

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

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS
COM NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS IMOBILIZADOS EM
FILMES DE HIDROCLORETO DE POLI(ALILAMINA) PARA DETERMINAÇÃO DE
FÁRMACOS**

Humberto Hissashi Takeda*

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

***Bolsista CNPq**

SÃO CARLOS – SP
2011

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

T136de

Takeda, Humberto Hissashi.

Desenvolvimento de eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono funcionalizados imobilizados em filmes de hidrocloreto de poli(alilamina) para determinação de fármacos / Humberto Hissashi Takeda. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

100 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. Nanotubos de carbono. 3. Ciprofibrato. 4. Voltametria. 5. Hidrocloreto de poli(alilamina). I. Título.

CDD: 543 (20^a)

Dedico este trabalho aos meus pais Ciro e Ivete, exemplos da minha vida. Ao meu avô Tomio e minha Tia Janete (in memória). Às minhas irmãs, Karen e Monique e ao mais novo integrante da família, meu sobrinho, Nicolas! Amo vocês!

"A morte de qualquer homem me diminui, porque eu sou parte da humanidade; e por isso, nunca perguntem por quem os sinos dobram, eles dobram por ti."

John Donne

Agradeço,

A Deus, pela saúde para viver e pelas dificuldades que se transformaram em ensinamento e força na minha vida, afinal só se alcança o sucesso com a superação das dificuldades.

Ao professor Dr. Orlando Fatibello Filho, pela paciência, pelos ensinamentos, confiança e a amizade.

Ao professor Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso, por disponibilizar a Embrapa Instrumentação Agropecuária para a realização de alguns experimentos e pela orientação.

Ao meu amigo Bruno Janegitz, por muito me ajudar nesta tese.

Ao meu amigo Geiser, pelas discussões na hora do café.

À minha amiga Elen pela ajuda na correção da tese.

A todos os amigos (as) do LABBES e do LABBIES que de alguma maneira ou outra me ajudaram, Fernando (Avaré) Luiz (Cyber), Roberta, Bruna, Willian (Cabelo), Osmundo, Déborah (Lilo), André (Mineiro), André (China) Wagner, Quésia, Nathália, Thiago, Luiz Humberto, Viviane (Vivi), Herbert (Irmão), Eloyze, Lívia, Alan, Estela, Marina (Garça)

A todos os funcionários do Departamento de Química da UFSCar.

A todos os amigos(as) e funcionários da Embrapa Instrumentação Agropecuária

Aos meus amigos Nelson, Fernando e Oldair (Dada) que me incentivavam a fazer o doutorado.

Aos meus amigos de longa caminhada, Rodrigo (Digão), Juliano (JAB), Leandro, Roberto, Luciano, Ederval e William (Lenilson).

Ao professor Dr. Arben Merkoçi da Universidade Autônoma de Barcelona e a todos os amigos que ficaram por lá.

Aos amigos de Ariquemes Leandro, Gustavo, Renato, Fabiane, Verônica, Ludimilla e Edgar.

A todos os funcionários da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA de Ariquemes –RO.

A todos os funcionários da Fundação Universidade Federal de Rondônia – Ariquemes – RO.

Ao CNPq pela bolsa.

A CAPES pela bolsa de doutorado Sandwich.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTAS DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 Nanotecnologia e Nanotubos de carbono.....	3
1.3 Dispersões coloidais.....	6
1.4 Fármacos.....	7
1.4.1 Ácidos fíbricos.....	8
1.4.1.1 Métodos para determinação de fibratos.....	10
1.4.2 Dopamina.....	11
1.4.2.1 Métodos para determinação de dopamina.....	12
1.4.3 Levodopa.....	14
1.4.3.1 Métodos para determinação de levodopa.....	15
1.4.4 Carbidopa.....	16
1.4.4.1 Métodos para determinação de carbidopa.....	18
1.5 Conceitos básicos sobre farmacocinética e farmacodinâmica.....	19
1.5.1 Farmacocinética.....	19
1.5.1.1 Absorção, biodisponibilidade e vias de administração.....	20
1.5.1.2 Distribuição dos fármacos.....	21
1.5.1.3 Metabolismo dos fármacos.....	21
1.5.1.4 Excreção dos fármacos.....	21
1.5.2 Farmacodinâmica.....	22
1.6 Objetivos.....	23
CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL.....	24
2.1 Instrumentação básica.....	25
2.2 Reagentes e soluções.....	25
2.3 Dispersão de MWCNTs/PAH.....	27

2.4 Preparo das amostras analisadas.....	28
2.5 Metodologia.....	29
2.5.1 Funcionalização dos MWCNTs.....	29
2.5.2 Estudo da estabilidade da dispersão de MWCNTs/PAH.....	29
2.5.3 Modificação da superfície dos GCE com filmes de PAH e MWCNTs/PAH.....	29
2.5.4 Caracterização eletroquímica dos filmes de PAH e MWCNTs/PAH.....	29
2.5.5 Voltametria de pulso diferencial.....	30
2.5.6 Voltametria cíclica e amperometria.....	30
2.5.7 Métodos de referência para determinação de teores de ciprofibrato, dopamina, L-dopa e carbidopa em amostras farmacêuticas.....	30
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1 Estudo da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH e caracterização eletroquímica.....	33
3.1.1 Estudo da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH.....	33
3.1.2 Caracterização eletroquímica do filme de MWCNTs/PAH – cálculo da área ativa.....	37
3.2 Determinação de ciprofibrato.....	44
3.2.1 Eletroatividade do ciprofibrato.....	44
3.2.2 Estudo do efeito do pH.....	45
3.2.3 Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial.....	46
3.2.4 Estudo de interferentes em potencial.....	50
3.2.5 Curva analítica e aplicação.....	52
3.2.6 Adição e recuperação.....	52
3.2.7 Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade.....	54
3.3 Determinação de dopamina.....	55
3.3.1 Comportamento eletroquímico da dopamina utilizando um GCE-MWCNTs/PAH.....	54
3.3.2 Efeito da velocidade de varredura de potencial.....	57
3.3.3 Efeito do eletrólito suporte.....	58
3.3.4 Estudo de interferentes em potencial.....	59

