6,6 mg de fenilalanina, 9,1 mg de lisina, 6,3 mg de histidina, 29,0 mg

de ácido aspártico, 9,1 mg de alanina e 10,0 mg de arginina foram dissolvidos em água em um balão volumétrico de 250 mL. As amostras foram em seguida dopadas com concentrações conhecidas de ATOR e ROS, e analisadas diretamente pelos respectivos métodos voltamétricos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese, caracterização e comportamento eletroquímico do compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno

Amostras de um compósito de nanotubos de carbono verticalmente alinhados e óxido de grafeno (VACNT-GO) foram sintetizadas pelo método de MWCVD seguido pelo tratamento por plasma de oxigênio. O processo de MWCVD foi eficiente na preparação de nanotubos de carbono em um perfeito alinhamento vertical em relação ao substrato de Ti, e a etapa de tratamento por plasma de oxigênio eficaz na promoção da funcionalização da superfície dos VACNT com grupos funcionais oxigenados e também da esfoliação das pontas dos nanotubos de carbono em folhas de óxido de grafeno. As amostras de VACNT-GO geradas após o tratamento por plasma de oxigênio foram super-hidrofílicas, em contraste com as amostras de VACNT como sintetizadas, com comportamento totalmente hidrofóbico (super-hidrofóbica). Nas subseções que seguem são apresentados os resultados de caracterização morfológica e química que demonstram as afirmações mencionadas previamente sobre o material produzido, além do estudo do comportamento eletroquímico das amostras de VACNT-GO como material de eletrodo, cuja viabilidade de aplicação eletroquímica/eletroanalítica em sistemas aquosos foi proporcionada por meio da melhora significativa da molhabilidade dos VACNT[#].

[#] Os resultados desta seção foram publicados no periódico *Electrochimica Acta*: Tiago A. Silva, Hudson Zanin, Eduardo Saito, Roberta A. Medeiros, Fernando C. Vicentini, Evaldo J. Corat e Orlando Fatibello-Filho. "Electrochemical behaviour of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide nanocomposite as electrode material", *Electrochimica Acta*, 119, 114-119, 2014.

4.1.1 - Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas para o filme de nanotubos de carbono verticalmente alinhados após o tratamento por plasma de oxigênio (VACNT-GO) são apresentadas nas Figuras 4.1 (a-e). A Figura 4.1 (f) refere-se a uma imagem de MEV coletada da lateral de uma amostra de nanotubos de carbono verticalmente alinhados como crescidos (VACNT). A partir da Figura 4.1 (f) pode-se verificar que uma “floresta” densa de nanotubos de carbono em um perfeito alinhamento vertical foi formada, gerando uma superfície de elevada porosidade e com uma espessura de filme de aproximadamente 40 μm .

A Figura 4.1 (a) consiste em uma imagem de MEV da parte superior (vista de cima) do filme de VACNT-GO, mostrando a formação de uma superfície tipo carpete. As Figuras 4.1 (b-e) representam imagens de MEV obtidas em alta resolução e coletadas a partir daqueles nanotubos de carbono da Figura 4.1 (a), no qual revelam que o tratamento por plasma de oxigênio foi eficaz na esfoliação das pontas dos nanotubos de carbono.

É bem conhecido que nanotubos de carbono consistem de folhas de grafeno enroladas em forma de cilindros, e que, portanto, o enrolamento de folhas de grafeno em tubos é um modelo padrão para ilustrar a formação dos nanotubos de carbono⁵⁴. Desta forma, a partir das imagens de MEV registradas pode-se concluir que o tratamento dos filmes de VACNT com o plasma de oxigênio promoveu a esfoliação das pontas dos nanotubos, expondo sua estrutura fundamental: o grafeno (Figuras 4.1 (b-e)).

Além de promover a esfoliação das pontas dos nanotubos de carbono, o tratamento por plasma de oxigênio também promoveu a inserção de grupos funcionais oxigenados à estrutura dos nanotubos, melhorando significativamente a molhabilidade dos filmes de VACNT como será apresentado nas próximas seções. Vale a pena ressaltar que o processo de

funcionalização/esfoliação foi realizado em condições muito específicas do plasma de oxigênio. Dependendo das condições do plasma de oxigênio pode se ter uma completa erosão dos nanotubos de carbono ou simplesmente a inserção de grupos oxigenados sem qualquer esfoliação. Por exemplo, utilizando-se pressões mais altas ou mesmo um maior tempo de exposição ao plasma de oxigênio os VACNT são completamente destruídos. Assim, as amostras de VACNT-GO foram conseguidas sob condições específicas e bem controladas, para garantia da repetibilidade da síntese das amostras de VACNT-GO.

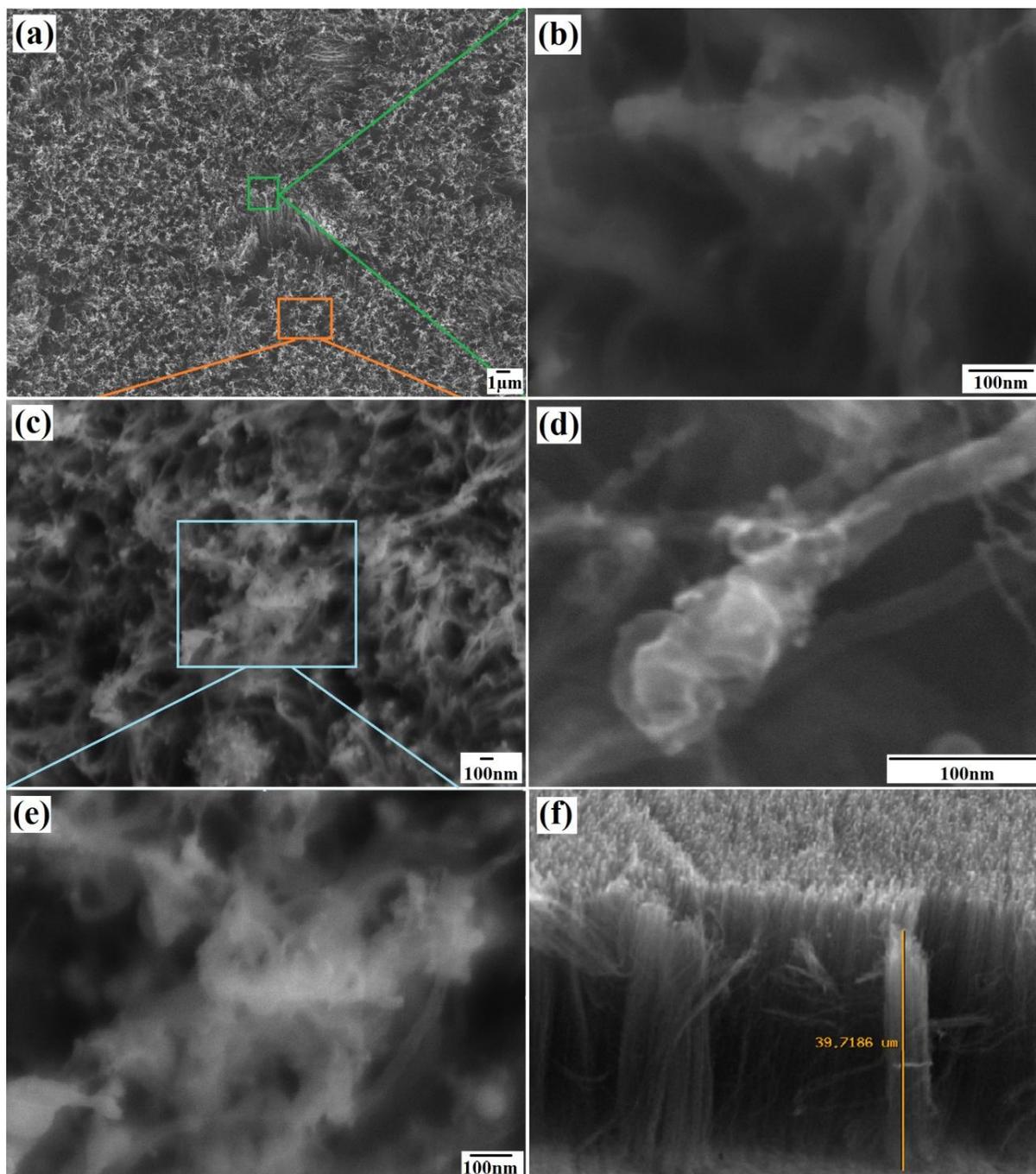


FIGURA 4.1 - Imagens de MEV obtidas dos filmes de (a-e) VACNT-GO e (f) VACNT.

4.1.2 - Espectroscopia Raman

O tratamento por plasma de oxigênio provocou modificações químicas e estruturais nas amostras de VACNT, as quais puderam ser avaliadas por espectroscopia Raman. Os espectros Raman de primeira e segunda ordem

coletados para os filmes de VACNT antes e após o tratamento por plasma são apresentados nas Figuras 4.2 (a-c). A deconvolução das bandas registradas foi realizada utilizando-se formas Lorentzianas para as bandas D, G e G', e formas Gaussianas para as bandas em torno de 1250 (#), 1480 (*) e 1611 cm^{-1} (ombro D')⁵⁵⁻⁵⁷. No caso do espectro Raman de primeira ordem da amostra de VACNT-GO, para uma deconvolução apropriada, dois picos Gaussianos centrados em aproximadamente 1250 e 1480 cm^{-1} tiveram de ser necessariamente adicionados.

Cada uma das bandas observadas nos espectros Raman está correlacionada a um determinado aspecto estrutural do material carbônico. A banda D é normalmente atribuída à desordem e imperfeição dos cristais de carbono⁵⁵⁻⁵⁷. A banda G é atribuída a um dos dois modos E_{2g} correspondentes às vibrações de estiramento no plano basal (domínios sp^2) de cristais simples de grafeno⁵⁵⁻⁵⁷. A banda G' está relacionada à cristalinidade da amostra, e a sua alta intensidade em ambas as amostras demonstram a excelente qualidade estrutural dos materiais sintetizados⁵⁵⁻⁵⁷.

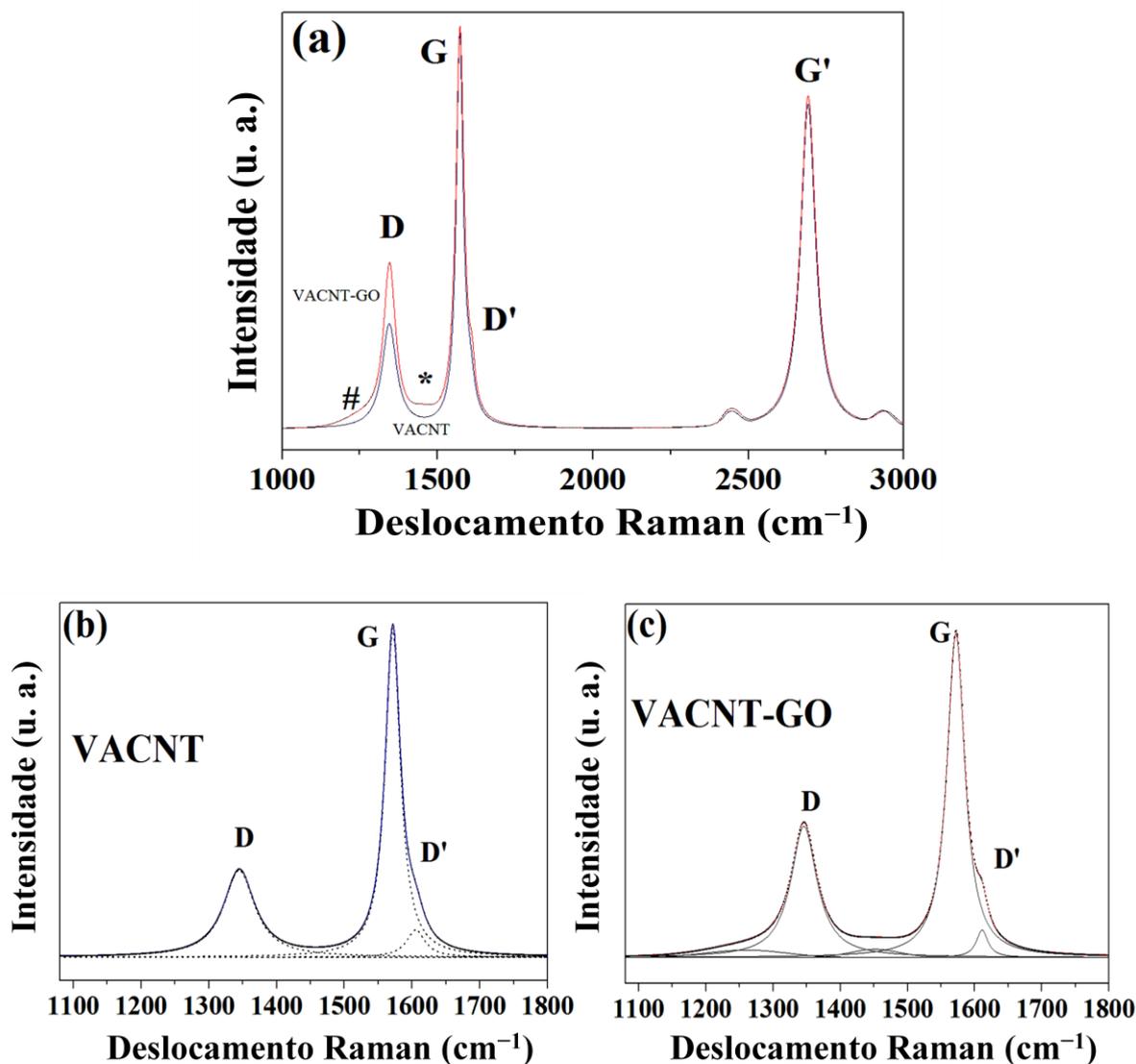


FIGURA 4.2 - (a) Espectros Raman de primeira e segunda ordem registrados para amostras de (b) VACNT e (c) VACNT-GO.

Devido à semelhança dos espectros Raman obtidos para as amostras de VACNT e VACNT-GO, uma estratégia para tornar mais evidente as diferenças entre estes foi calcular as razões das áreas das bandas D, G', (*) e (#) relativamente à área da banda G, e os valores obtidos encontram-se organizados na Tabela 4.1. Utilizando-se as diferentes razões das áreas das bandas, é possível obter conclusões mais evidentes dos espectros Raman a respeito das modificações químicas resultantes da funcionalização por plasma de oxigênio. A intensidade da razão A_D/A_G corresponde à extensão do grau de desordem da estrutura gráfitica, a razão $A_{G'}/A_G$ tem relação direta com a cristalinidade da

amostra, a razão $A_{(*)}/A_G$ está correlacionada com a presença de grupos polares sobre a superfície das amostras e a razão $A_{(\#)}/A_G$ pode ser correlacionada à mudanças estruturais. A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.1 observa-se um aumento de intensidade da razão A_D/A_G , passando de 0,54 (VACNT) para 0,58 (VACNT-GO), e o surgimento das razões $A_{(*)}/A_G$ e $A_{(\#)}/A_G$ para o caso dos VACNT-GO com valores de 0,05 e 0,08, respectivamente. No caso da razão $A_{G'}/A_G$, foi notada uma diminuição de intensidade após a funcionalização por plasma de oxigênio, partindo de 1,78 para a amostra de VACNT e chegando a 1,54 para a amostra de VACNT-GO. Estes resultados indicam um acréscimo do número de defeitos e uma relativa perda de cristalinidade dos VACNT após o tratamento e, ainda, o aumento ou surgimento das bandas (*) em $\approx 1200 \text{ cm}^{-1}$ e (#) em 1480 cm^{-1} pode ser atribuído às mudanças estruturais provocadas pela esfoliação das pontas dos VACNT em folhas de grafeno e à presença de grupos carboxílicos polares sobre a superfície dos VACNT-GO^{48,57}.

TABELA 4.1 - Comparação entre as áreas das bandas extraídas dos espectros Raman obtidos para as amostras de VACNT e VACNT-GO

Amostra	Razão			
	A_D/A_G	$A_{G'}/A_G$	$A_{(*)}/A_G$	$A_{(\#)}/A_G$
VACNT	0,54	1,78	---	---
VACNT-GO	0,58	1,54	0,05	0,08

4.1.3 - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Para identificar os grupos oxigenados presentes sobre a superfície dos VACNT-GO, espectros de XPS para C1s e O1s foram coletados antes (Figuras 4.3 a e b) e após (Figuras 4.3 c e d) a funcionalização dos nanotubos de carbono. Ambos os espectros foram deconvolucionados utilizando o software

Fityk, e nas Figuras 4.3 (a) e (c) é apresentada a decomposição dos picos C1s em cinco componentes Gaussianas, referentes às ligações: C=C (~284,9 eV), C-O (~285,8 eV), C=O (287,5 eV), -COO- (289,3 eV), e a última em 290,8 eV atribuída às transições $\pi-\pi^*$ ^{48,58}.

As deconvoluções dos espectros de O1s são apresentadas nas Figuras 4.3 (b) e (d) usando três picos. O primeiro está localizado na faixa de 531,0 a 531,4 eV, atribuído às duplas ligações entre os átomos de carbono e oxigênio. O segundo pico, na faixa de 534,6 a 536,1 eV, atribuído às ligações simples carbono oxigênio e o terceiro em 534,0 eV, referente aos grupos carboxila⁵⁸. A partir dos espectros de XPS foi possível obter o teor de oxigênio das amostras de VACNT antes e após a funcionalização por plasma de oxigênio, sendo verificado que este aumentou de 4,9% para 21,4% após o tratamento.

O aumento do teor de oxigênio nas amostras de VACNT-GO sugere a formação de folhas de grafeno funcionalizadas com grupos oxigenados, daí o material ter sido nomeado como um compósito de VACNT e óxido de grafeno. No entanto, para assim poder ser de fato denominado, a razão C:O foi calculada para a amostra de VACNT-GO. Para ser classificado como óxido de grafeno, o material carbonáceo precisa apresentar uma razão C:O entre 1,3 e 2,25⁵⁹. Em uma primeira estimativa, a razão C:O para a amostra de VACNT-GO foi igual a 6, estando, portanto, fora da faixa sugerida para óxido de grafeno. Embora a razão C:O tenha ficado em desacordo com o reportado pela literatura, duas considerações foram tomadas para a correção deste valor previamente calculado. Primeiramente, por meio das imagens de MEV apresentadas anteriormente (Seção 4.1.1), ficou evidente que o plasma de oxigênio atuou principalmente sobre as pontas dos VACNT. Portanto, os grupos oxigenados deveriam estar concentrados nesta porção dos VACNT-GO, correspondente a aproximadamente até 10 μm abaixo da superfície do filme de VACNT, cujo comprimento total foi de 40 μm . Enquanto isso, em segundo lugar, é sabido que a análise de XPS fornece o teor de oxigênio geral da amostra, não localizando os grupos

oxigenados pela amostra. Consequentemente, a razão C:O calculada previamente pôde ser corrigida dividindo-a por quatro, uma vez que a maior parte dos grupos oxigenados responsáveis pelo teor de oxigênio calculado encontram-se localizados em um quarto da amostra. Fazendo-se isso, o valor final da razão C:O para os VACNT-GO foi de 1,5, no qual esta dentro da faixa estipulada para materiais a base de óxido de grafeno, e justificando finalmente a nomenclatura dada ao material produzido.

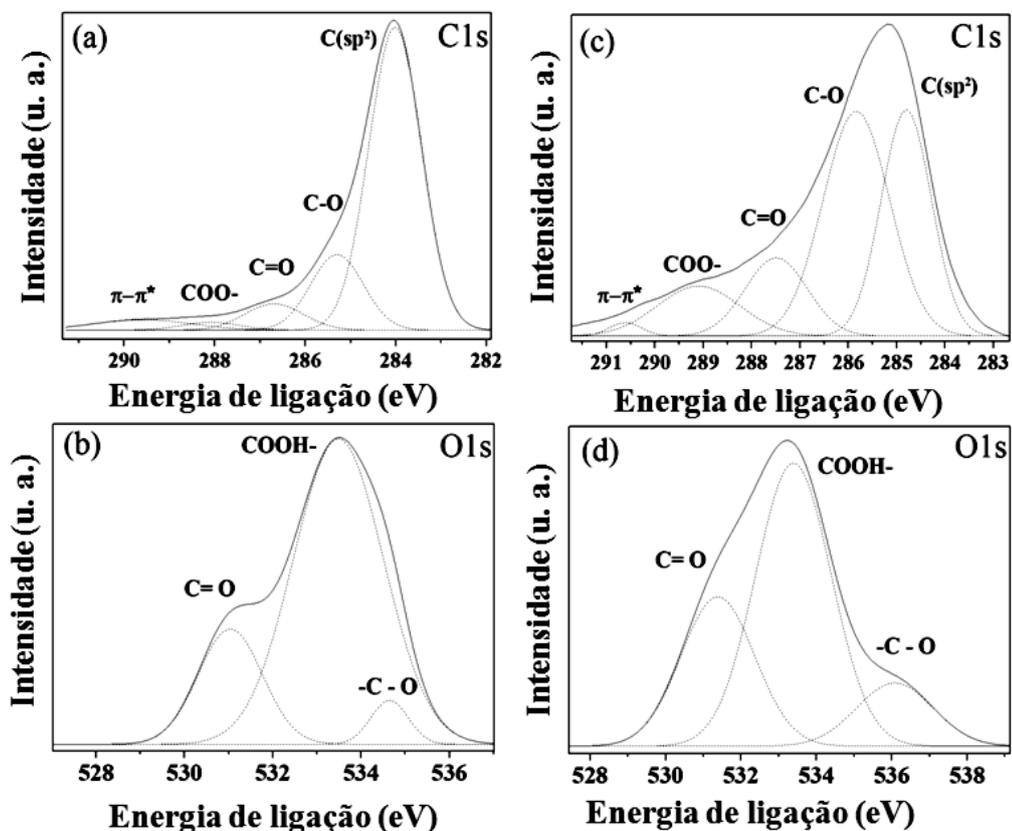


FIGURA 4.3 - Espectro XPS (C1s) obtido para a amostra de VACNT (a) antes e (c) após o tratamento por plasma de oxigênio. Espectro XPS (O1s) obtido para a amostra de VACNT (b) antes e (d) após o tratamento por plasma de oxigênio.

4.1.4 - Ângulo de contato

A comparação da molhabilidade da superfície dos filmes de VACNT antes e após o processo de tratamento por plasma de oxigênio usando um líquido polar (água) é apresentada nas Figuras 4.4 (a, b). A molhabilidade de

uma superfície sólida é classificada de acordo com o ângulo de contato apresentado por uma gota de água depositada sobre a referida superfície. Assim, há superfícies super-hidrofílicas (ângulo de contato = 0°), hidrofílicas ($0^\circ < \text{ângulo de contato} < 90^\circ$), hidrofóbicas ($90^\circ < \text{ângulo de contato} < 150^\circ$) e super-hidrofóbicas (ângulo de contato $> 150^\circ$)^{60,61}. Tendo-se em conta estes intervalos de ângulo de contato, pode ser observado que a superfície do filme de VACNT como crescido exibiu um comportamento super-hidrofóbico (Figura 4.4 (a)), apresentando um ângulo de contato de $\approx 157^\circ$. No entanto, após a funcionalização por plasma de oxigênio, o composto VACNT-GO adquiriu característica polar interagindo fortemente com a água, com um ângulo de contato de $\approx 0^\circ$ (Figura 4.4 (b)). Baseando-se no baixo ângulo de contato da amostra de VACNT-GO, pode-se concluir que o tratamento por plasma de oxigênio alterou significativamente a molhabilidade da superfície das amostras de VACNT, passando a ser super-hidrofílica.

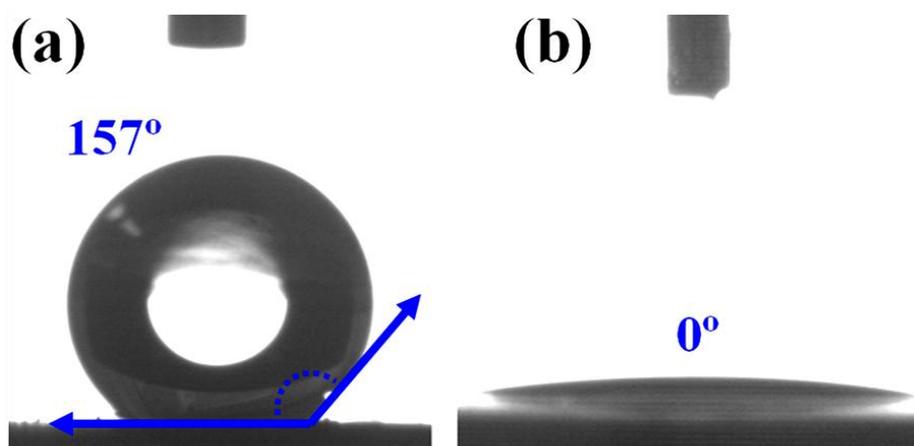


FIGURA 4.4 - Imagens de microscopia ótica (ampliação de 200 vezes) do ângulo de contato entre a água deionizada e a amostra de (a) VACNT e (b) VACNT-GO.

4.1.5 - Comportamento eletroquímico

O comportamento eletroquímico do eletrodo montado utilizando os filmes de VACNT-GO, chamado deste ponto em diante como eletrodo VACNT-

GO, foi estudado usando como sonda eletroquímica o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$. Na Figura 4.5 é mostrado o voltamograma cíclico obtido para uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se o eletrodo de VACNT-GO. Como pode ser observado, o par redox apresentou um comportamento reversível, com um valor de ΔE_p igual a 59 mV, como atribuído para um processo reversível^{62,63}, indicando que o eletrodo de VACNT-GO promoveu uma rápida transferência eletrônica. A fim de se investigar melhor o comportamento eletroquímico verificado para o eletrodo de VACNT-GO, estudos adicionais de voltametria cíclica foram realizados para determinação da área eletroativa e da constante de transferência heterogênea de elétrons para o material de eletrodo proposto.

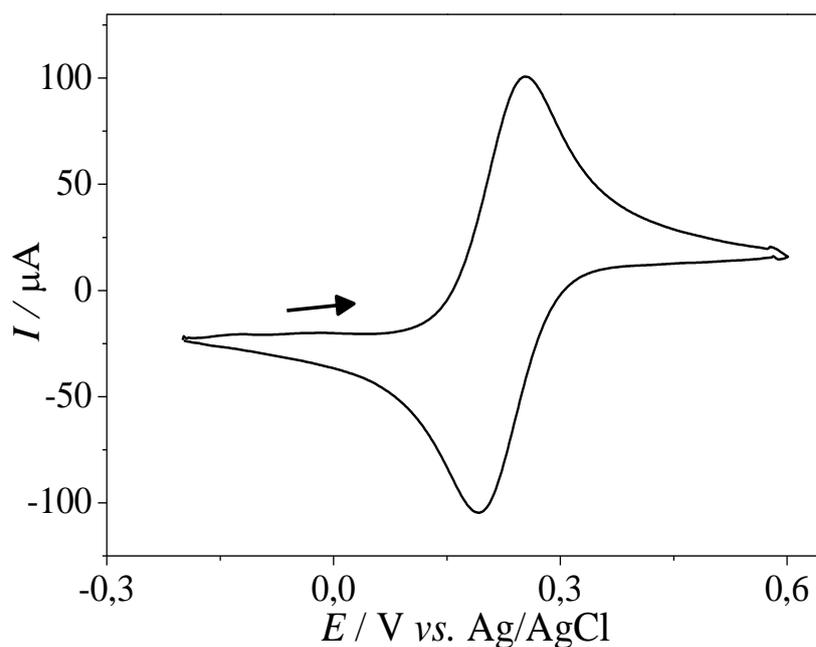


FIGURA 4.5 - Voltamograma cíclico ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtido para uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se o eletrodo de VACNT-GO.

4.1.5.1 - Determinação da área eletroativa do eletrodo de VACNT-GO

Para a determinação da área eletroativa do eletrodo de VACNT-GO, foram realizados experimentos de voltametria cíclica conduzidos a diferentes velocidades de varredura ($10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$), para uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos registrados, bem como os gráficos de corrente de pico anódica (I_a) e catódica (I_c) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) encontram-se na Figura 4.6 (a, b). Verificou-se que com o aumento da velocidade de varredura, as correntes de pico anódica e catódica variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo foi totalmente controlado por difusão^{62,63}.

O cálculo da área eletroativa foi realizado utilizando-se a equação de Randles-Sevcik (Eq. 1):

$$I_p = \pm(2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2} \quad (1)$$

sendo I_p a corrente de pico anódica ou catódica, n o número de elétrons envolvidos no processo redox, A a área eletroativa do eletrodo, D o coeficiente de difusão, C a concentração da espécie eletroativa e $v^{1/2}$ a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Considerando-se $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ⁶³, $n = 1$ e $C = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$, o valor da área eletroativa foi calculado comparando-se o valor do coeficiente angular obtido para as relações de corrente de pico anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura com o coeficiente angular da Equação de Randles-Sevcik (Eq. 1). Os valores determinados de coeficiente angular e área eletroativa encontram-se na Tabela 4.2. Com base nesta, verifica-se que a área eletroativa média do eletrodo de

VACNT-GO foi igual a $0,79 \pm 0,01 \text{ cm}^2$. A área geométrica do eletrodo utilizado foi de $1,00 \text{ cm}^2$, o que significa que em torno de 80% da área eletródica se encontra disponível para os processos de transferência eletrônica.

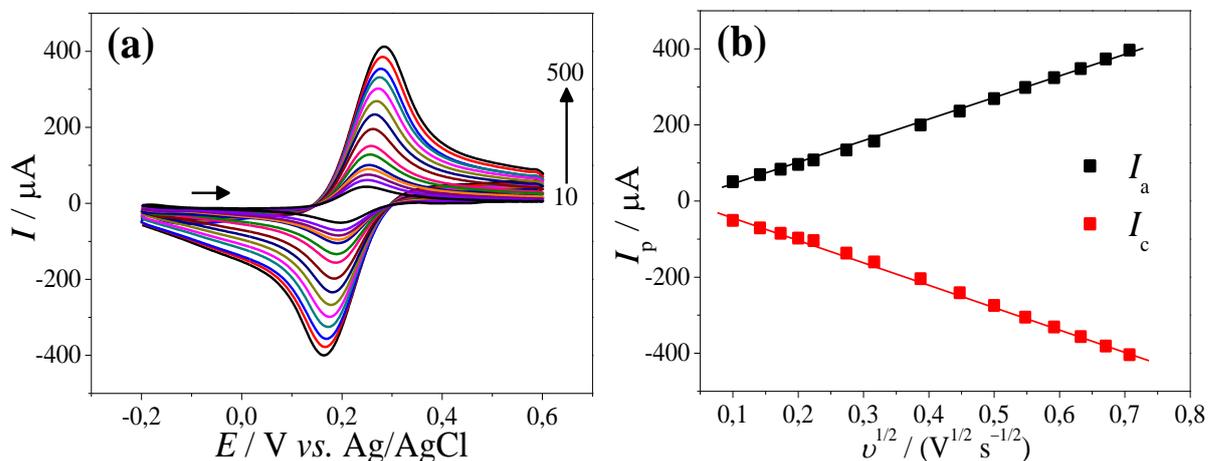


FIGURA 4.6 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ($10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$) para o eletrodo de VACNT-GO em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (b) Gráfico com o registro de I_p vs. $v^{1/2}$ para correntes de pico anódica (I_a) e catódica (I_c).

TABELA 4.2 - Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica e catódica em função de $v^{1/2}$

Curva	Coefficiente angular ($\text{A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$)	Área eletroativa (cm^2)	Área eletroativa média (cm^2)
Corrente anódica	$5,78 \times 10^{-4}$	0,78	$0,79 \pm 0,01$
Corrente catódica	$-5,92 \times 10^{-4}$	0,80	

4.1.5.2 - Determinação da constante de transferência heterogênea de elétrons e estabilidade de resposta para o eletrodo de VACNT-GO

Tendo em vista o interesse em elucidar de forma mais detalhada o potencial de aplicação eletroquímica do material eletródico proposto neste trabalho, seguiu-se para o cálculo da constante de transferência heterogênea de

elétrons para o eletrodo de VACNT-GO. Para tanto, os voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura (Figura 4.6 (a)) renderam as informações necessárias para o cumprimento deste objetivo. Analisando-se os voltamogramas da Figura 4.6 (a) verifica-se que com o aumento da velocidade de varredura, os potenciais de pico anódico foram deslocados para valores mais positivos enquanto os potenciais de pico catódico deslocaram-se para potenciais mais negativos, resultando em um aumento da separação dos potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p). Desta forma, o comportamento reversível observado em baixas velocidades de varredura, tendeu a assumir um comportamento quase-reversível para velocidades de varredura acima de 50 mV s^{-1} , com uma separação de picos superior a 59 mV (Figura 4.7).

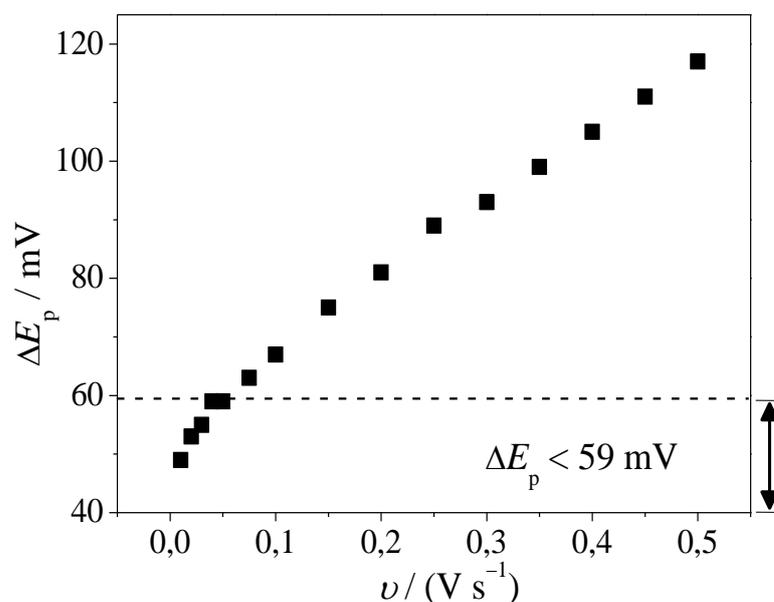


FIGURA 4.7 - Dependência entre a separação dos potenciais de pico (ΔE_p) e a velocidade de varredura (ν).

Para o cálculo da constante de transferência heterogênea de elétrons (k°) para o eletrodo de VACNT-GO foi utilizado o método de NICHOLSON⁶⁴, amplamente aplicado no cálculo da constante de transferência de elétrons para sistemas quase-reversíveis controlados por difusão. Neste método, o valor de k° é obtido empregando-se a Eq. 2:

$$\Psi = k^{\circ}[\pi D n v F / (RT)]^{-1/2} \quad (2)$$

sendo Ψ um parâmetro cinético e os demais termos possuem seus significados usuais. Os valores de Ψ foram calculados utilizando-se a Eq. 3 proposta por LAVAGNINI et al.⁶⁵, que relaciona Ψ aos valores de ΔE_p equivalentes a cada velocidade de varredura:

$$\Psi = (-0,6288 + 0,0021n\Delta E_p)/(1 - 0,017n\Delta E_p) \quad (3)$$

A partir dos valores calculados de Ψ , um gráfico de Ψ versus $32,79 v^{-1/2}$ foi obtido (Figura 4.8), a partir do qual k° pôde ser determinado. O fator $32,79$ corresponde ao termo $[\pi D n F / (RT)]^{-1/2}$ da Equação de Nicholson, calculado considerando-se $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $T = 298,15 \text{ K}$. A equação da reta obtida para o gráfico de Ψ versus $32,79 v^{-1/2}$, para valores de velocidade de varredura acima de 150 mV s^{-1} , foi (Eq. 4):

$$\Psi = -1,2 + 0,034(32,79 v^{-1/2}), r = 0,98 \quad (4)$$

Como o termo $[\pi D n F / (RT)]^{-1/2}$ já foi contabilizado, o coeficiente angular da equação da reta (Eq. 4) fornece diretamente o valor de k° , sendo, portanto, igual a $3,4 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$. Para se ter uma ideia da magnitude desta constante de transferência heterogênea de elétrons, o valor de k° calculado para o eletrodo de VACNT-GO foi em torno de 94 vezes maior do que o determinado para um eletrodo de pasta de carbono ($3,6 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$)⁶⁵, 33 vezes maior que aquele obtido para um eletrodo de carbono vítreo ($1,02 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, obtido neste trabalho) e 11 vezes maior que aquele encontrado para um eletrodo de

VACNT ligados via ligações tio-éster a um substrato de silício tipo-p ($2,98 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$)⁶⁶.