3.3.5 Curva analítica e aplicação.....	60
3.3.6 Adição e recuperação.....	63
3.3.7 Teste da repetibilidade e da reprodutibilidade.....	64
3.4 Determinação de levodopa.....	65
3.4.1 Comportamento eletroquímico da levodopa utilizando um GCE-MWCNTs/PAH.....	65
3.4.2 Efeito do eletrólito suporte.....	68
3.4.3 Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial.....	69
3.4.4 Estudo de interferentes em potencial.....	71
3.4.5 Curva analítica e aplicação.....	73
3.4.6 Adição e recuperação.....	75
3.4.7 Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade.....	76
3.5 Determinação de carbidopa.....	77
3.5.1 Comportamento eletroquímico da carbidopa utilizando um GCE-MWCNTs/PAH.....	77
3.5.2 Efeito do eletrólito suporte.....	78
3.5.3 Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial.....	78
3.5.4 Estudo de interferentes em potencial.....	81
3.5.5 Curva analítica e aplicação.....	82
3.5.6 Adição e recuperação.....	84
3.5.7 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade.....	85
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES.....	86
CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Composição da urina artificial	27
Tabela 3.1- Valores de áreas ativas encontradas para o GCE, GCE-PAH e GCE-MWCNTs/PAH.....	41
Tabela 3.2- Valores dos picos de corrente anódica com os respectivos potenciais para o sistema GCE-MWCNTs/PAH e GCE em presença de ciprofibrato $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	45
Tabela 3.3- Parâmetros, intervalos estudados e valores escolhidos para medidas de VPD na determinação de ciprofibrato.....	49
Tabela 3.4- Determinação de ciprofibrato em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método padrão.....	53
Tabela 3.5- Estudo de adição e recuperação de ciprofibrato em formulações farmacêuticas empregando um GCE-MWCNTs/PAH e DPV.....	54
Tabela 3.6- Valores das correntes de pico anódica e catódica e respectivos potenciais para os eletrodos GCE e para o GCE-MWCNTs/PAH na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	56
Tabela 3.7- Resultados encontrados na literatura para determinação de DA.....	56
Tabela 3.8- Resultados encontrados na literatura para a determinação de DA.....	62
Tabela 3.9- Determinação de DA em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método espectrofotométrico.....	62

Tabela 3.10- Resultados do teste de adição recuperação de DA adicionada em urina sintética empregando o GCE-MWCNTs/PAH proposto.....	64
Tabela 3.11- Valores de correntes anódicas e catódicas para a L-dopa encontradas na literatura.....	67
Tabela 3.12- Valores de tempo de pulso, velocidade de varredura e amplitude de pulso aplicado para determinação de L-dopa usando a técnica de VPD.....	72
Tabela 3.13- Resultados para determinação de L-dopa encontrados na literatura.....	74
Tabela 3.14- Determinação de L-dopa em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método de titulação potenciométrica.....	75
Tabela 3.15- Resultados obtidos para o estudo de adição e recuperação da L-dopa em amostras comerciais.....	76
Tabela 3.16- Parâmetros estudados, intervalos utilizados e valores selecionados para a determinação de carbidopa por VPD.....	81
Tabela 3.17- Resultados para determinação de cabidopa encontrados na literatura.....	83
Tabela 3.18- Determinação de carbidopa em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método oficial.....	84
Tabela 3.19- Resultados obtidos para o estudo de adição e recuperação da carbidopa em amostras comerciais.....	85

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.1- Representação de geométrica de um fullereno.....	4
Figura 1.2- Esquema para a representação dos tipos de nanotubos de carbonos existentes; (a) SWCNT, (b) DWCNT e (c) MWCNT.....	5
Figura 1.3- Estrutura monomérica do polietrólito PAH.....	7
Figura 1.4- Estruturas para os diferentes ácidos fíbricos utilizados como fármacos hipolímientes, (a) clofibrato, (b) genfibrozila, (c) fenofibrato, (d) ciprofibrato e (e) bezafibrato.....	9
Figura 1.5- Fórmula estrutural da DA.....	11
Figura 1.6- Estrutura molecular da L-dopa.....	14
Figura 1.7- Estrutura química da carbidopa.....	16
Figura 3.1- Resultado obtido para o estudo da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH por medidas de potencial ξ em função da variação do pH.....	34
Figura 3.2- Imagens de uma superfície sem filme de MWCNTs/PAH (a) e (b); imagens do filme de MWCNTs/PAH (c) e (d).....	35
Figura 3.3- (a) Voltamogramas obtidos durante o estudo de velocidade utilizando um GCE em presença de HCF $6,6 \times 10^{-4}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de 10 a 100 mV s^{-1} (b) Relação da raiz quadrada da velocidade em função do pico da corrente anódica para o cálculo da área ativa.....	38
Figura 3.4- (a) Voltamogramas obtidos durante o estudo de velocidade utilizando um GCE-PAH em presença de HCF $6,6 \times 10^{-4}$ em meio de KCl $0,1$	

- mol L⁻¹, nas velocidades de 10 a 100 mV⁻¹ (b) Relação da raiz quadrada da velocidade em função do pico da corrente anódica para o cálculo da área ativa..... 39
- Figura 3.5- (a) Voltamogramas obtidos durante o estudo de velocidade utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de HCF 6,6 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, nas velocidades de 10 a 100 mV s⁻¹ (b) Relação da raiz quadrada da velocidade em função do pico da corrente anódica para o cálculo da área ativa..... 40
- Figura 3.6- Voltamogramas cíclicos obtidos no estudo de velocidade para comparação de resposta entre um GCE, GCE-PAH e um GCE-MWCNTs/PAH em presença de HCF 6,6 x 10⁻⁴ em KCl 0,1 mol L⁻¹. v= 50 mV s⁻¹ 42
- Figura 3.7- Estudo da eletroatividade do ciprofibrato 4,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ com medidas de VPD utilizando um GCE-MWCNTs/PAH e um GCE em solução tampão fosfato 0,1mol L⁻¹ pH 7,0, v= 10 mV s⁻¹, A= 40 mV e t=0,100 ms..... 44
- Figura 3.8- Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação do pH do eletrólito suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pHs 6,1; 6,4; 7,0 e 7,4) em medidas de VPD para a determinação de ciprofibrato 9,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, v= 10 mV s⁻¹, A= 40 mV e t= 0,100 ms..... 45
- Figura 3.9- (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da variação da velocidade de varredura em ciprofibrato 2,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, (b) Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação da velocidade. A= 40 mV e t= 0,100ms..... 47
- Figura 3.10- (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da variação da amplitude de pulso aplicado em ciprofibrato 2,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, (b) Comportamento dos picos de corrente

anódica em função da variação da E. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100$ ms..... 48

Figura 3.11- (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da variação do tempo de pulso aplicado em ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, (b) Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação do tempo. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $E = 60$ mV..... 49

Figura 3.12- Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo de interferentes em potencial na determinação de ciprofibrato em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; (a) Ciprofibrato:LSS, (b) Ciprofibrato:Amido e (c) Ciprofibrato:Lactose. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,10 \text{ ms}$. $[\text{Ciprofibrato}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{interferentes}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 51

Figura 3.13- a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de ciprofibrato em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0: (1) $1,3 \times 10^{-5}$, (2) $2,6 \times 10^{-5}$, (3) $4,0 \times 10^{-5}$, (4) $5,3 \times 10^{-5}$, (5) $6,6 \times 10^{-5}$, (6) $7,9 \times 10^{-5}$, (7) $9,2 \times 10^{-5}$, (8) $1,0 \times 10^{-4}$, (9) $1,1 \times 10^{-4}$ e (10) $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica para o ciprofibrato. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100$ ms..... 52