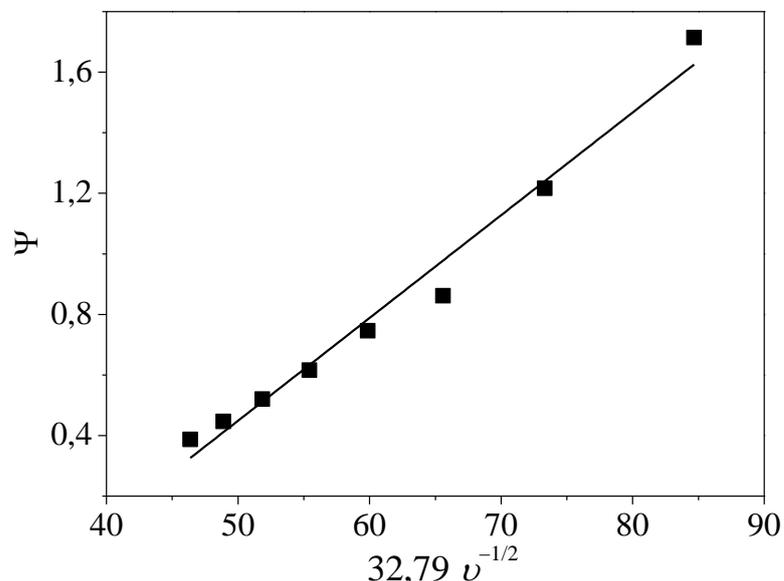


FIGURA 4.8 - Gráfico de Ψ vs. $32,79 v^{-1/2}$ obtido para o eletrodo de VACNT-GO em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Em seguida, a estabilidade de resposta do eletrodo de VACNT-GO foi avaliada realizando-se várias medidas de voltametria cíclica a uma velocidade de varredura fixa de 100 mV s^{-1} para a mesma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Assim, 100 voltamogramas cíclicos foram registrados e os resultados encontram-se na Figura 4.9. Os voltamogramas cíclicos obtidos para o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ sobre o eletrodo de VACNT-GO permaneceram praticamente constantes durante os vários ciclos de potencial. O valor de ΔE_p não sofreu variação e as correntes de pico anódica e catódica apresentaram desvio-padrão relativo de 0,33% e 0,29%, respectivamente. Estes resultados demonstram a alta estabilidade de resposta do eletrodo de VACNT-GO.

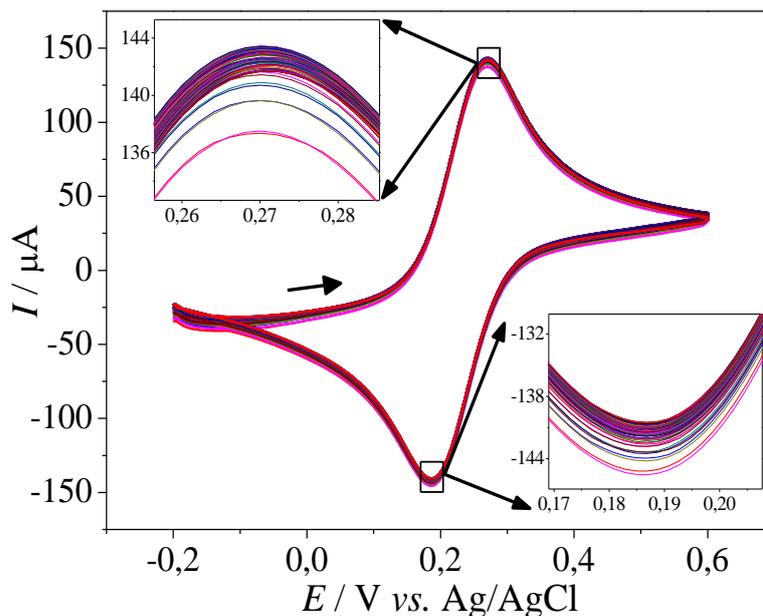


FIGURA 4.9 - Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de VACNT-GO.

4.2 - Determinação voltamétrica de atorvastatina cálcica utilizando o eletrodo de VACNT-GO

Tendo como base o bom desempenho eletroquímico demonstrado pelo eletrodo de VACNT-GO através dos estudos de caracterização eletroquímica apresentados na seção anterior, investigou-se em seguida a utilidade deste novo material de eletrodo como sensor eletroquímico para a determinação de estatinas. O primeiro procedimento eletroanalítico desenvolvido consistiu na determinação voltamétrica da estatina atorvastatina cálcica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas, e os resultados obtidos são apresentados nas próximas subseções[#].

[#] Os resultados desta seção foram publicados no periódico *Analyst*: Tago A. Silva, Hudson Zanin, Fernando C. Vicentini, Evaldo J. Corat e Orlando Fatibello-Filho. "Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of atorvastatin calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode", *Analyst*, 139, 2832-2841, 2014.

4.2.1 - Comportamento eletroquímico da molécula de atorvastatina cálcica

Inicialmente, o comportamento voltamétrico do fármaco ATOR foi estudado por voltametria cíclica utilizando o eletrodo de VACNT-GO. Na Figura 4.10 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$) contendo 20% em volume de metanol utilizando o eletrodo de VACNT-GO e um eletrodo de carbono vítreo (GCE). O uso da porcentagem de 20% (v/v) de metanol no eletrólito suporte foi necessário para a manutenção do fármaco solubilizado, e o valor de 20% foi determinado mediante testes de solubilidade da ATOR em misturas hidroalcoólicas com diferentes teores de metanol.

Analisando-se o voltamograma apresentado na Figura 4.10, observa-se o surgimento de um pico de oxidação durante a varredura anódica de potenciais a +1,08 V, com ausência de um pico de redução durante a inversão da direção de varredura de potenciais. Este resultado indicou que a oxidação da molécula de ATOR é um processo irreversível, em concordância com o comportamento eletroquímico que tem sido reportado para a ATOR usando diferentes materiais de eletrodo: eletrodo de carbono vítreo a +1,03 V⁴², eletrodo de diamante dopado com boro a +0,98 V⁴² e eletrodo de pasta de carbono a +1,07 V⁴⁴. Além disso, a comparação com o eletrodo de GCE demonstrou o excelente desempenho do eletrodo de VACNT-GO para a determinação de ATOR, com a obtenção de um aumento ascentuado da densidade de corrente obtida naquele eletrodo.

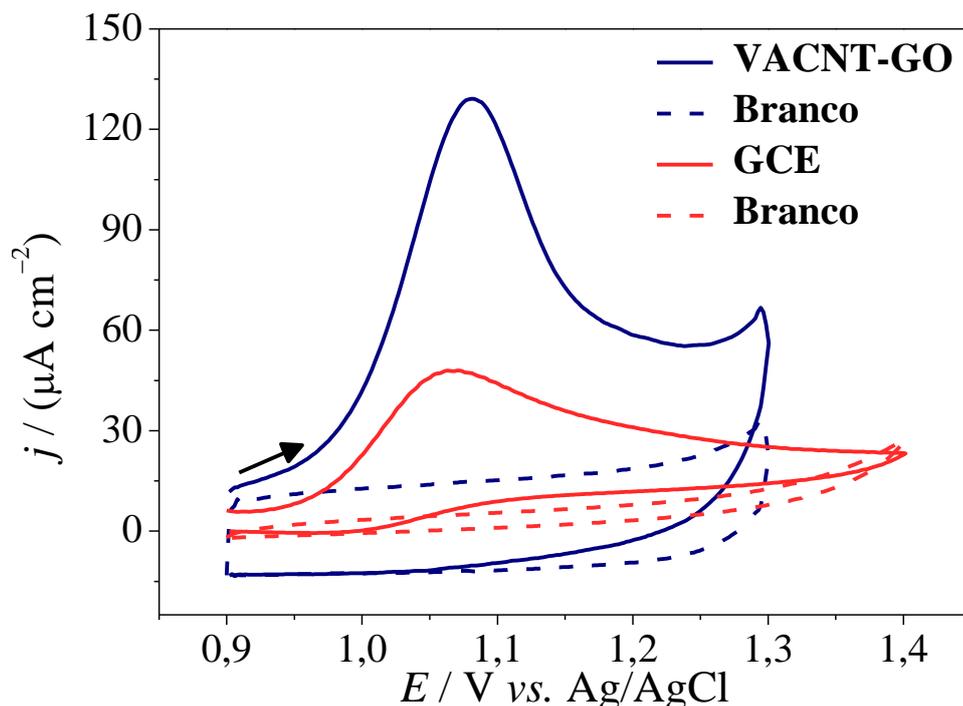


FIGURA 4.10 - Voltamograma cíclico obtido para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$) contendo 20% (v/v) de metanol, usando o eletrodo de VACNT-GO e um GCE. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. “Branco” se refere ao voltamograma registrado para a mistura tampão/metanol na ausência do composto ATOR.

4.2.2 - Estudo do efeito do eletrólito suporte

Estudos de voltametria cíclica foram realizados de forma a identificar a melhor composição do eletrólito suporte para a determinação eletroquímica da ATOR utilizando o eletrodo de VACNT-GO. Para tanto, diferentes eletrólitos suporte foram investigados usando uma concentração fixa de ATOR, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os seguintes eletrólitos foram investigados: (a) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$); (b) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (c) H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; (d) tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$); (e) Tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$) e (f) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos obtidos em cada condição de eletrólito suporte encontram-se na Figura 4.11.

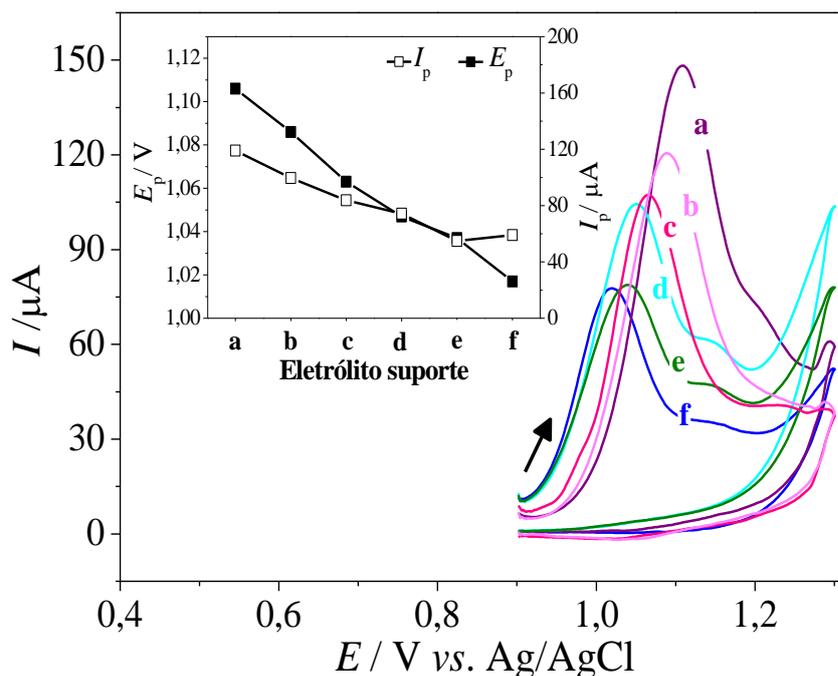


FIGURA 4.11 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em diferentes eletrólitos suporte contendo 20% (v/v) de metanol: (a) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$); (b) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (c) H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; (d) tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$); (e) Tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond}} = 4,5$) e (f) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de VACNT-GO. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido as curvas de E_p e I_p vs. eletrólito suporte.

A partir dos valores de potencial (E_p) e corrente de pico (I_p) obtidos (inseto da Figura 4.11) para a oxidação da molécula de ATOR nos diferentes tipos de eletrólito suporte, pode-se concluir que o tampão fosfato proporcionou o sinal analítico de maior magnitude. No entanto, o potencial de oxidação da ATOR no caso do tampão fosfato foi ligeiramente deslocado para um valor mais positivo em comparação com os demais tipos de eletrólitos (inseto da Figura 4.11). Tendo em conta os propósitos analíticos deste trabalho, decidiu-se trabalhar com o tampão fosfato como eletrólito suporte, uma vez que a obtenção de uma corrente de pico mais alta pode levar a melhores parâmetros analíticos, como alta sensibilidade (inclinação da curva analítica) e menor limite de detecção (maior detectabilidade).

Em seguida, o efeito do pH_{cond} do tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi estudado na faixa de 2,0 a 8,0. Os voltamogramas cíclicos obtidos para cada condição de pH (Figura 4.12) demonstraram que o pH influenciou diretamente a

reação de oxidação da ATOR. O processo de oxidação da ATOR verificado previamente apresentou maior intensidade de corrente em soluções mais ácidas, e com o aumento do pH o sinal de oxidação da ATOR foi gradualmente desaparecendo, até não ser mais observado em $\text{pH}_{\text{cond}} = 8,0$. Assim, o tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$ foi selecionado para os estudos posteriores.

Na Figura 4.12 encontra-se no inserto um gráfico do potencial de pico de oxidação (E_p) versus pH na faixa de 2,0 a 7,0. Uma relação linear entre E_p e pH foi obtida nesta faixa de pH, seguindo a Eq. 5:

$$E_p = 1,16 - 0,032\text{pH} , r = 0,981 \quad (5)$$

O coeficiente angular da Eq. 5 ($0,032 \text{ V/pH}$) foi próximo ao valor teórico de $0,0296 \text{ V/pH}$, indicando que a razão entre o número de elétrons e de prótons envolvidos na etapa determinante da reação é $2^{42,44}$. Esta observação suporta a reação de eletrooxidação que tem sido proposta para a ATOR, envolvendo a oxidação do anel pirrol (2 elétrons e 1 próton)^{42,44}, como mostrado na Figura 4.13.

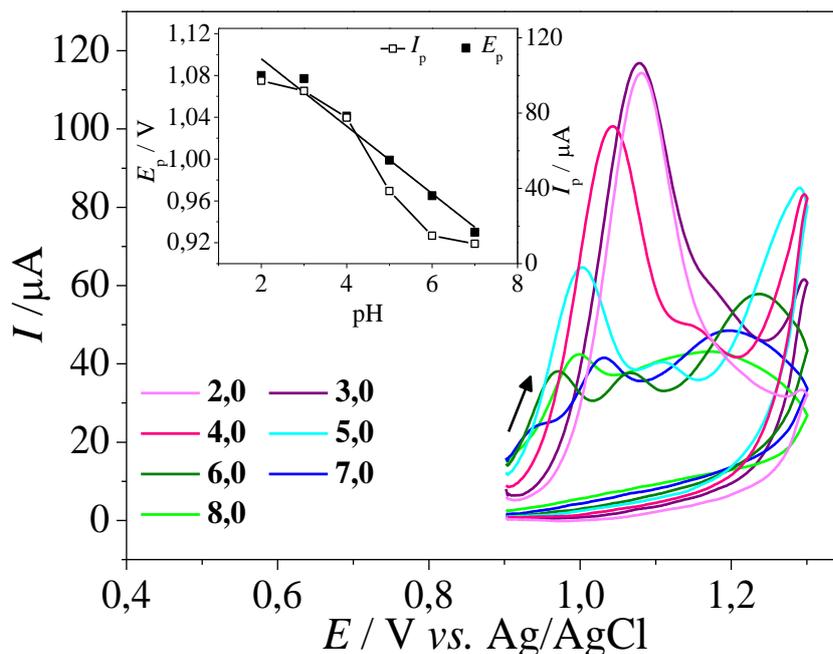


FIGURA 4.12 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} preparada em tampão fosfato $0,2$ mol L^{-1} (20% v/v metanol) a diferentes pHs condicionais usando o eletrodo de VACNT-GO. Inserido E_p vs. pH e I_p vs. pH. $v = 50$ mV s^{-1} .

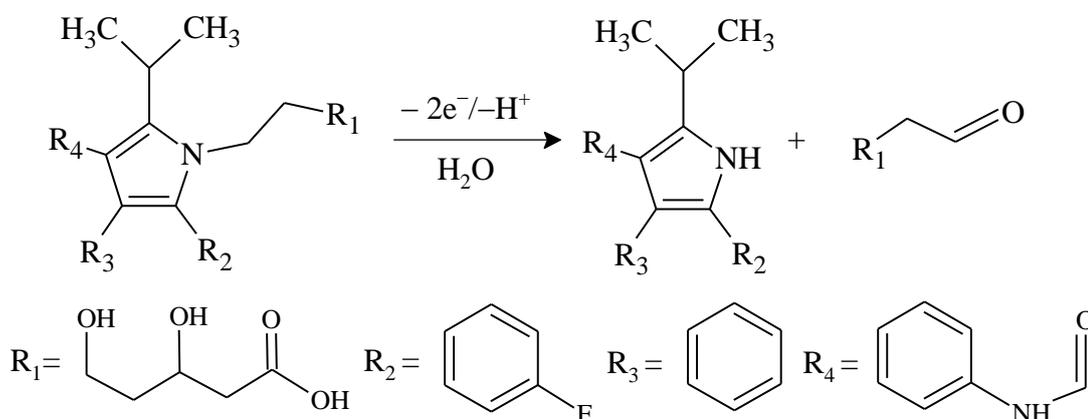


FIGURA 4.13 - Reação de eletrooxidação proposta para a molécula de ATOR (Adaptado da Ref.⁴⁴).

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

A viabilidade de se utilizar uma etapa de pré-concentração antes das medidas voltamétricas foi avaliada, e, assim, o efeito do potencial e do tempo de pré-concentração sobre a resposta voltamétrica de uma solução de ATOR $5,0 \times$

$10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi investigado. Inicialmente, foi estudada a influência do potencial de pré-concentração na faixa de 0,0 V a +0,8 V, fixando-se o tempo de pré-concentração em 60 s. Os valores de corrente de pico registrados nesta gama de potenciais foram praticamente constantes, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 4.14 (a). Sendo assim, trabalhou-se com potencial de circuito aberto nas etapas de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo.

O tempo de pré-concentração foi em seguida avaliado na faixa de 30 a 300 s. A corrente de pico aumentou até o tempo de 180 s, mantendo-se praticamente constante para os tempos de pré-concentração superiores (Figura 4.14 (b)). O alcance do patamar de corrente de pico para tempos superiores a 180 s indica que neste intervalo de tempo, a superfície eletródica foi saturada pelas moléculas do analito. Desta forma, fixou-se o tempo de pré-concentração em 180 s para os demais experimentos.

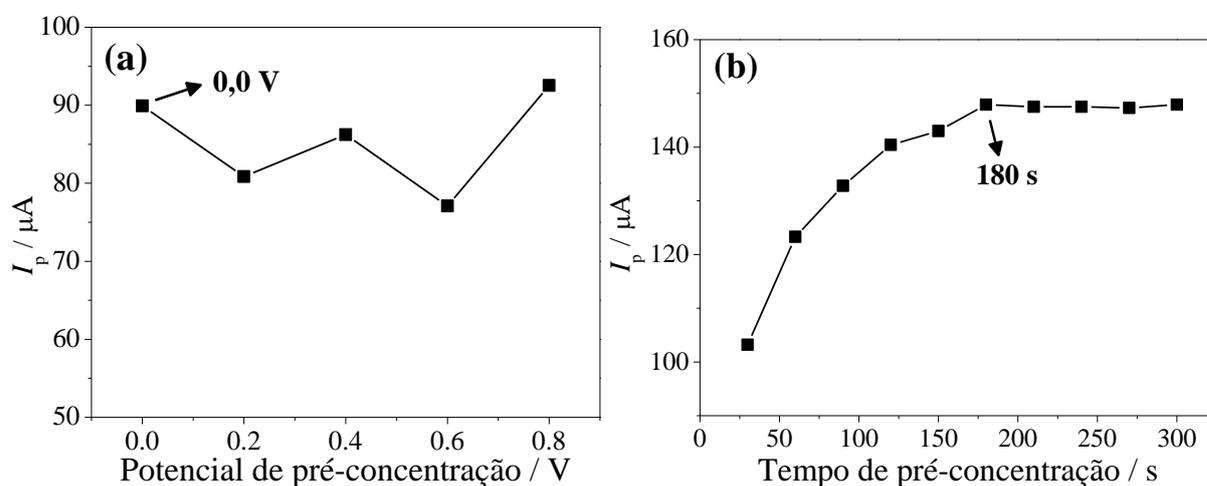


FIGURA 4.14 - Efeito do (a) potencial de pré-concentração e (b) do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico anódica para a determinação de ATOR.

4.2.4 - Determinação da constante de transferência heterogênea de elétrons para a eletrooxidação da molécula de atorvastatina cálcica

Para a determinação do parâmetro cinético constante de transferência heterogênea de elétrons (k_s) para a eletrooxidação do fármaco ATOR, experimentos de voltametria cíclica foram realizados em diferentes velocidades de varredura. Os voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura encontram-se apresentados na Figura 4.15 (a). Foi verificado que o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) variou linearmente com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$), com um coeficiente angular igual a 1,52, mais próximo do valor típico de 1,0 reportado para processos controlados por adsorção, (Figura 4.15 (b))⁶³. Desta forma, para o cálculo de k_s para a oxidação da molécula de ATOR, a teoria de Laviron para processos eletródicos irreversíveis e controlados por adsorção foi aplicada. Segundo a abordagem de Laviron para sistemas irreversíveis, o potencial de pico é linearmente dependente do logaritmo natural da velocidade de varredura (Eq. 6):

$$E_p = E^{o'} - \left(\frac{RT}{anF}\right) \ln \left(\frac{RTk_s}{anF}\right) + \left(\frac{RT}{anF}\right) \ln v \quad (6)$$

onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura ambiente ($298,15 \text{ K}$), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) e n é o número de elétrons envolvidos no processo redox. Uma relação linear entre E_p e $\ln v$ foi obtida, como ilustrado pela Figura 4.15 (c). A equação da reta obtida foi (Eq. 7):

$$E_p = 1,19 + 0,026 \ln v, r = 0,996 \quad (7)$$

Comparando-se o coeficiente angular da reta obtida com o coeficiente angular da relação de Laviron (Eq. 6), o valor de αn foi facilmente calculado, sendo obtido um valor de 0,99. Assumindo o valor de 0,5 para α , um valor tipicamente determinado para a oxidação de moléculas orgânicas, o número de elétrons envolvidos na oxidação da molécula de ATOR foi calculado como sendo igual a 1,98 ($\approx 2,0$), o que sustenta a reação de eletrooxidação proposta anteriormente (Figura 4.13). Assim, conhecendo-se o valor de αn , foi calculado o valor de k_s . Isto foi possível pela comparação do coeficiente linear da reta da Eq. 7, com o coeficiente linear dado pela equação de Laviron (Eq. 6). O coeficiente linear da equação de Laviron envolve o valor do potencial padrão E° , o qual foi obtido pelo intercepto da curva de E_p versus v . Assim a constante de transferência heterogênea de elétrons k_s foi calculada, sendo obtido o valor de $0,26 \text{ s}^{-1}$.

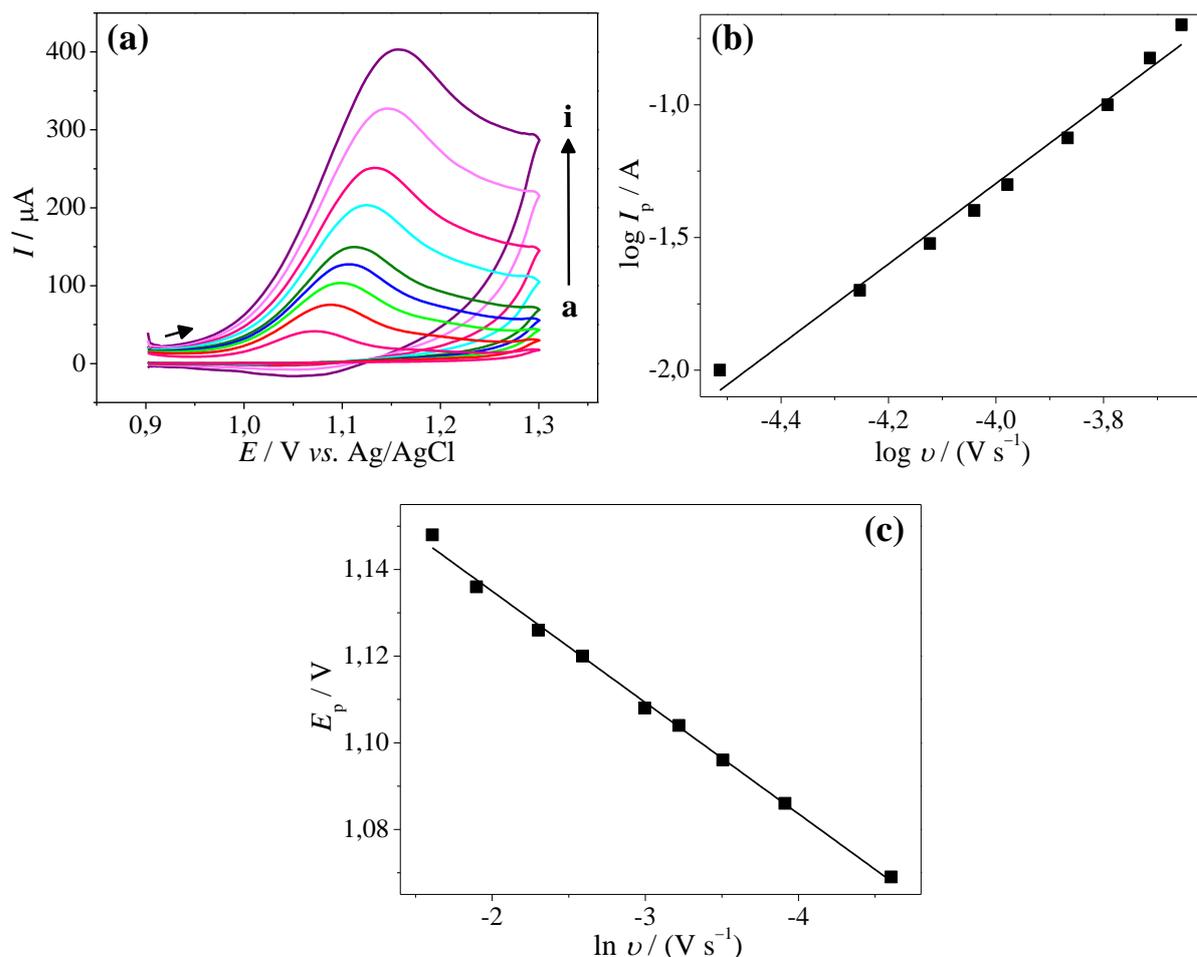


FIGURA 4.15 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} preparada em tampão fosfato $0,2$ mol L^{-1} contendo 20% (v/v) de metanol ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$) em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 75 (g) 100 (h) 150 e (i) 200 mV s^{-1} . (b) Gráfico de $\log I_p$ versus $\log v$. (c) Variação de (E_p) versus $\ln v$.

4.2.5 - Determinação de atorvastatina cálcica por voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada e por pulso diferencial

Para o desenvolvimento do procedimento voltamétrico para determinação de ATOR utilizando o eletrodo de VACNT-GO, foram avaliadas as técnicas de Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Onda Quadrada (SWAdASV, do inglês “Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) e por Pulso Diferencial (DPAdASV, do inglês “Differential Pulse Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”). Em um primeiro momento,

os parâmetros experimentais de cada técnica foram otimizados utilizando uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 20% (v/v) de metanol ($\text{pH}_{\text{cond}} = 2,0$). A Tabela 4.3 reúne os intervalos em que cada parâmetro foi estudado e os respectivos valores selecionados. Os valores selecionados para cada parâmetro foram obtidos tendo em conta a condição na qual a maior magnitude de corrente anódica foi registrada e com menor contribuição da corrente de fundo.

TABELA 4.3 - Parâmetros experimentais estudados para as técnicas de SWAdASV e DPAdASV e os respectivos valores selecionados para a determinação de ATOR

Técnica	Parâmetro	Intervalo	Selecionado
SWAdASV	Frequência (Hz)	10 a 70	40
	Amplitude (mV)	5 a 100	80
	Incremento (mV)	1 a 10	3
DPAdASV	Veloc. de varredura* (mV s^{-1})	2,5 a 20	10
	Amplitude (mV)	10 a 100	90
	Tempo de modulação (ms)	5 a 20	10

*Velocidade de varredura de potencial.

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foi avaliado o desempenho analítico de cada técnica voltamétrica para a determinação de ATOR. Sendo assim, foram construídas as respectivas curvas analíticas empregando-se diferentes concentrações de ATOR, obtidas a partir de sucessivas adições de pequenas alíquotas de soluções estoque do fármaco no eletrólito suporte.

As Figuras 4.16 (a) e (b) contem os voltamogramas de SWAdAS e DPAdAS registrados para diferentes níveis de concentração de ATOR, e o inserto nas figuras as respectivas curvas analíticas. Os parâmetros analíticos obtidos para a determinação de ATOR empregando-se as técnicas de

SWAdASV e DPAdASV são apresentados na Tabela 4.4. Os limites de detecção (LD) de cada técnica foram calculados com base na Eq. 8:

$$LD = 3 \times s / m \quad (8)$$

sendo s é o desvio-padrão de 10 medidas do branco (apenas eletrólito suporte) e m é o valor do coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade).

A partir da Tabela 4.4 verifica-se que a técnica voltamétrica que apresentou o melhor desempenho analítico para a determinação de ATOR foi a DPAdASV. Embora a sensibilidade analítica da técnica de SWAdASV tenha sido superior aquela obtida empregando-se DPAdASV, o emprego desta última permitiu a determinação de ATOR em uma faixa linear de concentrações mais ampla, em concentrações mais baixas e com melhor correlação, sendo obtido um valor de LD significativamente menor. O melhor desempenho da DPAdASV pode ser explicado pela menor magnitude da corrente de fundo em comparação à SWAdASV, Figura 4.17. Desta forma, nos estudos posteriores envolvendo a quantificação do fármaco ATOR foi utilizada a técnica de DPAdASV.

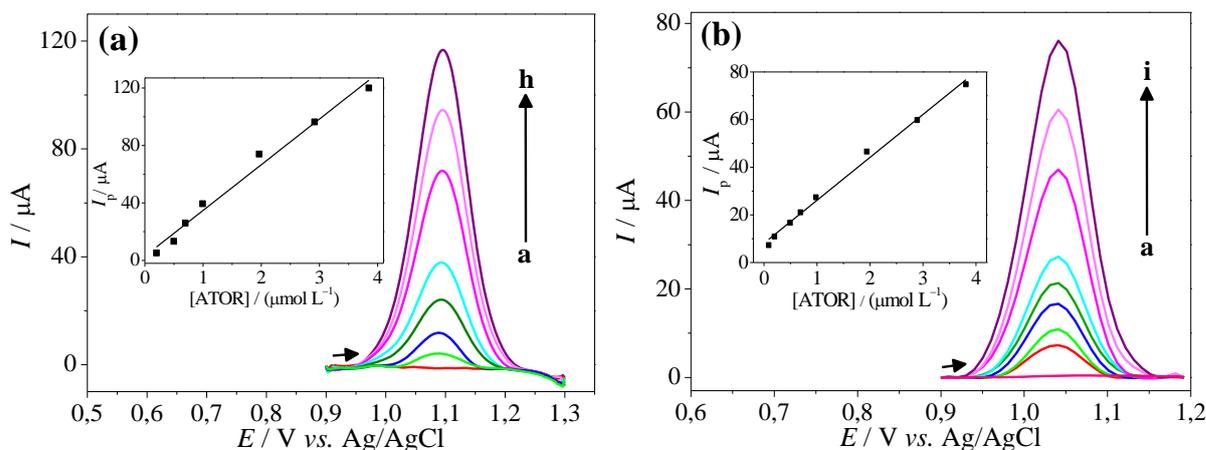
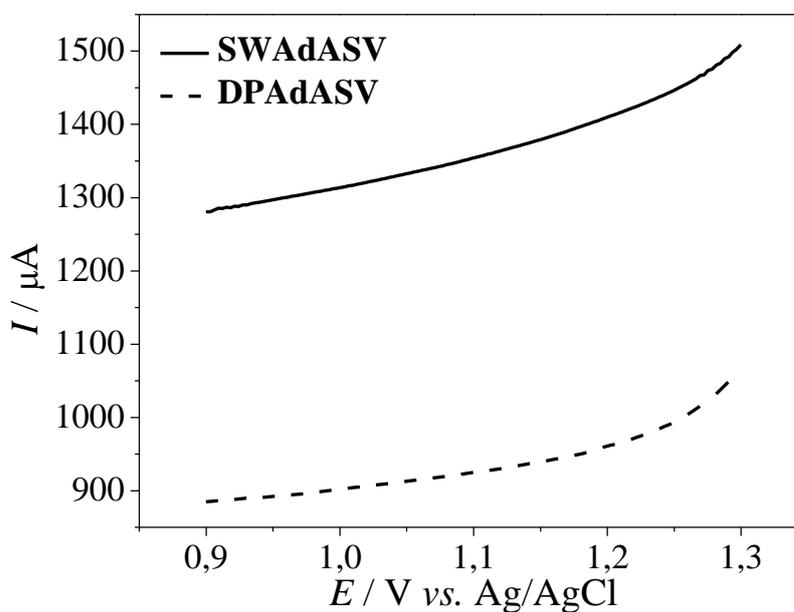


FIGURA 4.16 - (a) Voltamogramas de SWAdAS obtidos para diferentes concentrações de ATOR: (a) 0,00; (b) 0,20; (c) 0,49; (d) 0,69; (e) 0,99; (f) 1,96; (g) 2,91 e (h) 3,85 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (Inserida a curva analítica obtida). (b) Voltamogramas de DPAdAS obtidos para diferentes concentrações de ATOR: (a) 0,00; (b) 0,09; (c) 0,20; (d) 0,50; (e) 0,69; (f) 0,98; (g) 1,94; (h) 2,89 e (i) 3,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (Inserida a curva analítica obtida).

TABELA 4.4 - Parâmetros analíticos obtidos para a determinação de ATOR utilizando as técnicas de SWAdASV e DPAdASV

Parâmetro	Técnica	
	SWAdASV	DPAdASV
Faixa linear ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	0,20 a 3,85	0,09 a 3,81
Sensibilidade ($\mu\text{A mol}^{-1}$ L)	$3,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
Coefficiente de correlação (r)	0,990	0,994
LD	$7,6 \times 10^{-8}$	$9,4 \times 10^{-9}$

FIGURA 4.17 - Voltamogramas de SWAdAS e DPAdAS obtidos em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ contendo 20% (v/v) de metanol (pH_{cond} = 2,0).

Outros procedimentos eletroanalíticos têm sido propostos para a determinação de ATOR, utilizando diferentes materiais de eletrodo. Os parâmetros analíticos obtidos nestes procedimentos foram comparados com os obtidos empregando-se o método voltamétrico de DPAdASV proposto neste trabalho (Tabela 4.5). Como pode ser visto, o procedimento utilizando o eletrodo de VACNT-GO como sensor eletroquímico e a técnica de DPAdASV forneceu uma faixa linear de concentrações comparável àquelas obtidas usando

eletrodos de carbono vítreo^{42,43} e de diamante dopado com boro⁴², e um LD menor do que todos aqueles reportados para estes eletrodos. Abbar e Nandibewoor⁴⁴, usando um eletrodo de pasta de carbono, apresentaram um procedimento de voltametria de onda quadrada com uma faixa linear de concentrações de ATOR maior do que a apresentada neste trabalho, e um LD ligeiramente inferior ao atingido utilizando o eletrodo de VACNT-GO. Entretanto, no procedimento reportado por ABBAR e NANDIBEWOR⁴⁴, uma pré-etapa de ativação do eletrodo de trabalho foi necessária, além do uso do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio no eletrólito suporte como um agente intensificador. Portanto, o procedimento proposto neste trabalho pode ser considerado mais simples, sem a necessidade de utilização de compostos desta classe e sem qualquer pré-tratamento do sensor eletroquímico de VACNT-GO, com a obtenção de um LD da mesma ordem de grandeza.