Figura 3.14- Voltamogramas cíclicos obtidos com o um CE-MWCNTs/PAH e um GCE em meio de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50$ mV/s..... 55

Figura 3.15- Esquema para o mecanismo do processo redox da DA..... 57

Figura 3.16- Variação da resposta voltamétrica do GCE-MWCNTs/PAH com velocidade de varredura na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0..... 57

Figura 3.17- Dependência da raiz quadrada de velocidade de varredura para o

GCE-MWCNTs/PAH na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0.....	58
Figura 3.18- Curva analítica obtida em presença de DA em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 para o estudo de eletrólito para medidas de amperometria na determinação de DA.....	59
Figura 3.19- Voltamograma cíclico de medida simultânea em presença de DA ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), AA e AU ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$	60
Figura 3.20- (a) Amperograma obtido para a determinação de DA nas concentrações de $3,3 \times 10^{-6}$; $6,6 \times 10^{-6}$; $9,9 \times 10^{-6}$; $1,3 \times 10^{-5}$; $1,6 \times 10^{-5}$; $1,9 \times 10^{-5}$; $2, \times 10^{-5}$; $2,6 \times 10^{-5}$; $2,9 \times 10^{-5}$ e $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e $E= 0,2 \text{ V}$; (b) Curva analítica obtida para DA.....	61
Figura 3.21- (a) Amperograma obtido para a determinação de DA em meio de urina artificial; (b) Curva analítica obtida para DA em urina artificial. Medidas realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $E= 0,200 \text{ V}$	63
Figura 3.22- Ciclo voltamograma em presença de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ obtido com um GCE-MWCNTs/PAH em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$	65
Figura 3.23- Esquema para o mecanismo de processo redox da L-dopa.....	66
Figura 3.24- Voltamogramas de pulso diferencial para a comparação do comportamento do — GCE e do — GCE-MWCNTs/PAH em presença de L-dopa $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. $A= 40 \text{ mV}$, $v= 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $t= 0,100 \text{ ms}$	68
Figura 3.25- Comportamento do pico de corrente anódica e do potencial em	

- presença de L-dopa em diferentes eletrólitos. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ ms}$ 69
- Figura 3.26- (a) Influência da variação do tempo de pulso aplicado nos voltamogramas de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 40 \text{ mV}$), (b) Dependência da corrente de pico anódico com a variação do tempo de pulso aplicado para a L-dopa..... 70
- Figura 3.27- (a) Voltamogramas de pulso diferencial para o estudo da variação da velocidade de varredura em presença de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ ms}$), (b) Variação da velocidade de varredura em função do pico de corrente anódica..... 71
- Figura 3.28- (a) Influência da variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100 \text{ ms}$), (b) Dependência da corrente de pico anódico com a variação da amplitude de pulso de potencial para a L-dopa..... 72
- Figura 3.29- (a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de L-dopa medidos em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (1) $2,0 \times 10^{-6}$; (2) $3,9 \times 10^{-6}$; (3) $5,9 \times 10^{-6}$; (4) $7,9 \times 10^{-6}$; (5) $9,9 \times 10^{-6}$; (6) $1,1 \times 10^{-5}$; (7) $1,3 \times 10^{-5}$ (8) $1,5 \times 10^{-5}$; (9) $1,7 \times 10^{-5}$; (10) $1,9 \times 10^{-5}$; (11) $2,1 \times 10^{-5}$; (12) $2,3 \times 10^{-5}$; (13) $2,5 \times 10^{-5}$; (14) $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ ms}$. (b) Curva analítica para L-dopa..... 73
- Figura 3.30- Voltamograma cíclico obtido para carbidopa $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um — GCE e um — GCE-MWCNTs/PAH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 77
- Figura 3.31- (a) Voltamogramas obtidos para a variação da velocidade utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}$ em meio de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (b) Variação dos picos de corrente anódica em função da variação da velocidade de varreura. $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100$

S..... 79

Figura 3.32- **(a)** Voltamogramas obtidos para a variação da amplitude de pulso utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, **(b)** Variação dos picos de corrente anódica em função da variação da amplitude de pulso. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100$

S..... 80

Figura 3.33- **(a)** Voltamogramas obtidos para a variação do tempo de pulso utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa, **(b)** Variação dos picos de corrente anódica em função da variação do tempo de pulso. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 70 \text{ mV}$

81

Figura 3.34- **(a)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de carbidopa (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-6}$; (3) $3,9 \times 10^{-6}$; (4) $5,9 \times 10^{-6}$; (5) $7,9 \times 10^{-6}$; (6) $9,9 \times 10^{-6}$; (7) $1,1 \times 10^{-5}$; (8) $1,3 \times 10^{-5}$ (9) $1,5 \times 10^{-5}$; (10) $1,7 \times 10^{-5}$; (11) $1,9 \times 10^{-5}$; (12) $2,1 \times 10^{-5}$ e (13) $2,3 \times 10^{-5}$, **(b)** Curva analítica para carbidopa. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 70 \text{ mV}$ e $t = 0,010 \text{ s}$

82

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS IMOBILIZADOS EM FILMES DE HIDROCLORETO DE POLI(ALILAMINA) PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS. Pesquisas envolvendo nanotubos de carbono (NTC) apresentam um grande atrativo desde a sua síntese até a aplicação tecnológica. Como parte do trabalho foi estudado a formação e a estabilidade de uma dispersão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados em uma solução do polieletrólito hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH) $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (MWCNTs/PAH) a fim de se utilizá-la para a formação de filmes fabricados pela técnica de casting para modificação da superfície de eletrodos de carbono vítreo (GCE). Medidas de potencial zeta comprovaram a estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH. Após este estudo foram realizadas as modificações das superfícies dos GCE (GCE-MWCNTs/PAH) e verificou-se o comportamento eletroquímico do filme formado com medidas de voltametria cíclica em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($\text{K}_3[\text{FeCN}]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos comprovaram o efeito eletroquímico proporcionado pelos MWCNTs e com a equação de Randles-Sevcik obteve-se uma área ativa para o GCE-MWCNTs/PAH 1,2 vezes maior em relação ao GCE não modificado. Para a continuação do trabalho, foi avaliado o desempenho do GCE-MWCNTs/PAH em determinações voltamétricas e amperométricas dos fármacos, ciprofibrato, dopamina (DA), levodopa (L-dopa) e carbidopa. Para a determinação do Ciprofibrato foram realizadas medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e como eletrólito suporte foi utilizada uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A curva analítica obtida apresentou uma linearidade no intervalo de concentração de $1,33 \times 10^{-5}$ a $1,32 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $8,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Para a determinação de DA foram realizadas medidas amperométricas em um potencial de 0,2 V, e a curva analítica obtida apresentou uma linearidade no intervalo de concentração entre $3,32 \times 10^{-6}$ a $3,32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $5,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A determinação de L-dopa foi realizada com medidas de DPV e como eletrólito suporte foi utilizado uma solução de cloreto de sódio (NaCl) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica obtida apresentou uma linearidade no intervalo de concentração de $2,00 \times 10^{-6}$ a $2,72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de detecção encontrado foi de $8,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Para a