Em um trabalho reportado recentemente, KAMALZADEH & SHAHROKHIAN⁴⁵ apresentaram o uso de um GCE modificado com filmes do polímero condutor polipirrol (PPY, do inglês “Polypyrrole”) contendo CNTs para a determinação de ATOR por voltametria de varredura linear (LSV, do inglês “Linear Sweep Voltammetry”). Neste procedimento, os parâmetros de desempenho analítico foram melhores do que o do procedimento proposto, no entanto, o uso de eletrodos modificados foi dispensado no presente trabalho.

TABELA 4.5 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o procedimento voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de VACNT-GO e para outros procedimentos eletroanalíticos reportados na literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa linear (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	Ref.
GCE	DPV	$9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^{-7}$	42
GCE	SWV	$9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-5}$	$2,05 \times 10^{-7}$	42
BDD	DPV	$9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-7}$	$2,27 \times 10^{-7}$	42
BDD	SWV	$9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-7}$	$1,31 \times 10^{-7}$	42
GCE	DPV	$2,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$	$5,95 \times 10^{-7}$	43
GCE	SWV	$2,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$	$4,70 \times 10^{-7}$	43
CPE-CTAB	DPV	$5,00 \times 10^{-8}$ a $1,00 \times 10^{-5}$	$4,08 \times 10^{-9}$	44
PPY/CNTs/ GCE	LSV	$5,00 \times 10^{-9}$ a $1,00 \times 10^{-7}$ e $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-6}$	$1,50 \times 10^{-9}$	45
VACNT- GO	DPAdASV	$9,00 \times 10^{-8}$ a $3,81 \times 10^{-6}$	$9,40 \times 10^{-9}$	Este trabalho

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “Glassy Carbon Electrode”); DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “Differential Pulse Voltammetry”); SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “Square Wave Voltammetry”); BDD – Diamante dopado com boro (do inglês “Boron-Doped Diamond”); CPE – Eletrodo de pasta de carbono (do inglês “Carbon Paste Electrode”); CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês “Cetyltrimethyl Ammonium Bromide”); PPY – Polipirrol (do inglês “Polypyrrole”); LSV – Voltametria de varredura linear (do inglês “Linear Sweep Voltammetry”).

4.2.6 - Estudos de repetibilidade, interferentes e adição/recuperação

A repetibilidade intra- e inter-dias do procedimento voltamétrico foi investigada. Para a repetibilidade intra-dia, 10 medidas sucessivas para duas soluções de ATOR de concentrações diferentes ($6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram realizadas em um mesmo dia. Foram obtidos valores de desvio-padrão relativo (RSD, do inglês “Relative Standard Deviation”) de 2,3% e 2,2% para as medidas de corrente de pico anódica para as soluções de ATOR $6,0 \times$

10^{-7} mol L⁻¹ e $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente. Para o estudo de repetibilidade inter-dias, foram comparados os valores de corrente de pico anódica registrados durante 3 dias para soluções de ATOR com as mesmas concentrações utilizadas no estudo de repetibilidade intra-dia. Fazendo-se isto, valores de RSD iguais a 6,0% e 5,9% foram obtidos. Assim, pode-se concluir que procedimento analítico proposto utilizando o eletrodo de VACNT-GO e a técnica de DPAdASV exibiu boa precisão de medidas.

A possível interferência de alguns compostos excipientes tipicamente encontrados em amostras de formulações farmacêuticas de ATOR sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de VACNT-GO foi estudada. Foram considerados como potenciais interferentes os seguintes compostos: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, lactose mono-hidratada, estearato de magnésio e carbonato de cálcio. Para avaliar o efeito destes compostos sobre a resposta voltamétrica, medidas foram realizadas para uma solução de ATOR $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ na ausência e presença dos excipientes em dois níveis diferentes de concentrações: 1:1 e 1:10 (analito:excipiente). Os valores de RSD obtidos pela comparação das correntes de pico anódica registradas na ausência e na presença de cada interferente em potencial encontram-se organizados na Tabela 4.6. Como pode ser observado, os excipientes considerados não apresentaram interferência significativa sobre a determinação voltamétrica de ATOR, um resultado que também foi confirmado pelos resultados dos estudos de adição e recuperação apresentados a seguir.

TABELA 4.6 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de ATOR a um nível de concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

Excipiente	Proporção (ATOR:Excipiente)	RSD (%)
Celulose microcristalina	1:1	+ 2,0
	1:10	- 5,1
Croscarmelose sódica	1:1	+ 0,9
	1:10	+ 2,3
Lactose mono-hidratada	1:1	+ 0,2
	1:10	+ 3,3
Estearato de magnésio	1:1	- 0,2
	1:10	+ 0,9
Carbonato de cálcio	1:1	- 1,8
	1:10	- 8,6

A possível ocorrência de efeitos de matriz das amostras farmacêuticas de ATOR também foi estudada, por meio de testes de adição e recuperação. Três amostras farmacêuticas de ATOR foram usadas, e os ensaios de adição e recuperação conduzidos utilizando-se duas concentrações de ATOR: $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A partir da Tabela 4.7, pode-se observar que porcentagens de recuperação no intervalo de 90 a 120% foram alcançadas, demonstrando, portanto, que o procedimento voltamétrico proposto não sofreu interferência significativa das matrizes destas amostras. Assim, ficou evidente que o eletrodo de VACNT-GO foi seletivo para determinação de ATOR em amostras farmacêuticas.

TABELA 4.7 - Resultados obtidos para os estudos de adição e recuperação de ATOR em amostras de formulações farmacêuticas

Amostra	[ATOR] ($\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$)		Recuperação* (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	1,0	1,1 \pm 0,1	110
	2,0	1,9 \pm 0,1	95
B	1,0	1,0 \pm 0,1	100
	2,0	1,8 \pm 0,1	90
C	1,0	1,2 \pm 0,1	120
	2,0	2,0 \pm 0,1	100

*Recuperação (%) = $[\text{ATOR}]_{\text{encontrado}}/[\text{ATOR}]_{\text{adicionado}} \times 100$.

4.2.7 - Determinação de atorvastatina cálcica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas

O procedimento voltamétrico desenvolvido utilizando o eletrodo de VACNT-GO e a técnica de DPAdASV foi aplicado para a determinação de ATOR em amostras farmacêuticas. ATOR também foi determinada empregando-se um método comparativo espectrofotométrico, e os resultados obtidos em triplicata usando-se os dois métodos são apresentados na Tabela 4.8. Os resultados obtidos empregando-se as duas técnicas analíticas foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste-*t* pareado a um nível de confiança de 95%. O valor de $t_{\text{exp.}}$ (0,257) foi menor do que o valor de $t_{\text{crítico}}$ (2,776), e, conseqüentemente, pode-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos aplicando-se os dois métodos. Além disso, os valores de RSD de comparação dos resultados dos dois métodos variaram entre -3,7% e +1,6%. Estes resultados mostram a excelente exatidão do procedimento voltamétrico proposto e a sua aplicabilidade na quantificação de ATOR em amostras de formulações farmacêuticas.

TABELA 4.8 - Determinação de ATOR em três amostras farmacêuticas empregando-se os métodos voltamétrico proposto (*P*) e comparativo (*C*) (n = 3)

Amostra	ATOR (mg/comprimido)			RSD* (%)
	Valor rotulado	Método comparativo, <i>C</i>	Método proposto, <i>P</i>	
A	10,0	10,9 ± 0,2	10,5 ± 0,7	- 3,7
B	20,0	21,1 ± 0,9	21,4 ± 0,8	+ 1,4
C	20,0	19,3 ± 0,4	19,6 ± 0,3	+ 1,6

*RSD = $(P - C) / C \times 100$.

Finalmente, o método voltamétrico proposto foi também empregado para a determinação de ATOR em duas amostras biológicas sintéticas: urina e soro humano. Duas concentrações de ATOR, $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foram adicionadas a estas amostras e determinadas em termos de porcentagem de recuperação da concentração de dopagem. Os resultados obtidos encontram-se organizados na Tabela 4.9. Como pode ser observado, porcentagens de recuperação satisfatórias na faixa de 96% a 111% foram obtidas, sendo um indicativo da potencialidade do procedimento proposto para a determinação de ATOR em amostras biológicas de fluidos humanos.

TABELA 4.9 - Resultados obtidos para a determinação voltamétrica de ATOR em amostras biológicas sintéticas de urina e soro humano (n = 3)

Amostra	ATOR ($\times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)		Recuperação* (%)
	Quantidade adicionada	Quantidade encontrada	
Urina	7,0	7,8 ± 0,1	111
	20,0	19,0 ± 1	95
Soro humano	7,0	7,2 ± 0,5	103
	20,0	19,2 ± 0,3	96

*Recuperação (%) = $[\text{ATOR}]_{\text{encontrado}} / [\text{ATOR}]_{\text{adicionado}} \times 100$.

4.3 - Determinação voltamétrica de rosuvastatina cálcica utilizando o eletrodo de VACNT-GO

Em continuação aos estudos de avaliação da potencialidade do uso do eletrodo de VACNT-GO como sensor eletroquímico para a determinação de fármacos da classe das estatinas, foi desenvolvido um segundo procedimento voltamétrico utilizando o eletrodo de VACNT-GO para a determinação da estatina rosuvastatina cálcica (ROS). O procedimento voltamétrico desenvolvido fez uso da oxidação da molécula de ROS, sendo este comportamento eletroquímico explorado pela primeira vez[#].

4.3.1 - Comportamento eletroquímico da molécula de rosuvastatina cálcica

O comportamento eletroquímico da molécula de ROS sobre o eletrodo de VACNT-GO foi avaliado por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0) utilizando o eletrodo VACNT-GO e um GCE são apresentados na Figura 4.18. Como pode ser verificado, houve a ocorrência de um processo de oxidação em +1,26 V, e após a inversão da direção de varredura de potenciais nenhum processo equivalente de redução foi observado. Desta forma, a oxidação da molécula de ROS pode ser caracterizada como um processo redox irreversível. A comparação do resultado obtido com o eletrodo de VACNT-GO com aquele coletado com o GCE demonstrou a grande habilidade do eletrodo de VACNT-GO para a determinação do fármaco ROS,

[#] Os resultados desta seção foram publicados no periódico *Sensors and Actuators B: Chemical*: Tiago A. Silva, Hudson Zanin, Fernando C. Vicentini, Evaldo J. Corat e Orlando Fatibello-Filho. "Electrochemical determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical and human body fluid samples using a composite of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide as electrode material", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 218, 51-59, 2015.

com a geração de uma elevada densidade de corrente para a oxidação da molécula de ROS.

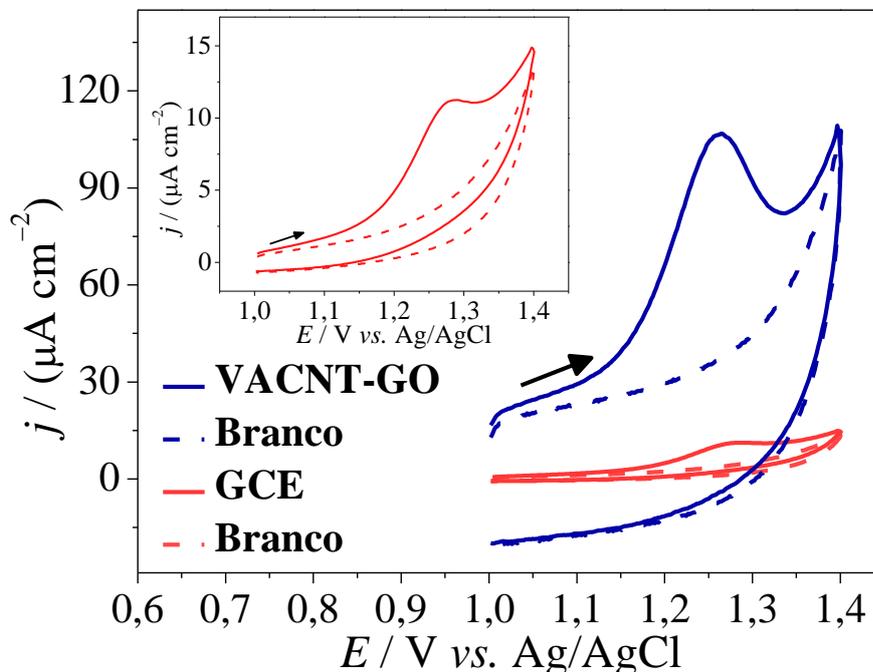


FIGURA 4.18 - Voltamograma cíclico obtido para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$), usando o eletrodo de VACNT-GO e um GCE. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. “Branco” se refere ao voltamograma registrado para o tampão fosfato na ausência do composto ROS. Inserido encontra-se os voltamogramas cíclicos obtidos para o GCE ampliados.

4.3.2 - Estudo do efeito do eletrólito suporte

A influência da composição do eletrólito suporte sobre a resposta eletroquímica da molécula de ROS foi estudada. Assim, medidas de voltametria cíclica para diferentes eletrólitos suporte contendo ROS em uma concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram realizadas. Os seguintes eletrólitos suporte foram investigados: (a) H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (b) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$); e (c) tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). A Figura 4.19 contem os voltamogramas cíclicos obtidos para cada condição descrita. A figura inserida na Figura 4.19 contém o gráfico dos valores de corrente (I_p) e potencial (E_p) de pico para oxidação de ROS versus cada um dos eletrólitos suporte

estudados. O potencial de pico foi praticamente o mesmo para os diferentes eletrólitos. No entanto, a corrente de pico anódica registrada para o analito em solução de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$) foi 35% e 43% maior do que a obtida utilizando H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$), respectivamente. Consequentemente, a solução de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi a composição de eletrólito suporte selecionada para os estudos posteriores.

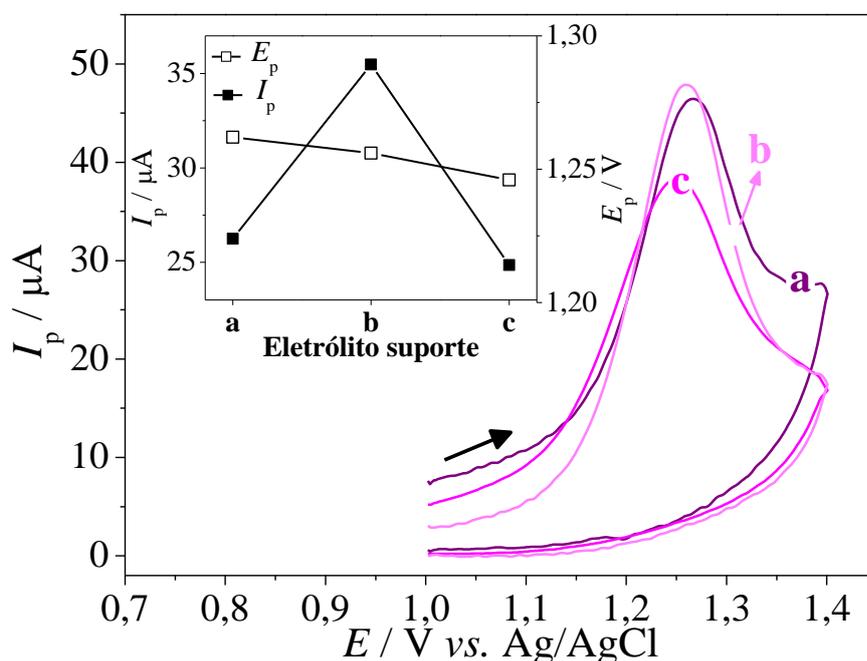


FIGURA 4.19 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em diferentes eletrólitos suporte: (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (b) tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$); e (c) Tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido as curvas de E_p e I_p vs. eletrólito suporte.

Após selecionar a solução de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como a melhor composição de eletrólito suporte para a detecção de ROS, foi estudado o efeito do pH da solução de tampão fosfato sobre a resposta voltamétrica da ROS. Os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH contendo ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 4.20. Os voltamogramas são mostrados sem o desconto do branco neste estudo, de forma a mostrar a variação da corrente de fundo devido à liberação de oxigênio na região de potenciais mais altos (próximo a

+1,4 V). A figura inserida na Figura 4.20 contém o gráfico dos valores de corrente (I_p) e potencial (E_p) de pico para oxidação de ROS versus pH. A oxidação da molécula de ROS foi mais pronunciada em pH igual a 2,0, e a magnitude de corrente do processo anódico foi diminuindo gradualmente com o aumento do pH da solução, até não ser mais observado em pH igual a 7,0. Assim, a solução de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH = 2,0) foi selecionada para a continuidade do desenvolvimento do procedimento voltamétrico para determinação de ROS. Ademais, a partir do gráfico de E_p versus pH, pode-se observar que duas regiões lineares foram obtidas, com a intersecção das duas retas em pH \approx 4,0, o qual está de acordo com pK_a da molécula de ROS (pK_a = 3,8)⁶⁷.

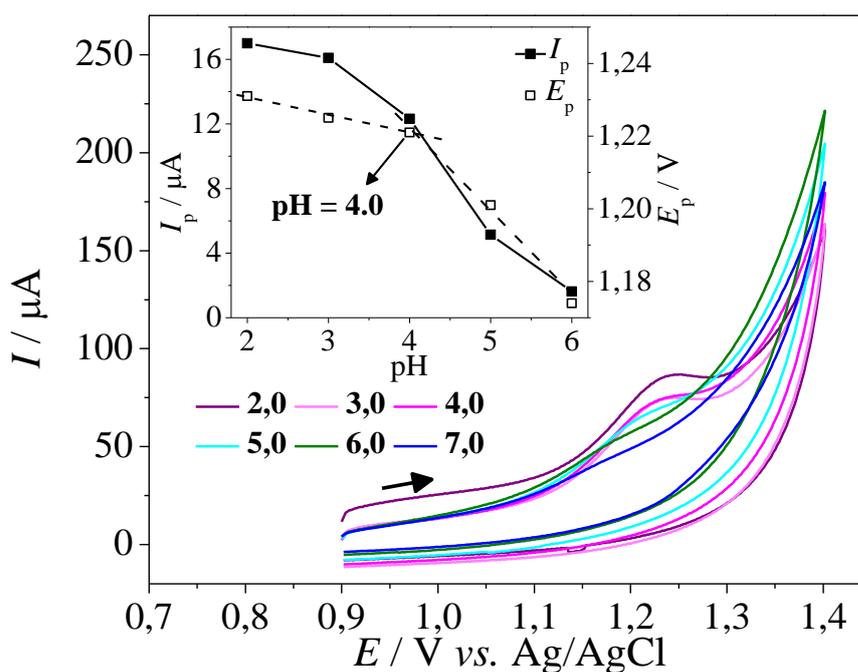


FIGURA 4.20 - Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ a diferentes pHs usando o eletrodo de VACNT-GO. $v = 50$ mV s⁻¹. Inserido os gráficos de E_p vs. pH e I_p vs. pH.