determinação de carbidopa foram realizadas medidas de DPV e como eletrólito suporte foi utilizada uma solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a curva analítica obtida apresentou uma linearidade no intervalo de concentração de $2,00 \times 10^{-6}$ a $2,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de detecção obtido foi de $6,50 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A GLASS CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBES IMMOBILIZED IN HYDROCHLORIDE POLY (ALLYLAMINE) FILMS FOR PHARMACEUTICALS DETERMINATION. Research involving carbon nanotubes (CNT) have a great attraction since its synthesis to the technology application. As part of the work was studied the formation and the stability of a functionalized Multiwall Carbon Nanotubes (MWCNTs) dispersion in a hydrochloride poly(allylamine) (PAH) polyelectrolyte solution $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (MWCNTs/PAH) in order to use it for surface modification of a glassy carbon electrodes (GCE) by casting technique. Zeta potential measurements confirmed the stability of the MWCNTs/PAH dispersion. After this study were carried out modifications of GCE surfaces with the MWCNTs/PAH (GCE-MWCNTs/PAH) dispersion and found the electrochemical behavior of the film formed by cyclic voltammetry with potassium hexacyano ferrate (III) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ in a potassium chloride solution $0, 1 \text{ mol L}^{-1}$. The results proved the electrochemical effect provided by the MWCNTs and with the Randles-Sevcik equation we have obtained an active area for GCE-MWCNTs/PAH 1.2 times higher compared to the GCE bare. For further study, we evaluated the GCE-MWCNTs/PAH performance in a pharmaceuticals formulations with voltammetric and amperometric determinations, ciprofibrate, dopamine (DA), levodopa (L-dopa) and carbidopa. The ciprofibrate determination were measured by differential pulse voltammetry (DPV) and was used as supporting electrolyte a solution of sodium phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} (pH 7,0). The analytical curve was linear in the ciprofibrate concentration range from 1.33×10^{-5} to $1.32 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ with a detection limit of $8.34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. For DA determination was measured by amperometric measurement in a potential of 0.2 V in a phosphate buffer solution 0.1 mol L^{-1} (pH 7.0) as supporting electrolyte, and the analytical curve showed a linearity over the concentration range between 3.32×10^{-6} to $3.32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with a detection limit of $5.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The L-dopa determination was done with the DPV and was used as a supporting electrolyte a sodium chloride solution (NaCl) 0.1 mol L^{-1} . The analytical curve obtained showed a linearity over the concentration range of 2.00×10^{-6} to $2.72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and the limit of detection was $8.4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The carbidopa determination were measured by DPV and was used as a supporting electrolyte a NaCl solution 0.1 mol L^{-1} and the analytical curve

showed a linearity over the concentration range of 2.00×10^{-6} to 2.34×10^{-5} mol L⁻¹ and detection limit obtained was 6.50×10^{-7} mol L⁻¹.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais

Considerando a grande demanda e a variedade de fármacos existentes no comércio é de grande importância a existência de técnicas analíticas que forneçam resultados confiáveis, pois o uso de fármacos que apresentam alterações na dosagem do seu princípio ativo pode provocar efeitos nocivos e até mesmo a morte do paciente. Para tanto, os métodos analíticos descritos nas Farmacopéias são aqueles utilizados nas indústrias farmacêuticas para o controle de qualidade desde a matéria prima até o produto acabado¹. Os métodos propostos nas farmacopéias, como os cromatográficos, espectrofotométricos e potenciométricos apresentam boa sensibilidade e exatidão. No entanto, a maioria deles envolve etapas de pré-tratamento e extração do analito com solventes orgânicos, gerando quantidade excessiva de resíduos tóxicos, além de serem morosos. Sendo assim, é de grande interesse o desenvolvimento de métodos mais simples, rápidos, com bom desempenho analítico e que empreguem soluções aquosas, como é o caso dos métodos eletroanalíticos²⁻⁸. Dentre as vantagens apresentadas pelas técnicas eletroquímicas de análise tem-se o baixo custo quando comparado com as técnicas cromatográficas, baixo limite de detecção, análise direta da amostra sem a necessidade de separação ou pré-tratamento sofisticado da amostra, não é necessário o uso de solventes tóxicos. Ademais, é possível se determinar o analito diretamente em soluções coloridas ou com partículas sólidas em suspensão⁹.

Para o sucesso nas determinações de fármacos, além da escolha de uma técnica eletroquímica adequada, a escolha do eletrodo de trabalho pode ser de fundamental importância. Para este trabalho foi estudado o comportamento de um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês Glassy Carbon Electrode) quimicamente modificado (EQM) com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados e imobilizados no polieletrólito hidrocloreto de poli(alilamina) na determinação de formulações farmacêuticas de interesse. O termo EQM foi utilizado inicialmente por MOSES *et al.*¹² em 1975 para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas e convenientemente imobilizadas em suas superfícies com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface

eletrodo/solução. A escolha do material do eletrodo que sofre a modificação na superfície é de grande importância para que os efeitos eletroquímicos previstos sejam alcançados. O substrato deve apresentar características eletroquímicas adequadas e também ser apropriado para o método de modificação escolhido. Dentre os materiais mais utilizados está o ouro, a platina, o carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e a pasta de carbono.

De acordo com a literatura, a modificação da superfície de um eletrodo utilizando nanotubos de carbono pode promover a eletrocatalise, aumento da sensibilidade e ainda a possibilidade da determinação simultânea de substâncias de interesse^{10, 11}.

1.2- Nanotecnologia e nanotubos de carbono

O termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez por TANIGUCHI¹³ em 1974 com a publicação do seu trabalho intitulado “On the basic concept of nanotechnology”, sendo descrito nesse artigo a produção de materiais com escalas menores que 1 μm , isto é, materiais com dimensões nanométricas.

Há alguns anos atrás, a aplicação da nanotecnologia parecia estar um pouco distante, mas com o avanço da tecnologia, tornou-se um tema com grande impacto na pesquisa e geração de literatura na área (livros e artigos diversos).

A nanotecnologia tem como característica principal as propriedades oferecidas pelos nanomateriais; características químicas, físicas e biológicas nunca observadas antes em materiais de maior escala¹⁴. Dentre os nanomateriais de grande interesse, têm-se os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês Carbon Nanotubes) e tratando-se do elemento químico carbono (C), este se apresenta como um material muito interessante devido à capacidade de gerar diferentes ligações químicas adjacentes e produzindo desta maneira diferentes tipos de materiais, como o diamante e o grafite. Em 1978 WILES e ABRAHAMSON¹⁵ descrevem suas observações sobre fibras de carbono com diâmetro de 4 nm a 100 nm. Já em 1985, KROTO *et al.*¹⁶ sintetizaram mais uma forma do carbono, o fulereno, uma estrutura fechada do carbono promovida pela hibridização sp^2 e pelos defeitos topológicos. A FIGURA 1.1 apresenta a estrutura geométrica de um tipo de fulereno.

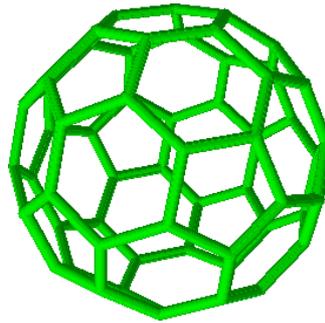


Figura 1.1- Representação geométrica de um tipo de fulereno.

E finalmente em 1991, IIJIMA¹⁷ apresenta uma nova estrutura do carbono, a qual foi nomeada de nanotubo de carbono, devido sua estrutura tubular nanométrica. Desde então, os CNTs são materiais de grande interesse para pesquisa¹⁸. Atualmente são relatados três tipos de CNTs¹⁸. Os de parede simples (SWCNT, do inglês Single Wall Carbon Nanotubes), os de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês Multiwall Carbon Nanotubes) e uma forma especial, o CNT de parede dupla (DWCNT, do inglês Doublewall Carbon Nanotubes). A FIGURA 1.2 apresenta os esquemas para os tipos de nanotubos de carbono.

Um grande incentivo para o avanço das pesquisas envolvendo CNTs se dá devido ao processo de sua síntese, o que levou a produção de CNTs com boa qualidade¹⁸. Um desses avanços pode ser creditado ao pesquisador Smalley na Rice University¹⁸, que possibilitou a execução de estudos de microscopia^{19,20} e espectroscopia²¹ que permitiram comprovar as propriedades físicas dos CNTs previstas na década de 90^{22,23}.

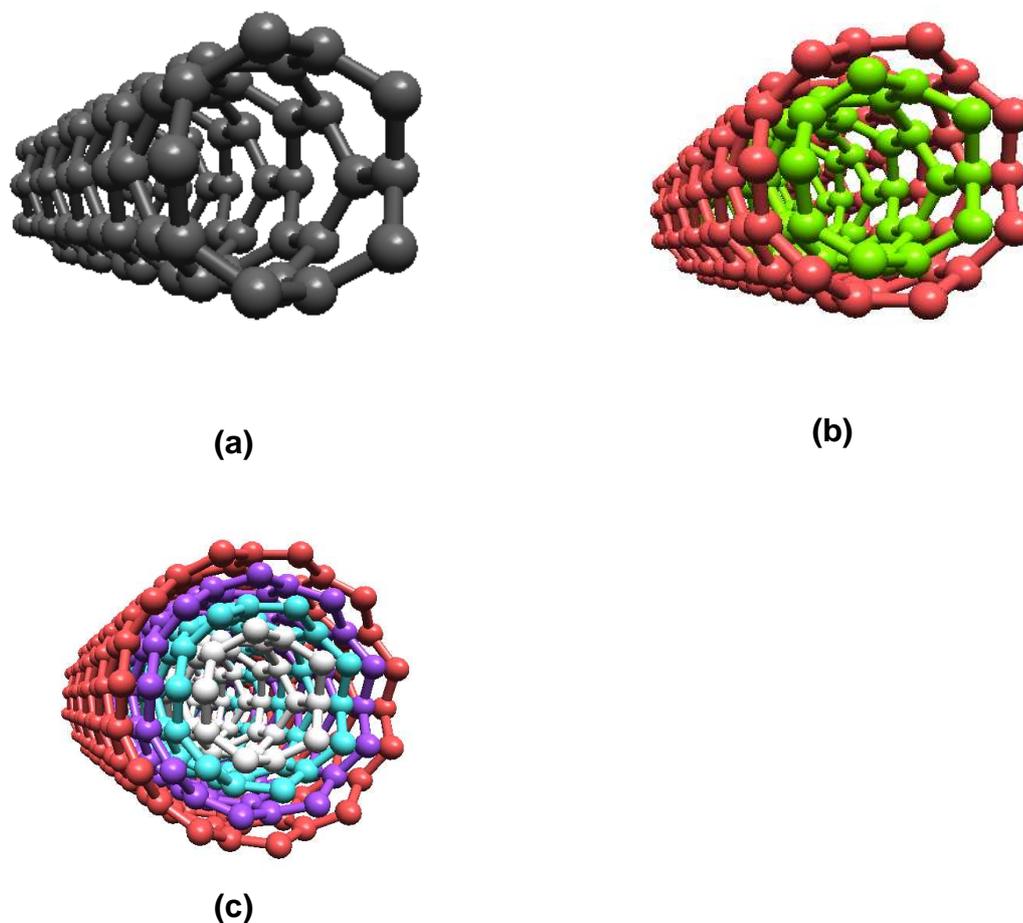


Figura 1.2- Esquema para a representação dos tipos de nanotubos de carbonos existentes; **(a)** SWCNT, **(b)** DWCNT e **(c)** MWCNT.

Os CNTs apresentam propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas adequadas para a fabricação de dispositivos, como emissores de elétrons para mostradores, sensores de gases, sensores químicos, físicos e biológicos, pontas para microscópios de força atômica (AFM) e quando aplicados em compósitos oferecem excelentes propriedades mecânicas¹⁸.

Outra propriedade apresentada pelos CNTs é a possibilidade de se realizar funcionalizações nas paredes, pontas ou por encapsulamento. Os CNTs funcionalizados podem apresentar propriedades diferentes em relação aos nanotubos sem funcionalização. Esta possibilidade é muito explorada na área de sensores e biossensores, pois os CNTs modificados apresentam como características a facilidade de interações com moléculas orgânicas e biológicas²⁴,

com grupos químicos encontrados em fármacos ou moléculas tóxicas e, até mesmo, com vírus e bactérias²⁵⁻²⁸.

Em dispositivos eletrônicos e eletromecânicos em escala nanométrica os CNTs funcionalizados despertam o interesse devido a melhora nas propriedades físicas, como por exemplo, a resistência e a flexibilidade¹⁸.