4.3.3 - Estudo do efeito do potencial e do tempo de pré-concentração

A relevância da aplicação de uma etapa de pré-concentração da molécula de ROS sobre o eletrodo de VACNT-GO foi investigada, e, portanto, avaliou-se o efeito do potencial e do tempo de pré-concentração. Este estudo foi conduzido realizando-se medidas de voltametria cíclica para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0). Inicialmente, foram realizados experimentos utilizando um tempo de pré-concentração fixo e igual a 60 s, e o potencial de pré-concentração variado na faixa de 0,0 a 1,0 V. Na Figura 4.21 (a) é mostrada a dependência da corrente de pico anódica obtida em função do potencial de pré-concentração empregado. Como pode ser observado a partir deste gráfico, a aplicação de um potencial de pré-concentração diferente de 0,0 V não proporcionou aumento do sinal analítico. Sendo assim, na pré-concentração do analito, trabalhou-se em “potencial de circuito aberto”.

Em seguida, a influência do tempo de pré-concentração também foi avaliada. Novamente, um gráfico de corrente de pico anódica versus o tempo de pré-concentração foi construído, e este é apresentado na Figura 4.21 (b). A corrente de pico aumentou significativamente até o tempo de 60 s, a partir do qual a corrente atingiu um patamar sem acréscimos consideráveis. O alcance de um patamar de corrente no estudo do efeito do tempo de pré-concentração pode ser entendido da seguinte forma: no tempo de 60 s a superfície do eletrodo de VACNT-GO foi saturada pelas moléculas de ROS, e, portanto, a manutenção da pré-concentração das moléculas de ROS por tempos mais elevados não acarretou nenhum acréscimo de sinal analítico. Desta forma, foi considerado um tempo de pré-concentração igual a 60 s para os estudos posteriores.

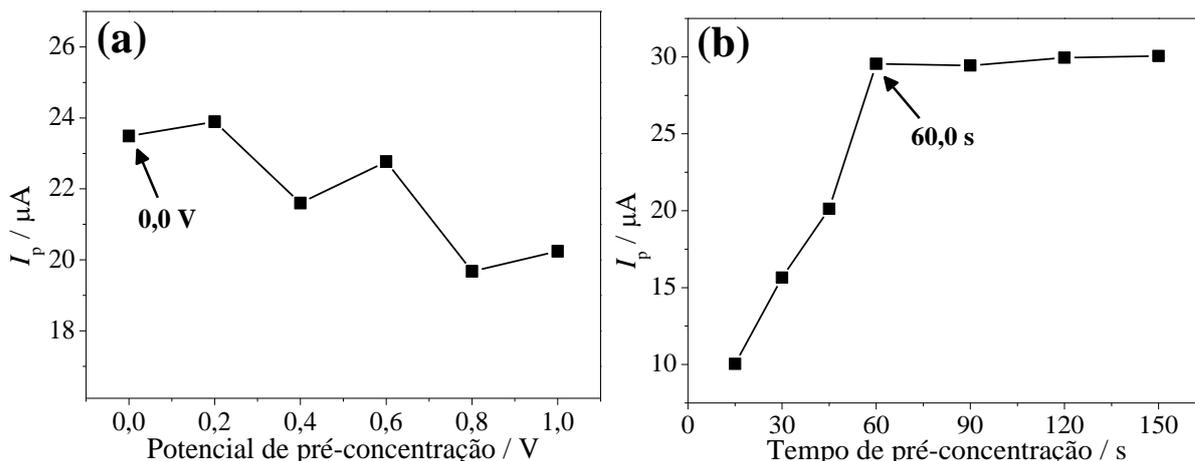


FIGURA 4.21 - Efeito do (a) potencial de pré-concentração e (b) do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico anódica para a determinação de ROS.

4.3.4 - Determinação do número de elétrons e da constante de transferência heterogênea de elétrons para a eletrooxidação da molécula de rosuvastatina cálcica

O número de elétrons transferidos na oxidação da molécula de ROS foi determinado por eletrólise a potencial controlado. O procedimento de eletrólise foi conduzido empregando-se uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0), com a aplicação de um potencial fixo de +1,3 V durante 1800 s. Assim, o número de elétrons envolvidos foi obtido fazendo-se uso da equação de Faraday (Eq. 9):

$$Q = n\Delta CF \quad (9)$$

onde Q é a carga elétrica gerada durante a eletrólise, n é o número de elétrons envolvidos, ΔC é a variação do número de mols (quantidade de matéria) de ROS, e F é a constante de Faraday. O valor de Q obtido na eletrólise foi igual a 23,2 mC. A variação do número de mols de ROS foi determinado por meio de medidas de SWAdASV realizadas antes e após o ensaio de eletrólise. O valor de ΔC obtido foi de $3,2 \times 10^{-7}$ mols. Considerando-se os resultados experimentais

de Q e ΔC , o número de elétrons foi determinado, sendo igual a 0,75, um valor próximo a 1.

Outra abordagem foi utilizada para confirmar a transferência de 1 elétron na reação de eletrooxidação da molécula de ROS previsto pelo estudo de eletrólise. Esta segunda abordagem consistiu em um estudo por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “Square-Wave Voltametry”) variando-se o parâmetro de frequência na faixa de 10 a 70 Hz. De acordo com a teoria da SWV⁶⁸, o potencial de pico é linearmente dependente do logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos (Eq. 10):

$$E_p = (2,3 RT/\alpha nF) \log f \quad (10)$$

onde α é o coeficiente de transferência de carga, f é a frequência de aplicação dos pulsos de potencial, e os demais termos tem seus significados usuais. Portanto, a partir de um gráfico de E_p versus $\log f$ o número de elétrons envolvidos no processo pode ser calculado utilizando-se o coeficiente angular deste gráfico. Na Figura 4.22 o gráfico de E_p versus $\log f$ obtido para o caso da oxidação da molécula de ROS é apresentado. A equação de regressão linear equivalente a este gráfico foi (Eq. 11):

$$E_p = 1,11 + 0,12 \log f, r = 0,987 \quad (11)$$

Comparando-se os valores de coeficiente angular das equações (10) e (11) um valor de αn igual a 0,49 foi obtido. Assumindo α como sendo igual a 0,5 (um valor tipicamente determinado para moléculas orgânicas), o número de elétrons pôde ser previsto como 0,98 ($\approx 1,0$), em concordância com o mesmo resultado encontrado no estudo de eletrólise a potencial controlado. Esta informação sobre o número de elétrons foi útil para a determinação de

parâmetros cinéticos bem como para a previsão da possível reação de eletrooxidação da molécula de ROS, como discutido a seguir.

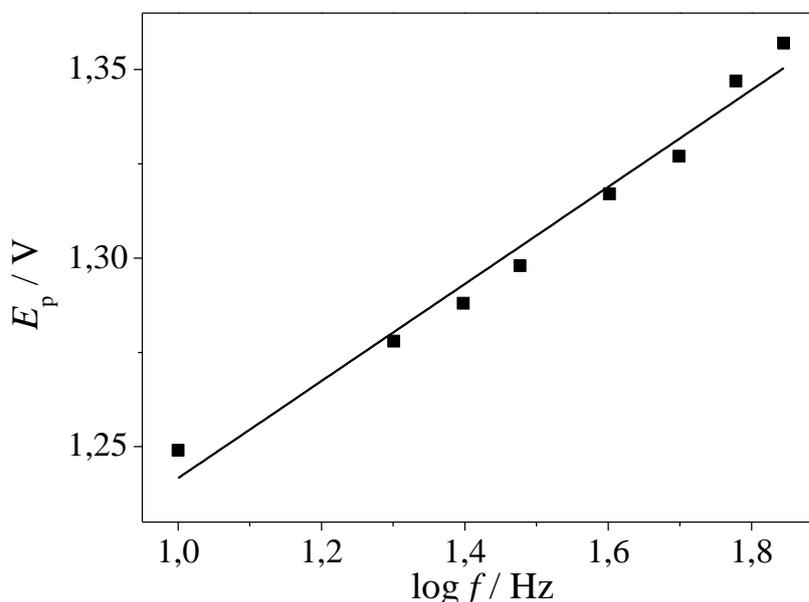


FIGURA 4.22 - Gráfico de E_p versus logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nas medidas de SWV.

Estudos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram conduzidos para determinar o comportamento da oxidação da molécula ROS (adsortivo e/ou difusional) e a respectiva constante de transferência heterogênea de elétrons (k_s). Os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de velocidades de varredura de 10 a 200 mV s^{-1} para uma solução de tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} ($\text{pH} = 2,0$) contendo ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 4.23 (a). Uma relação linear entre o logaritmo da corrente de pico anódica ($\log I_p$) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) foi obtida (Figura 4.23 (b)), com um coeficiente angular de 0,58. Este valor indica que a oxidação da molécula de ROS é um processo redox controlado majoritariamente por difusão, uma vez que o coeficiente angular da curva $\log I_p$ vs. $\log v$ ficou próximo ao valor teórico previsto para processos controlados por difusão (coeficiente angular = 0,5)⁶³. Ainda, para confirmar este resultado, uma

relação linear foi verificada entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura (Gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$, Figura 4.23 (c)).

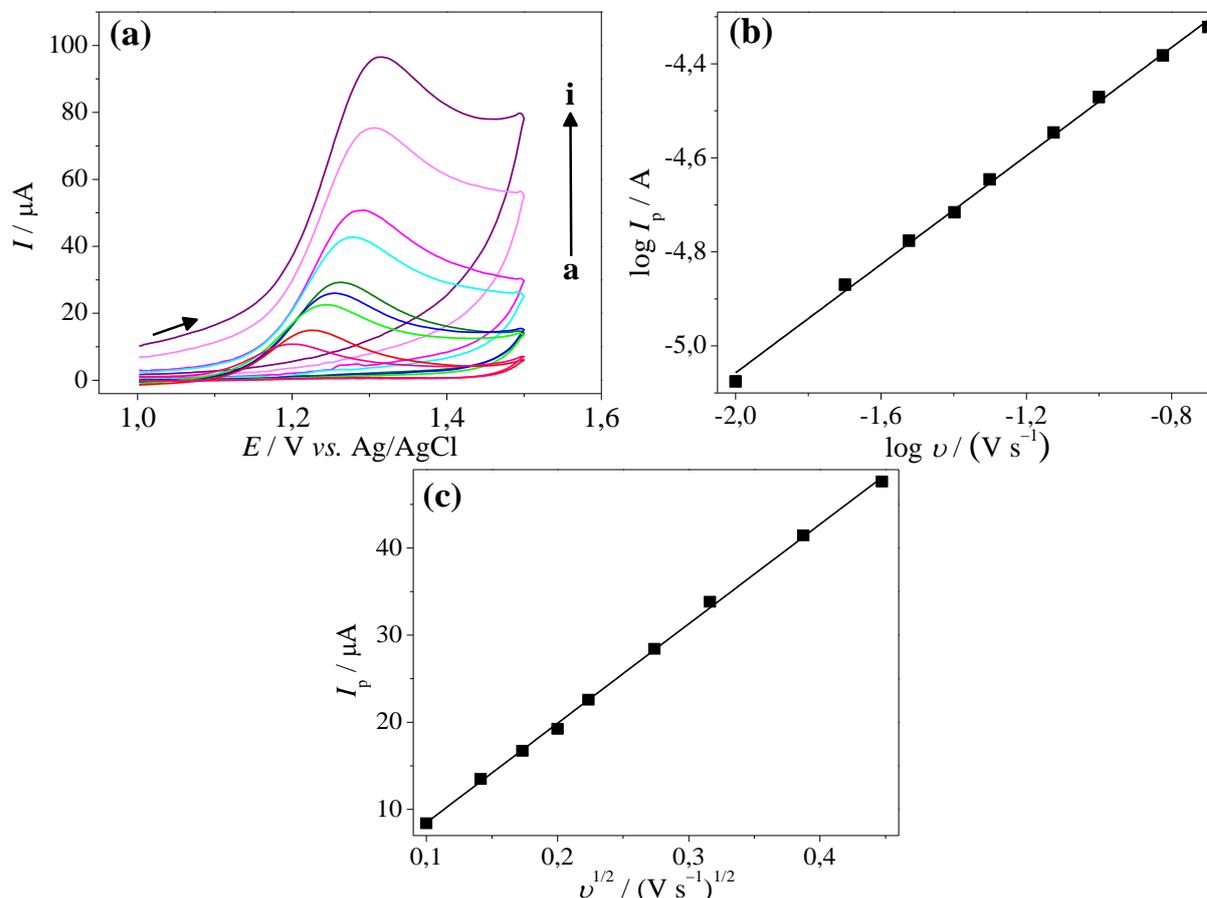


FIGURA 4.23 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0) em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 75 (g) 100 (h) 150 e (i) 200 mV s^{-1} . (b) Gráfico de $\log I_p$ versus $\log v$. (c) Variação da corrente de pico (I_p) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

A determinação de k_s para a eletrooxidação da molécula de ROS foi realizada utilizando-se a teoria de NICHOLSON e SHAIN⁶⁹ para o caso específico de reações irreversíveis controladas por difusão. Esta teoria foi utilizada, pois, como visto anteriormente, o processo de oxidação da ROS foi predominantemente controlado pelo transporte de massa por difusão. De acordo com esta teoria, a corrente de pico (I_p) é linearmente dependente da diferença entre o potencial de pico (E_p) e o potencial formal (E°) para diferentes velocidades de varredura (Eq. 12):

$$I_p = 0,227 n F A C k_s \exp \left[\left(\frac{\alpha n F}{RT} \right) (E_p - E^{o'}) \right] \quad (12)$$

onde C é a concentração da espécie eletroativa (neste estudo, $5,0 \times 10^{-8}$ mol cm^{-3}), A é a área geométrica do eletrodo de VACNT-GO (neste estudo, $0,70$ cm^2) e os outros termos tem seus significados usuais. Aplicando-se a função logaritmo natural em ambos os membros da Eq. 12, e rearranjando a equação final, obtém-se (Eq.13):

$$\ln I_p = \ln (0,227 n F A C k_s) + \left(\frac{\alpha n F}{RT} \right) (E_p - E^{o'}) \quad (13)$$

Desta forma, o valor de k_s foi calculado a partir do coeficiente linear da relação entre $\ln I_p$ e $(E_p - E^{o'})$. O gráfico de $\ln I_p$ vs. $(E_p - E^{o'})$ é mostrado na Figura 4.24, e a relação linear obtida descrita pela seguinte equação de regressão linear (Eq. 14):

$$\ln I_p = - 11,23 + 16,16 (E_p - E^{o'}), r = 0,998 \quad (14)$$

O valor de $E^{o'}$ foi determinado como sendo o potencial correspondente a cada corrente calculada como $I = 0,82 I_p^{70}$ para as diferentes velocidades de varredura, e um valor médio de $E^{o'} = (1,22 \pm 0,03)$ V foi obtido. Por conseguinte, k_s foi calculada pela comparação do coeficiente linear da equação linear experimental (Eq. 14) com o coeficiente linear da equação Nicholson e Shain (Eq. 13), e um valor de $1,73 \times 10^{-2}$ cm s^{-1} foi obtido.

De forma a se ter uma confirmação adicional às observações realizadas anteriormente sobre o número de elétrons envolvidos na oxidação da molécula de ROS, o coeficiente angular da curva de $\ln I_p$ vs. $(E_p - E^{o'})$ foi comparado com o coeficiente angular da equação Nicholson e Shain (Eq. 13), e

um valor de αn igual a 0,42 foi calculado. Este resultado está em concordância com o valor determinado no estudo por SWV, e, assim, corroborando com a transferência de 1 elétron para a oxidação da ROS.

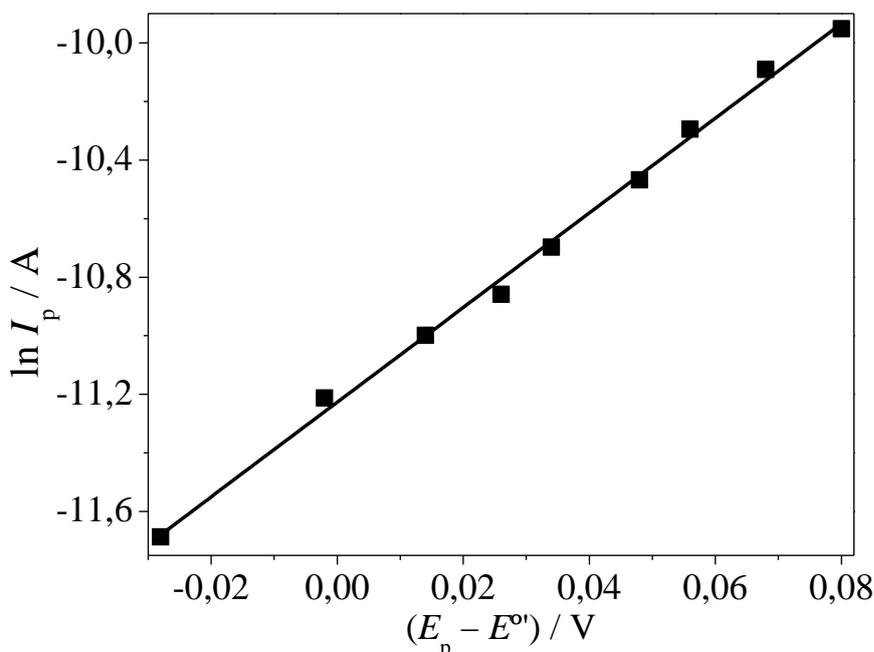


FIGURA 4.24 - Variação do logaritmo natural da corrente de pico ($\log I_p$) em função da diferença entre $E_p - E^o$.

Baseando-se nas informações anteriores, um possível mecanismo de eletrooxidação para a molécula de ROS foi proposto, envolvendo uma reação de eletrólise de Kolbe do grupo ácido carboxílico localizado na porção ácido dihidroxihepta-6-enóico da molécula de ROS, Figura 4.25. Nesta reação, o grupo ácido carboxílico protonado perde um próton e um elétron em uma reação de oxidação irreversível com a formação de uma espécie radicalar. Devido à instabilidade desta espécie, o grupo radicalar perde rapidamente dióxido de carbono (CO_2), gerando um radical centrado em carbono. Finalmente, os radicais centrados em carbono sofrem uma reação de acoplamento, formando um dímero como produto⁷¹⁻⁷⁴.