1.3- Dispersões coloidais

Colóides ou dispersões coloidais, são misturas heterogêneas que apresentam no mínimo duas fases distintas, sendo uma a fase dispersa (fase da matéria finamente dividida) e a fase contínua (meio de dispersão). Ambas as fases podem ser sólidas, líquidas ou gasosas. Podem-se considerar como colóides sistemas que apresentam um dos componentes com uma dimensão entre 1 a 1000 nm. De acordo com o tamanho das partículas dispersas pode-se classificar os colóides como polidispersos, quando as partículas apresentam tamanhos diferentes, e monodispersos quando as partículas apresentam tamanhos iguais. Sendo assim, as propriedades das soluções coloidais estão diretamente ligadas à área superficial da fase dispersa, bem como as propriedades químicas desta fase²⁹.

Tratando-se de dispersões envolvendo materiais nanoparticulados, há um grande desafio devido à alta reatividade desses materiais que tendem a formar aglomerados. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de carbono (CNTs) são certamente os mais estudados atualmente devido a suas propriedades físicas³⁰. No entanto, desde a sua produção até sua purificação apresentam-se como um sólido de difícil tratamento. Tais tratamentos são utilizados para dispersá-los em fase líquida. Uma alta qualidade de dispersão é apresentada quando ocorre a individualização dos nanotubos de carbono e, além disso, a estabilidade deve ser mantida até altas concentrações onde possa apresentar uma possibilidade de aplicação tecnológica. Teoricamente há uma grande dificuldade para se obter tal condição, pois os CNTs apresentam uma grande atração entre si e acabam formando aglomerados³¹. Desta forma uma dispersão ideal deve apresentar parte dos CNTs individualizados e parte em agregados. Para a formação da dispersão de CNTs são encontradas na literatura três estratégias, (I) dispersão em solventes orgânicos, (II) dispersão em surfactantes, polímeros ou biomoléculas (DNA) e (III) a dispersão com funcionalização covalente com moléculas volumosas que estabilizam

os CNTs quer estericamente ou eletrostaticamente. O que define a escolha dentre as três estratégias é a concentração da dispersão que se necessita. A utilização de solventes orgânicos, por exemplo, apresentam baixíssimas concentrações, cerca de 2×10^{-5} mg/mL³⁰.

Para este trabalho foi estudado a estabilização da dispersão por interações eletrostática, utilizando como fase dispersante, uma solução de hidrocloreto de polialilamina (PAH). O PAH é um polieletrólito (macromoléculas de cadeia longa), obtido por associação de monômeros simples e, quando dissolvido em solventes polares, principalmente a água, apresenta cargas positivas ou negativas. Esse polieletrólito é muito utilizado na construção de materiais híbridos, materiais nanoestruturados e automontados³². A FIGURA 1.3 apresenta o esquema para a estrutura química do PAH.

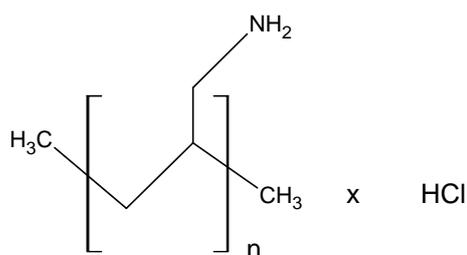


Figura 1.3- Estrutura monomérica do polietrólito PAH.

O PAH, assim como outros géis de polieletrólitos, é utilizado para vários tipos de aplicações, por exemplo, na formação de filmes finos utilizados em sensores por apresentar pouca variação no volume de transição em diferentes temperaturas, pHs e solventes³³.

1.4- Fármacos

Fármacos são substâncias responsáveis pelo alívio de dores e ou sintomas e até mesmo a cura de doenças crônicas, entretanto, pode provocar efeito indesejados durante o tratamento. Neste trabalho, os fármacos utilizados foram o ciprofibrato, um controlador de triglicérides, a dopamina (DA), levodopa e carbidopa, todos com efeito no sistema nervoso central.

1.4.1- Ácidos fíbricos³⁴

O início da aplicação dos ácidos fíbricos como fármacos com ações hipolipidêmicas (normalização de gordura no sangue) teve início em 1962, quando dois pesquisadores, THOP E WARING observaram que o etil clorofenoisobutirato provocou uma redução dos níveis de lipídios em ratos. Em 1967, a forma etil éster do clorofenoisobutirato (clofibrato) foi aprovada para uso nos EUA e tornou-se o fármaco hipolipidêmico mais amplamente prescrito. Entretanto, houve um declínio em seu uso devido às pesquisas realizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que indicou apenas uma diminuição de 9% nos níveis de colesterol, mas, no entanto, não foi observada a diminuição dos eventos cardiovasculares fatais, embora tivesse ocorrido uma redução dos infartos não-fatais. Desta maneira, outro derivado dos fibratos, a genfibrozila (ácido fenoxipentanóico não halogenado), foi testada. Este estudo foi realizado em três casos clínicos, sendo que em dois estudos envolvendo apenas homens, não houve o aumento da morbidade e da mortalidade. O terceiro caso envolvendo homens e mulheres apresentou uma diminuição na mortalidade no subgrupo de pessoas que apresentavam altos níveis de triglicerídios e baixo nível do bom colesterol (HDL, do inglês high density lipoprotein).

Desta maneira, outros derivados dos ácidos fíbricos foram desenvolvidos, como por exemplo, o ciprofibrato, o bezafibrato e o fenofibrato, sendo conhecidos como agentes de segunda geração. A FIGURA 1.4 apresenta as respectivas estruturas moleculares dos ácidos fíbricos mencionados.