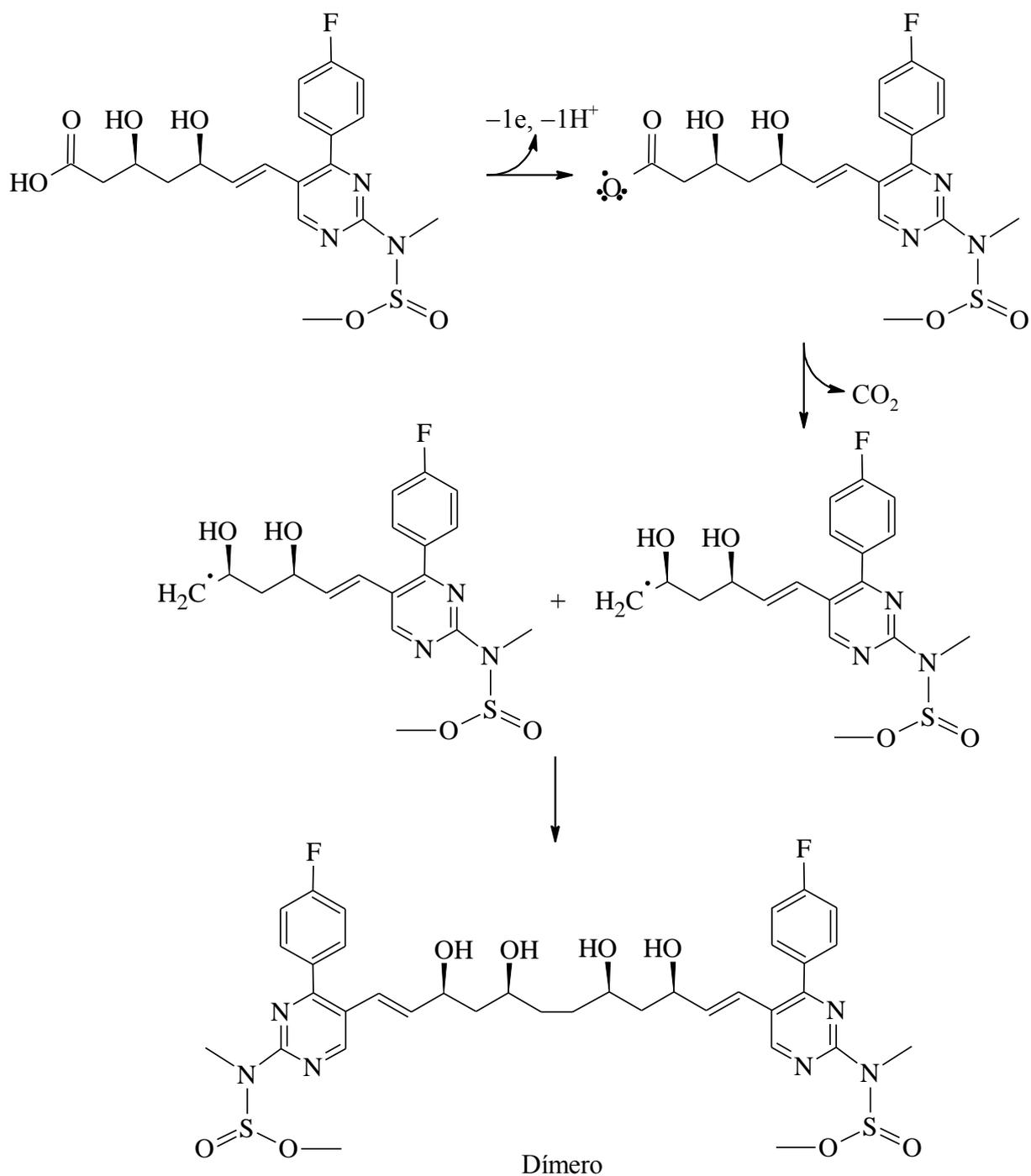


FIGURA 4.25 - Mecanismo de eletrooxidação proposto para a molécula de ROS.

4.3.5 - Determinação de rosuvastatina cálcica por voltametria adsorptiva de redissolução anódica por onda quadrada

Para o desenvolvimento do procedimento voltamétrico para determinação de ROS utilizando o eletrodo de VACNT-GO, foram avaliadas as técnicas de SWAdASV e DPAdASV. Inicialmente, os parâmetros experimentais de cada técnica foram otimizados utilizando uma solução de ROS $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0). A Tabela 4.10 reúne os intervalos em que cada parâmetro foi estudado e os respectivos valores selecionados. Os valores selecionados para cada parâmetro foram obtidos tendo em conta a condição na qual a maior magnitude de corrente anódica foi registrada e com menor contribuição da corrente de fundo.

TABELA 4.10 - Parâmetros experimentais estudados para as técnicas de SWAdASV e DPAdASV e os respectivos valores selecionados para a determinação de ROS

Técnica	Parâmetro	Intervalo	Selecionado
SWAdASV	Frequência (Hz)	10 a 70	10
	Amplitude (mV)	5 a 100	90
	Incremento (mV)	1 a 10	9
DPAdASV	Veloc. de varredura* (mV s^{-1})	2,5 a 20	10
	Amplitude (mV)	10 a 100	80
	Tempo de modulação (ms)	5 a 25	25

*Velocidade de varredura de potencial.

Apesar da otimização realizada para as técnicas de SWAdASV e DPAdASV, as correntes de pico anódica obtidas utilizando DPAdASV foram significativamente inferiores àquelas fornecidas pela SWAdASV, mesmo sob as condições otimizadas. Desta forma, os estudos posteriores foram conduzidos utilizando-se a técnica de SWAdASV.

A Figura 4.25 contem os voltamogramas de SWAdAS registrados para diferentes níveis de concentração de ROS, e inserido na figura encontra-se a respectiva curva analítica. A curva analítica foi linear no intervalo de concentrações de $4,8 \times 10^{-7}$ a $4,67 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, obedecendo à seguinte equação de regressão linear: I_p (μA) = $1,94 \times 10^6$ (μA mol⁻¹ L) [ROS] (mol L⁻¹) - 1,14 (μA); $r = 0,998$. O LD foi calculado utilizando-se a Eq. 8, sendo obtido o valor de $6,10 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

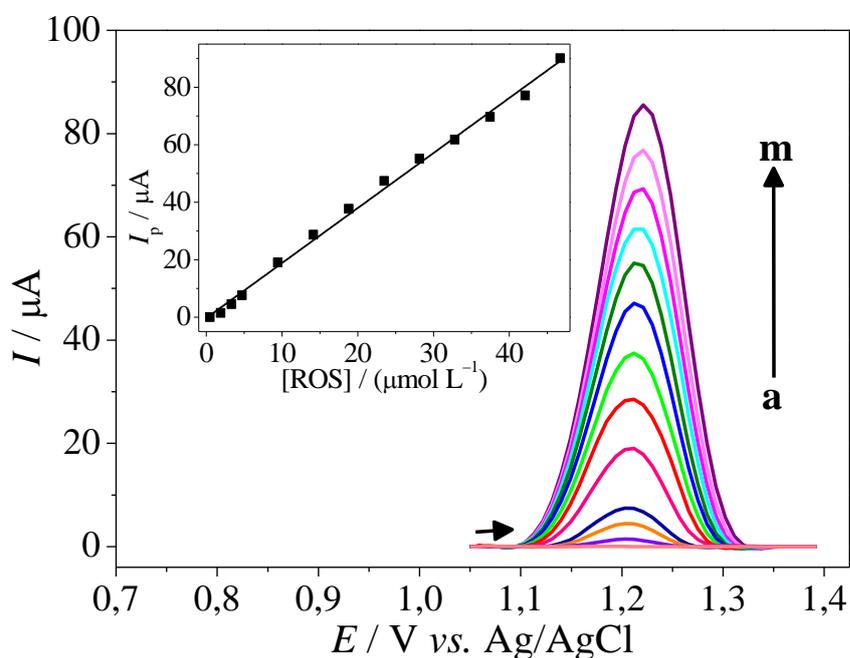


FIGURA 4.26 - Voltamogramas de SWAdAS obtidos para diferentes concentrações de ROS: (a) 0,0; (b) 0,48; (c) 1,9; (d) 4,7; (e) 9,4; (f) 14,1; (g) 18,8; (h) 23,5; (i) 28,1; (j) 32,8, (k) 37,4, (l) 42,1 e (m) 46,7 μmol L⁻¹. Inserida a curva analítica obtida.

Na Tabela 4.11 encontram-se os parâmetros analíticos obtidos por procedimentos eletroanalíticos reportados na literatura e pelo procedimento voltamétrico proposto neste trabalho para a determinação de ROS. ALTNOZ e UYAR⁴⁶ propuseram um método voltamétrico para a determinação de ROS utilizando-se a redução da molécula de ROS sobre um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE, do inglês “Hanging Mercury Drop Electrode”). Neste trabalho, os autores reportaram uma faixa linear de concentrações de $2,00 \times 10^{-7}$ a $9,99 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um LD de $6,99 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Fazendo-se uso,

também, da redução da molécula de ROS, RAMADAN et al.⁴⁷ utilizando-se um eletrodo gotejante de mercúrio (DME, do inglês “Dropping Mercury Electrode”) e polarografia por pulso diferencial (DPPA, do inglês “Differential Pulse Polarographic Analysis”) para a determinação de ROS no intervalo de concentrações de $9,62 \times 10^{-8}$ a $2,30 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um LD de $1,24 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Comparando-se os parâmetros de desempenho analítico, no procedimento proposto nesta dissertação a curva analítica foi linear por aproximadamente duas décadas de concentração, assim como os procedimentos reportados na literatura, e o LD foi menor que o obtido por ALTNOZ e UYAR⁴⁶ e maior do que o reportado por RAMADAN et al.⁴⁷. No entanto, os procedimentos da literatura fizeram uso de eletrodos de mercúrio, o qual tem sido substituído por materiais de eletrodo alternativos de menor toxicidade que o mercúrio⁷⁵.

TABELA 4.11 - Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o procedimento voltamétrico proposto utilizando o eletrodo de VACNT-GO e para outros procedimentos eletroanalíticos reportados na literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa linear (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	Ref.
HMDE	SWV	$2,00 \times 10^{-7}$ a $9,99 \times 10^{-6}$	$6,99 \times 10^{-8}$	46
DME	DPPA	$9,62 \times 10^{-8}$ a $2,30 \times 10^{-5}$	$1,24 \times 10^{-8}$	47
VACNT- GO	DPAdASV	$4,8 \times 10^{-7}$ a $4,67 \times 10^{-5}$	$6,10 \times 10^{-8}$	Este trabalho

DME – Eletrodo gotejante de mercúrio (do inglês “Dropping Mercury Electrode”); DPPA – Análise polarográfica por pulso diferencial (do inglês “Differential Pulse Polarographic Analysis”); HMDE – Eletrodo de gota pendente de mercúrio (do inglês “Hanging Mercury Drop Electrode”); SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “Square Wave Voltammetry”).

4.3.6 - Estudos de repetibilidade, interferentes e adição/recuperação

A precisão do procedimento voltamétrico proposto foi avaliada por meio de estudos de repetibilidade intra- e inter-dias. Para o estudo de repetibilidade intra-dia 10 medidas voltamétricas de SWAdASV ($n = 10$) foram realizadas em um mesmo dia para duas soluções de ROS ($5,0 \times 10^{-6}$ e $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) preparadas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH = 2,0). Os valores de RSD obtidos para as correntes de pico anódica coletadas para as medidas realizadas para as duas soluções foram iguais a 3,1% e 1,9%, respectivamente. Para o estudo de repetibilidade inter-dias comparou-se as correntes de pico registradas em medidas voltamétricas realizadas durante três dias para as mesmas duas soluções do estudo de repetibilidade intra-dia ($n = 3$). Os valores de RSD obtidos neste estudo foram de 5,4% e 4,1%, respectivamente. Os resultados de RSD obtidos em ambos os estudos de repetibilidade demonstraram, mais uma vez, a boa estabilidade de resposta do eletrodo de VACNT-GO.

Alguns dos excipientes encontrados em amostras de formulações farmacêuticas de ROS foram avaliados como possíveis interferentes para a determinação voltamétrica de ROS. Assim, uma solução de ROS $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi analisada utilizando o eletrodo de VACNT-GO na ausência e presença de cada uma das seguintes substâncias em proporções analito:excipiente de 1:1 e 1:10: celulose microcristalina, lactose mono-hidratada, estearato de magnésio e crospovidona. Os resultados de RSD obtidos para a comparação dos sinais de corrente anódica registrados para as soluções de ROS na ausência e presença de cada um dos excipientes são apresentados na Tabela 4.12. Como pode ser observado, os valores de RSD variaram na faixa de -8,2% a +3,5%, com exceção para o caso da crospovidona 1:10 (RSD = -17,1%), indicando alguma interferência da crospovidona neste nível de concentração. No entanto, a razão

de concentração de 1:10 ROS:crospovidona estudada foi bem maior do que aquela encontrada em amostras de formulações farmacêuticas⁷⁶. Sendo assim, pode-se concluir que as determinações voltamétricas não sofreram interferências significativas, como pode ser observado no estudo de adição/recuperação apresentados a seguir.

TABELA 4.12 - Efeito de possíveis interferentes sobre a determinação voltamétrica de ROS a um nível de concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Excipiente	Proporção (ROS:Excipiente)	RSD (%)
Celulose microcristalina	1:1	+3,5
	1:10	-5,1
Lactose mono-hidratada	1:1	+0,2
	1:10	+2,9
Estearato de magnésio	1:1	+2,4
	1:10	-8,2
Crospovidona	1:1	-3,9
	1:10	-17,1

Potenciais interferências a partir das matrizes de amostras farmacêuticas também foram investigadas a partir de experimentos de adição e recuperação. Duas amostras farmacêuticas de ROS foram usadas, e os ensaios de adição e recuperação conduzidos utilizando-se duas concentrações de ROS: $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de porcentagem de recuperação obtidos encontram-se organizados na Tabela 4.13. As porcentagens de recuperação estiveram entre 93,3% e 106,5%, demonstrando a não ocorrência de efeitos de matriz sobre as determinações de ROS por SWAdASV.

TABELA 4.13 - Resultados obtidos para os estudos de adição e recuperação de ROS em amostras de formulações farmacêuticas

Amostra	[ROS] ($\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$)		Recuperação* (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	3,0	2,9 \pm 0,3	96,7
	20,0	20,2 \pm 0,4	101
B	3,0	2,8 \pm 0,2	93,3
	20,0	21,3 \pm 0,4	106,5

*Recuperação (%) = $[\text{ROS}]_{\text{encontrado}} / [\text{ROS}]_{\text{adicionado}} \times 100$.

4.3.7 - Determinação de rosuvastatina cálcica em amostras farmacêuticas e biológicas sintéticas

A aplicabilidade do procedimento voltamétrico desenvolvido foi avaliada por meio da determinação de ROS em três diferentes matrizes de amostras, de formulações farmacêuticas e biológicas sintéticas de urina e soro humano. Inicialmente, foram analisadas duas amostras farmacêuticas adquiridas no comércio local e contendo diferentes teores de ROS. A determinação dos teores de ROS nestas amostras foi feita também empregando-se um método comparativo (espectrofotometria UV-vis). Na Tabela 4.14 são apresentados os resultados obtidos empregando-se os dois métodos analíticos. Os resultados obtidos empregando-se o método proposto voltamétrico e o método espectrofotométrico foram concordantes, uma vez que no teste- t pareado, um valor de $t_{\text{experimental}}$ igual a 0,54 foi calculado, sendo este muito inferior ao valor de $t_{\text{teórico}}$ (12,71), a um nível de confiança de 95%. Além disso, os valores de RSD foram iguais a $-2,0\%$ e $+1,1\%$, respectivamente.

TABELA 4.14 - Determinação de ROS em duas amostras farmacêuticas pelos métodos voltamétrico proposto (*P*) e comparativo (*C*) (n = 3)

Amostra	ROS (mg/comprimido)			RSD* (%)
	Valor rotulado	Método comparativo, <i>C</i>	Método proposto, <i>P</i>	
A	10,0	9,5 ± 0,1	9,3 ± 0,1	-2,1
B	20,0	18,8 ± 0,2	19,0 ± 0,4	+1,1

*RSD = $(P - C) / C \times 100$.

Finalmente, dois tipos de amostras biológicas sintéticas dopadas com uma quantidade conhecida de ROS foram analisadas pelo método voltamétrico proposto. A Tabela 4.15 reúne os resultados obtidos para a quantificação de ROS em amostras de urina sintética e de soro humano sintético, dopadas com diferentes níveis de concentração de ROS. Como pode ser observado, as porcentagens de recuperação variaram de 91% a 102%, indicando a potencialidade do novo procedimento voltamétrico desenvolvido para a análise de ROS em amostras de fluidos biológicos.

TABELA 4.15 - Resultados obtidos para a determinação voltamétrica de ROS em amostras biológicas sintéticas de urina e soro humano (n = 3)

Amostra	ROS ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)		Recuperação* (%)
	Quantidade adicionada	Quantidade encontrada	
Urina	2,00	2,03 ± 0,07	102
	20,0	19,1 ± 0,2	95,5
Soro humano	2,00	2,00 ± 0,07	100
	20,0	18,2 ± 0,2	91

*Recuperação (%) = $[\text{ROS}]_{\text{encontrado}} / [\text{ROS}]_{\text{adicionado}} \times 100$.

5 - CONCLUSÕES

Uma nova arquitetura de sensor eletroquímico foi proposta neste trabalho para a determinação de estatinas em diferentes matrizes de amostras. A arquitetura desenvolvida baseou-se em estudos prévios demonstrando a eficiência do uso de nanotubos de carbono verticalmente alinhados devido à máxima exposição de sítios *edge-plane*. Assim, VACNT foram eficientemente sintetizados empregando-se o método MWCVD, e submetidos à esfoliação e funcionalização com grupos oxigenados das respectivas pontas dos VACNT por meio de um tratamento por plasma de oxigênio. O procedimento de tratamento por plasma de oxigênio proporcionou a geração de um compósito de VACNT e óxido de grafeno (VACNT-GO), de caráter super-hidrofílico, contrastando com o comportamento super-hidrofóbico dos VACNT sem tratamento.