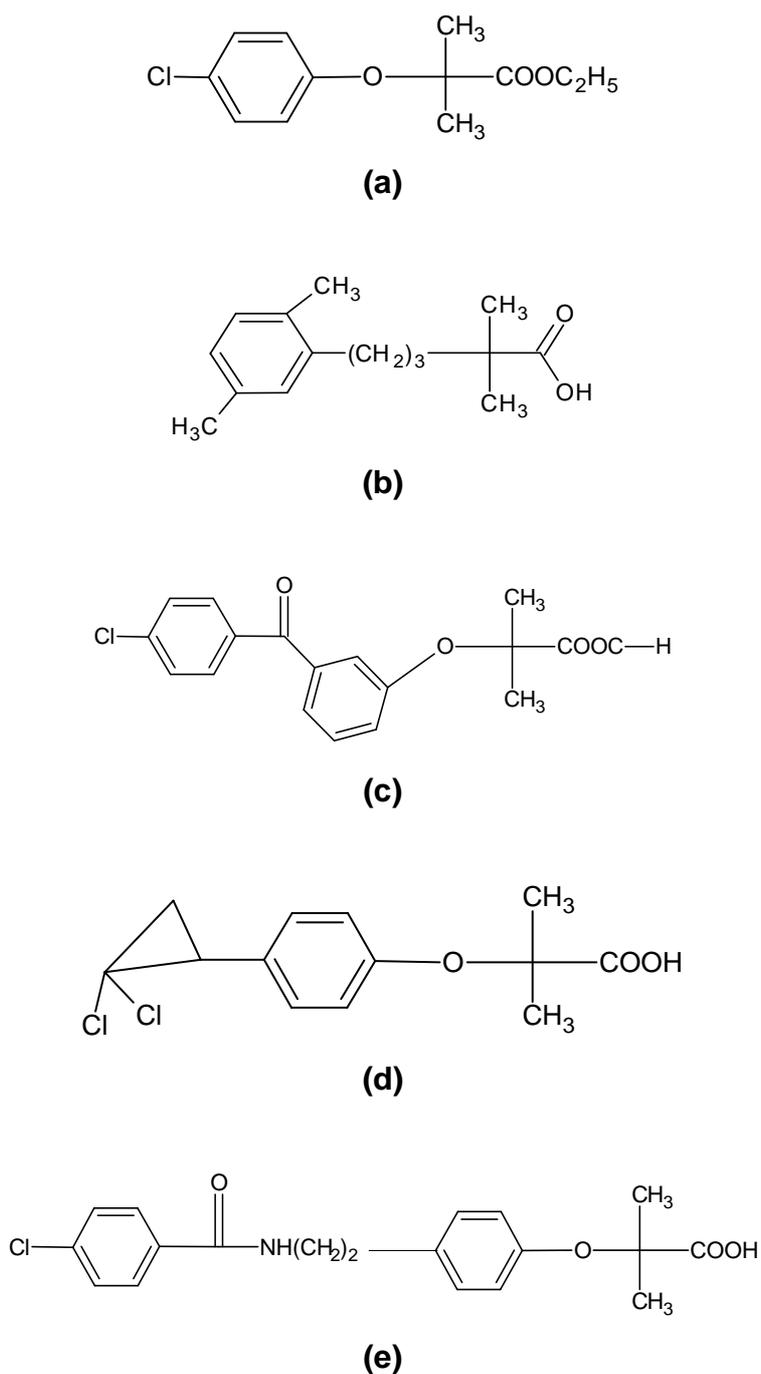


Figura 1.4- Estruturas moleculares para os diferentes ácidos fibrícos utilizados como fármacos hipolímíntes, **(a)** clofibrato, **(b)** genfibrozila, **(c)** fenofibrato, **(d)** ciprofibrato e **(e)** bezafibrato.

Apesar de extensos estudos, o mecanismo de ação dos fibratos na diminuição dos níveis de lipoproteínas ou no aumento do HDL em humanos ainda se apresenta com muitas dúvidas. Estudos recentes sugerem que muitos dos efeitos desses compostos sobre os lipídios do sangue são mediados pela sua interação

com os receptores ativados pelo proliferador peroxissômico (PPAR) que regulam a transcrição gênica. Foram identificados 3 isótopos do PPAR (α , β e γ). Os fibratos se ligam ao PPAR α , que é expresso primeiramente no fígado e no tecido adiposo marrom. Em presença de fibratos, os PPAR α da oxidação dos ácidos graxos funcionam como mediadores na diminuição de triglicerídeos, por aumento da síntese da lipoproteína lípase (LPL) e a redução da apolipoproteína C3, que é considerada uma lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL).

1.4.1.1- Métodos para determinação de fibratos

Em um trabalho realizado por MASNATA *et al.*³⁵, foram quantificados o bezafibrato, ciprofibrato e ácido fenofíbrico em plasma humano utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector ultravioleta (UV) obtendo-se um limite de quantificação de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Huttemann e Blaschke³⁶ conseguiram determinar e separar uma mistura racêmica de ciprofibratos e seus metabólitos em amostras de urinas de três voluntários com a técnica de eletroforese capilar. Uma vez ingerido o ciprofibrato, este é conjugado ao ácido glicorônico e a forma excretada pela urina é o glicoronídeo. O glicoranídeo foi isolado por métodos cromatográficos e a sua caracterização foi realizada pela alcalinidade, hidrólise enzimática, espectrometria de massa e por ressonância magnética nuclear. Desta maneira, foram coletadas amostras de urina em um intervalo de 12 horas e até 96 horas após a ingestão do medicamento. Como exemplo de quantificação em um intervalo entre 36 a 48 horas após a ingestão do medicamento pelo voluntário 1 foi possível encontrar 24,80% de ciprofibrato-R e 75,20% para o ciprofibrato-S com um desvio padrão de 0,86.

Até o presente momento, os dois trabalhos citados acima foram os mais relevantes para a discussão desta parte do trabalho, sendo que, há poucos métodos analíticos com exceção dos métodos cromatográficos, e nenhum trabalho que utilize métodos eletroquímicos para a determinação deste fármaco. Muito se ouve a respeito da saúde humana em relação ao controle do colesterol juntamente com o aumento de triglicérides e sendo este fator uma das principais causas de óbito no mundo. Desta maneira, este trabalho pode contribuir para o início de um

desenvolvimento e aprimoramento de técnicas eletroanalíticas e analíticas para a determinação deste fármaco e seus derivados.

1.4.2- Dopamina

O 3,4-dihidroxyfenil etilamina, comumente conhecido como dopamina (DA), pertencente à classe das catecolaminas, foi descoberto durante o final da década 50 e é encontrada uma alta concentração na região do cérebro (50 nmol/g. A DA é um importante neurotransmissor nos mamíferos, precursor metabólico da norepinefrina e da epinefrina e está amplamente distribuído no cérebro para transferência de mensagens e apresenta um importante papel na função do sistema nervoso central, renal hormonal e cardiovascular. A FIGURA 1.5 apresenta a fórmula estrutural da DA³⁷⁻³⁹.

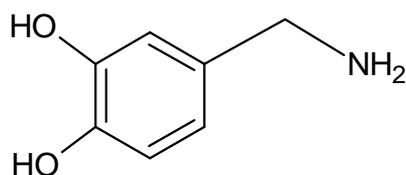


Figura 1.5- Fórmula estrutural da DA.

Baixos níveis de DA indicam desordem neurológica provocando doenças como a esquizofrenia, mal de Parkinson, além de possíveis infecções por pessoas infectadas com o HIV^{37,40}. Como medicamento a DA apresenta uma propriedade vaso dilatador, desta maneira é utilizada em casos de vários tipos de choques e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio⁴¹. Como a DA é um substrato da monoamina oxidase e do catecol O-metiltransferase, não pode ser administrada via oral³⁴. Desta maneira, a DA é uma substância de grande interesse e pesquisa no desenvolvimento de métodos para a quantificação de dopamina em medicamentos, no sangue e em outros fluidos biológicos⁴².