O compósito VACNT-GO foi caracterizado eletroquimicamente utilizando-se a voltametria cíclica e a sonda de hexacianoferrato (III) de potássio, e um excelente desempenho eletroquímico foi observado para este material, configurando-se como uma interessante opção como material de eletrodo para aplicações diversas. Particularmente para aplicações em eletroanálise, os resultados obtidos para os dois parâmetros eletroquímicos avaliados para o eletrodo de VACNT-GO demonstraram seu relevante potencial para atuar como sensor eletroquímico. Uma elevada área eletroativa foi observada para o VACNT-GO, o que é de grande importância para o estabelecimento de métodos voltamétricos com parâmetros de desempenho analítico diferenciados, devido ao aumento de sinal analítico obtido (corrente ou carga). Ademais, uma elevada constante de transferência heterogênea de elétrons foi estimada para o eletrodo de VACNT-GO, o que significa que este material apresenta uma rápida promoção da transferência de elétrons, desejado para a diminuição dos sobrepotenciais de trabalho e melhoria da seletividade dos métodos eletroanalíticos.

Baseando-se no bom desempenho eletroquímico do eletrodo de VACNT-GO, este material foi empregado no desenvolvimento de novos métodos voltamétricos para a determinação das estatinas atorvastatina cálcica (ATOR) e rosuvastatina cálcica (ROS). Durante as etapas analíticas percorridas, ensaios eletroquímicos foram realizados dedicados a determinar o comportamento e as propriedades eletroquímicas de cada uma das moléculas investigadas. A partir destes resultados, foi possível apresentar possíveis reações de eletrooxidação para as moléculas de ATOR e ROS.

Utilizando-se a técnica voltamétrica de DPAdASV, a curva analítica construída para a ATOR foi linear no intervalo de $9,0 \times 10^{-8}$ a $3,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $9,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Relativamente a determinação de ROS, a técnica de SWAdASV foi utilizada, e a curva analítica construída foi linear no intervalo de $4,8 \times 10^{-7}$ a $4,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Ambos os procedimentos voltamétricos desenvolvidos foram seletivos para a determinação dos respectivos fármacos em amostras de formulações farmacêuticas como demonstrado pelos resultados de estudo de possíveis interferentes e adição/recuperação. Registrando-se os sinais de corrente de pico durante o mesmo dia (repetibilidade intra-dia), e durante três dias (repetibilidade inter-dias), foi comprovada a estabilidade de resposta do eletrodo de VACNT-GO por um número significativo de medidas sucessivas. Por fim, os analitos alvo foram quantificados com sucesso em amostras de formulações farmacêuticas e biológicas sintéticas.

Os resultados apresentados nesta dissertação demonstraram a potencialidade do uso do compósito VACNT-GO para aplicações como sensores eletroquímicos. Ademais, este material pode ainda ser utilizado para inúmeros estudos futuros, incluindo o seu uso como plataforma para a imobilização de espécies biológicas para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, uso deste como base para o estabelecimento de novas arquiteturas de carbono,

combinando outras formas típicas de carbono, como filmes de diamante dopado com boro e carbono tipo-diamante, etc.

6 - REFERÊNCIAS

1. IJIMA, S. "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*, **354** (6348): 56, 1991.
2. IJIMA, S. & ICHIHASHI, T. "Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter". *Nature*, **363** (6430): 603, 1993.
3. SOUZA FILHO, A.G.D. & FAGAN, S.B. "Functionalization of carbon nanotubes". *Quim. Nova*, **30** (7): 1695, 2007.
4. GOODING, J.J. "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing". *Electrochim. Acta*, **50** (15): 3049, 2005.
5. ZARBIN, A.J.G. & OLIVEIRA, M.M. "Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis?". *Quim. Nova*, **36**: 1533, 2013.
6. BAUGHMAN, R.H.; ZAKHIDOV, A.A. & DE HEER, W.A. "Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications". *Science*, **297** (5582): 787, 2002.
7. VAIRAVAPANDIAN, D.; VICHCHULADA, P. & LAY, M.D. "Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing". *Anal. Chim. Acta*, **626** (2): 119, 2008.
8. SAHOO, N.G.; RANA, S.; CHO, J.W.; LI, L. & CHAN, S.H. "Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes". *Prog. Polym. Sci.*, **35** (7): 837, 2010.
9. MA, P.-C.; SIDDIQUI, N.A.; MAROM, G. & KIM, J.-K. "Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review". *Composites, Part A*, **41** (10): 1345, 2010.
10. REN, X.; CHEN, C.; NAGATSU, M. & WANG, X. "Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review". *Chem. Eng. J.*, **170** (2–3): 395, 2011.
11. PARADISE, M. & GOSWAMI, T. "Carbon nanotubes – Production and industrial applications". *Mater. Des.*, **28** (5): 1477, 2007.
12. PRASEK, J.; DRBOHLAVOVA, J.; CHOMOUCKA, J.; HUBALEK, J.; JASEK, O.; ADAM, V. & KIZEK, R. "Methods for carbon nanotubes synthesis-review". *J. Mater. Chem.*, **21** (40): 15872, 2011.
13. RAMOS, S.C., Controle da molhabilidade de nanotubos de carbono verticalmente alinhados. São José dos Campos, - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2011. Doutorado em Engenharia e Tecnologia Espaciais, 186 p.
14. SZABÓ, A.; PERRI, C.; CSATÓ, A.; GIORDANO, G.; VUONO, D. & NAGY, J.B. "Synthesis methods of carbon nanotubes and related materials". *Materials*, **3** (5): 3092, 2010.
15. SHI, Z.; LIAN, Y.; ZHOU, X.; GU, Z.; ZHANG, Y.; IJIMA, S.; ZHOU, L.; YUE, K.T. & ZHANG, S. "Mass-production of single-wall carbon nanotubes by arc discharge method". *Carbon*, **37** (9): 1449, 1999.

16. LV, X.; DU, F.; MA, Y.; WU, Q. & CHEN, Y. "Synthesis of high quality single-walled carbon nanotubes at large scale by electric arc using metal compounds". *Carbon*, **43** (9): 2020, 2005.
17. RÜMMELI, M.H.; AYALA, P. & PICHLER, T., *Carbon Nanotubes and Related Structures: Production and Formation*. 2010, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 1.
18. KUMAR, M. & ANDO, Y. "Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production". *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **10** (6): 3739, 2010.
19. BARO, M. & PAL, A. "Pulsed Plasma Assisted Growth of Vertically Aligned Carbon Nanotubes at Low Temperature on Mo Substrate". *Plasma Chem. Plasma Process.*: 1, 2014.
20. YAO, B.D. & WANG, N. "Carbon Nanotube Arrays Prepared by MWCVD". *J. Phys. Chem. B*, **105** (46): 11395, 2001.
21. CHOI, Y.C.; SHIN, Y.M.; LEE, Y.H.; LEE, B.S.; PARK, G.-S.; CHOI, W.B.; LEE, N.S. & KIM, J.M. "Controlling the diameter, growth rate, and density of vertically aligned carbon nanotubes synthesized by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition". *Appl. Phys. Lett.*, **76** (17): 2367, 2000.
22. ANTUNES, E.F.; LOBO, A.O.; CORAT, E.J. & TRAVA-AIROLDI, V.J. "Influence of diameter in the Raman spectra of aligned multi-walled carbon nanotubes". *Carbon*, **45** (5): 913, 2007.
23. SINNOTT, S.B.; ANDREWS, R.; QIAN, D.; RAO, A.M.; MAO, Z.; DICKEY, E.C. & DERBYSHIRE, F. "Model of carbon nanotube growth through chemical vapor deposition". *Chem. Phys. Lett.*, **315** (1–2): 25, 1999.
24. LI, W.Z.; XIE, S.S.; QIAN, L.X.; CHANG, B.H.; ZOU, B.S.; ZHOU, W.Y.; ZHAO, R.A. & WANG, G. "Large-Scale Synthesis of Aligned Carbon Nanotubes". *Science*, **274** (5293): 1701, 1996.
25. CHHOWALLA, M.; TEO, K.B.K.; DUCATI, C.; RUPESINGHE, N.L.; AMARATUNGA, G.A.J.; FERRARI, A.C.; ROY, D.; ROBERTSON, J. & MILNE, W.I. "Growth process conditions of vertically aligned carbon nanotubes using plasma enhanced chemical vapor deposition". *J. Appl. Phys.*, **90** (10): 5308, 2001.
26. WANG, J. "Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review". *Electroanalysis*, **17** (1): 7, 2005.
27. BANKS, C.E. & COMPTON, R.G. "New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite". *Analyst*, **131** (1): 15, 2006.
28. BANKS, C.E.; MOORE, R.R.; DAVIES, T.J. & COMPTON, R.G. "Investigation of modified basal plane pyrolytic graphite electrodes: definitive evidence for the electrocatalytic properties of the ends of carbon nanotubes". *Chem. Commun.*, (16): 1804, 2004.

29. LIU, J.; CHOU, A.; RAHMAT, W.; PADDON-ROW, M.N. & GOODING, J.J. "Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays". *Electroanalysis*, **17** (1): 38, 2005.
30. CHOU, A.; BOCKING, T.; SINGH, N.K. & GOODING, J.J. "Demonstration of the importance of oxygenated species at the ends of carbon nanotubes for their favourable electrochemical properties". *Chem. Commun.*, (7): 842, 2005.
31. YE, J.-S.; WEN, Y.; DE ZHANG, W.; GAN, L.M.; XU, G.Q. & SHEU, F.-S. "Selective Voltammetric Detection of Uric Acid in the Presence of Ascorbic Acid at Well-Aligned Carbon Nanotube Electrode". *Electroanalysis*, **15** (21): 1693, 2003.
32. WANG, Y.; DU, G.; ZHU, L.; LIU, H.; WONG, C.-P. & WANG, J. "Aligned open-ended carbon nanotube membranes for direct electrochemistry applications". *Sens. Actuators, B*, **174** (0): 570, 2012.
33. MORAES, F.C.; SILVA, T.A.; CESARINO, I. & MACHADO, S.A.S. "Effect of the surface organization with carbon nanotubes on the electrochemical detection of bisphenol A". *Sens. Actuators, B*, **177** (0): 14, 2013.
34. CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R. & BERNINI, F. "New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins". *Pharmacology. Ther.*, **84** (3): 413, 1999.
35. CAMPO, V.L. & CARVALHO, I. "Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas". *Quim. Nova*, **30**: 425, 2007.
36. PASHA, M.K.; MUZEEB, S.; BASHA, S.J.S.; SHASHIKUMAR, D.; MULLANGI, R. & SRINIVAS, N.R. "Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors— atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies". *Biomed. Chromatogr.*, **20** (3): 282, 2006.
37. NOVÁKOVÁ, L.; ŠATÍNSKÝ, D. & SOLICH, P. "HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin". *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **27** (4): 352, 2008.
38. GUIHEN, E.; SISK, G.D.; SCULLY, N.M. & GLENNON, J.D. "Rapid analysis of atorvastatin calcium using capillary electrophoresis and microchip electrophoresis". *Electrophoresis*, **27** (12): 2338, 2006.
39. WANG, L. & ASGHARNEJAD, M. "Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21** (6): 1243, 2000.
40. GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos". *Quim. Nova*, **29**: 105, 2006.

41. CAVALHEIRO, E.T.G; BRETT, C.A.; OLIVEIRA-BRETT, A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds". *Bioanal. Rev.*, **4** (1): 31, 2012.
42. DOGAN-TOPAL, B.; USLU, B. & OZKAN, S.A. "Investigation of electrochemical behavior of lipid lowering agent atorvastatin calcium in aqueous media and its determination from pharmaceutical dosage forms and biological fluids using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes". *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **10** (7): 571, 2007.
43. DOGAN-TOPAL, B.; BOZAL, B.; DEMIRCIGIL, B.T.; USLU, B. & OZKAN, S.A. "Electroanalytical Studies and Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatine Calcium in Binary Mixtures Using First Derivative of the Ratio-Voltammetric Methods". *Electroanalysis*, **21** (22): 2427, 2009.
44. ABBAR, J.C. & NANDIBEWOOR, S.T. "Voltammetric oxidation and determination of atorvastatin based on the enhancement effect of cetyltrimethyl ammonium bromide at a carbon paste electrode". *Colloids Surf., B*, **106** (0): 158, 2013.
45. KAMALZADEH, Z. & SHAHROKHIAN, S. "Electrochemical determination of atorvastatin on nano-scaled polypyrrole film". *Bioelectrochemistry*, **98** (0): 1, 2014.
46. ALTINOZ, S. & UYAR, B. "Electrochemical behaviour and voltammetric determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical preparations using a square-wave voltammetric method". *Anal. Methods*, **5** (20): 5709, 2013.
47. RAMADAN, A.A.; MANDIL, H. & GHAZAL, N. "Electrochemical behavior and differential pulse polarographic determination of rosuvastatin in pure form and in pharmaceutical preparations using dropping mercury electrode". *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6** (3): 128, 2014.
48. LOBO, A.O.; RAMOS, S.C.; ANTUNES, E.F.; MARCIANO, F.R.; TRAVA-AIROLDI, V.J. & CORAT, E.J. "Fast functionalization of vertically aligned multiwalled carbon nanotubes using oxygen plasma". *Mater. Lett.*, **70** (0): 89, 2012.
49. SILVA, T.A.; ZANIN, H.; SAITO, E.; MEDEIROS, R.A.; VICENTINI, F.C.; CORAT, E.J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical behaviour of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide nanocomposite as electrode material". *Electrochim. Acta*, **119** (0): 114, 2014.
50. MATETI, A.; THIMMARAJU, M.K. & RAGHUNANDAN, N. "Development, validation and estimation of atorvastatin calcium bulk and in its pharmaceutical formulation by spectrophotometric method". *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, **2** (3): 255, 2012.
51. GUPTA, A.; MISHRA, P. & SHAH, K. "Simple UV Spectrophotometric Determination of Rosuvastatin Calcium in Pure Form and in Pharmaceutical Formulations". *E-J. Chem.*, **6** (1) 2009.

52. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A. "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth*, **233** (1-2): 367, 2001.
53. PARHAM, H. & ZARGAR, B. "Determination of isosorbide dinitrate in arterial plasma, synthetic serum and pharmaceutical formulations by linear sweep voltammetry on a gold electrode". *Talanta*, **55** (2): 255, 2001.
54. LI, K.; ERES, G.; HOWE, J.; CHUANG, Y.-J.; LI, X.; GU, Z.; ZHANG, L.; XIE, S. & PAN, Z. "Self-Assembly of Graphene on Carbon Nanotube Surfaces". *Sci. Rep.*, **3** 2013.
55. ZANIN, H.; SAITO, E.; CERAGIOLI, H.J.; BARANAUSKAS, V. & CORAT, E.J. "Reduced graphene oxide and vertically aligned carbon nanotubes superhydrophilic films for supercapacitors devices". *Mater. Res. Bull.*, **49** (0): 487, 2014.
56. LOBO, A.O.; ZANIN, H.; SIQUEIRA, I.A.W.B.; LEITE, N.C.S.; MARCIANO, F.R. & CORAT, E.J. "Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites". *Mater. Sci. Eng., C*, **33** (7): 4305, 2013.
57. DRESSELHAUS, M.S.; JORIO, A.; HOFMANN, M.; DRESSELHAUS, G. & SAITO, R. "Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy". *Nano Lett.*, **10** (3): 751, 2010.
58. 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.
59. COMPTON, O.C. & NGUYEN, S.T. "Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials". *Small*, **6** (6): 711, 2010.
60. YUAN, Y. & LEE, T.R., *Contact Angle and Wetting Properties*, in *Surface Science Techniques*, BRACCO, G. & HOLST, B., Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 3.
61. WANG, S. & JIANG, L. "Definition of Superhydrophobic States". *Adv. Mater.*, **19** (21): 3423, 2007.
62. BRETT, C.M.A. & BRETT, A.M.O., *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications* 1993, Oxford Science Publications: Oxford.
63. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* 2001, John Wiley & Sons Inc: New York.
64. NICHOLSON, R.S. "Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics". *Anal. Chem.*, **37** (11): 1351, 1965.
65. LAVAGNINI, I.; ANTIOCHIA, R. & MAGNO, F. "An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data". *Electroanalysis*, **16** (6): 505, 2004.
66. POH, Z.; FLAVEL, B.S.; SHEARER, C.J.; SHAPTER, J.G. & ELLIS, A.V. "Fabrication and electrochemical behavior of vertically-aligned carbon nanotube

- electrodes covalently attached to p-type silicon via a thioester linkage". *Mater. Lett.*, **63** (9–10): 757, 2009.
67. *Compound Summary for CID 446157 - Rosuvastatin*, in *Pubchem Open Chemistry Database*, U.S. National Library of Medicine.
68. SCHOLZ, F., *Electroanalytical methods: guide to experiments and applications*2009, Springer. p.
69. NICHOLSON, R.S. & SHAIN, I. "Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems". *Anal. Chem.*, **36** (4): 706, 1964.
70. GONZÁLEZ-VELASCO, J. "The linear sweep voltametric method: An application to the study of reversible and irreversible processes". *Electroanalysis*, **6** (9): 711, 1994.
71. BAGOTSKY, V.S., *Fundamentals of electrochemistry*2005, John Wiley & Sons.
72. ANDRIEUX, C.P.; GONZALEZ, F. & SAVÉANT, J.M. "Homolytic and heterolytic radical cleavage in the Kolbe reaction: Electrochemical oxidation of arylmethyl carboxylate ions". *J. Electroanal. Chem.*, **498** (1–2): 171, 2001.
73. MOELLER, K.D. "Synthetic Applications of Anodic Electrochemistry". *Tetrahedron*, **56** (49): 9527, 2000.
74. MARKÓ, I. & CHELLÉ, F., *Kolbe and Related Reactions*, in *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, KREYSA, G.; OTA, K.-I. & SAVINELL, R., Editors. 2014, Springer New York. p. 1151.
75. ECONOMOU, A. "Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis". *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **24** (4): 334, 2005.
76. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; COOK, W.G. & FENTON, M.E., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*2012, Royal Pharmaceutical Society. 917.