1.4.2.1- Métodos para determinação de dopamina

A quantificação de DA em meios químicos, biológicos e ambientais são de grande importância⁴³⁻⁴⁸. Os métodos mais utilizados para a quantificação de DA são a cromatografia líquida/espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS)⁴⁹, a cromatografia⁵⁰⁻⁵², espectrometria de massa por eletroforese capilar⁵³, espectrofotometria⁵⁴, espectrofluorimetria⁵⁵, radioimunoensaio^{56,57} e coluna cromatográfica de troca iônica⁵⁸. Alguns desses métodos necessitam de instrumentos que possuem alto custo e não são isentos de vários tipos de interferências. Desta maneira, houve uma crescente demanda por métodos analíticos mais sensíveis e simples. Dentre os métodos de determinação, as abordagens eletroquímicas, apresentam considerável atenção, porque esses métodos são de baixo custo, simples, preciso e rápido⁵⁹. Além disso, este trabalho apresenta a possibilidade de se ter um sistema portátil e sensível para a determinação local de DA.

Em um trabalho realizado por ZHANG *et al.*⁶⁰ determinaram DA por um método colorimétrico utilizando nanopartículas de ouro, que ao se agregar a DA promove uma mudança de coloração, de vermelho para azul púrpura. Desta maneira foi obtida uma curva analítica linear com duas faixas de concentração, uma de $3,3 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e outra de $3,0 \times 10^{-7}$ a $4,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e o limite de detecção do método foi de $3,0 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹.

SILVA *et al.*⁶¹ desenvolveram um biossensor de fibra ótica com foto-detecção para determinação de catecolaminas (dopamina, noraepinefrina e epinefrina) em fluidos biológicos baseado na capacidade de reconhecimento da enzima lacase. Com as catecolaminas utilizadas neste trabalho foi obtida uma curva analítica linear no intervalo de 5 a 125 pg mL⁻¹ e o limite de detecção de 2,1; 2,6 e 3,4 pg mL⁻¹ para DA, noraepinefrina e epinefrina, respectivamente.

ZHAO e SUO⁶² determinaram DA em tecidos cerebrais de ratos utilizando HPLC com detector de fluorescência. Neste trabalho foi obtida uma curva analítica no intervalo de concentração de $2,4 \times 10^{-9}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção $1,25 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

MUZZI *et al.*⁶³ desenvolveram um novo método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando simultaneamente um detector de UV-VIS e outro fluorimétrico para a determinação simultânea de levodopa, DA, 3-*o*-metildopa e a α -metildopa. Com esta técnica foram obtidas curvas analíticas com linearidade no intervalo de $5,0 \times 10^{-13}$ a $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para levodopa, DA e a α -metildopa. Para a 3-*o*-metildopa os resultados não foram satisfatórios. Neste trabalho os limites de detecção foram omitidos.

Em nosso grupo de pesquisa, três trabalhos foram desenvolvidos para a determinação de DA em formulações farmacêuticas. LUPETTI *et al.*⁶⁴ desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo por zonas coalescentes para determinação enzimática de DA. Neste trabalho foi utilizada a enzima polifenol oxidase extraída do abacate, a qual oxida a dopamina a dopaminaquinona e este produto formado pode ser monitorado espectrofotometricamente em 466 nm. Com este método foi obtido uma curva analítica no intervalo de concentração de $5,3 \times 10^{-5}$ a $5,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $1,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Em outro trabalho realizado por CARUSO *et al.*⁶⁵ foi desenvolvido um biossensor de pasta de carbono modificado com polifenol oxidase extraída do cará para determinação de DA e epinefrina utilizando a técnica de voltametria cíclica. Os resultados obtidos apresentaram uma curva analítica com linearidade no intervalo de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para a epinefrina e $2,0 \times 10^{-3}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para a DA. Os limites de detecção foram respectivamente $8,2 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para epinefrina e DA. O terceiro trabalho realizado por VIEIRA *et al.*⁶⁶ foi a determinação enzimática da DA e metildopa com detecção espectrofotométrica. A enzima utilizada, polifenol oxidase, foi extraída da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM). A ação enzimática faz com que as correspondentes catecolaminas utilizadas passem a forma metildopaquinona e dopaminaquinona, e rapidamente por uma auto oxidação espontânea é obtido a forma metildopacromo e dopaminacromo que apresentam uma absorção em 480 e 470 nm respectivamente. Desta maneira, foram obtidas curvas analíticas com linearidade no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ a $6,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os limites de detecções foram de $3,4 \times 10^{-5}$ e $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para metildopa e DA respectivamente.

1.4.3- Levodopa

O fármaco Levodopa (L-dopa), beta-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina pertence à classe das catecolaminas e é o precursor da dopamina. Desta maneira, seu uso está relacionado ao tratamento de pessoas com mal de Parkinson devido à capacidade da L-dopa de ultrapassar a barreira sanguínea existente no cérebro (barreira hematoencefálica) e após esta transposição, há a conversão da L-dopa em DA por uma reação enzimática realizada pela dopa descarboxilase, ocorrendo desta maneira a reposição de DA no cérebro³⁴. A FIGURA 1.6 apresenta a estrutura molecular da L-dopa.

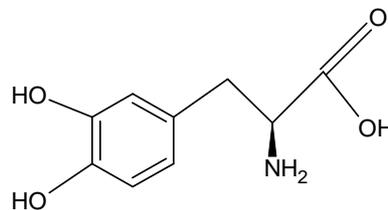


FIGURA 1.6- Estrutura molecular da L-dopa.

Na prática clínica a L-dopa é administrada juntamente com o inibidor da dopa descarboxilase, como a carbidopa e a benserazida, que não penetram no sistema nervoso central (SNC). Se a L-dopa for administrada isoladamente, grande parte é descarboxilada pelas enzimas presentes na mucosa intestinal e em outros tecidos periféricos, de forma que quantidades mínimas e inalteradas chegam à circulação cerebral³⁴.

A L-dopa quando administrada por via oral, rapidamente é absorvida no intestino delgado pelo sistema transportador dos aminoácidos aromáticos. Níveis plasmáticos máximo deste fármaco são observados entre 0,5 a 2 horas após a dose oral. Fatores como o pH e esvaziamento do suco gástrico e o tempo em que o fármaco fica exposto às enzimas degradativas presentes na mucosa do estômago e intestino influenciam na amplitude da absorção da L-dopa. Competições pelos locais de absorção no intestino delgado com os aminoácidos proveniente da alimentação, também pode influenciar na velocidade de absorção da L-dopa, desta maneira não é aconselhável ingerir L-dopa após as refeições³⁴.

O uso de L-dopa por pacientes com mal de Parkinson tem apresentado bons resultados, como a melhora na condução nervosa e nos distúrbios do movimento. Em tratamentos crônicos utilizando L-dopa, ocorrem efeitos colaterais como vômitos e náuseas devido ao aumento de L-dopa no plasma. Desta maneira, é de grande importância a determinação de L-dopa tanto para área farmacêutica quanto para os procedimentos clínicos³⁴. Muitos métodos são encontrados na literatura para a determinação de L-dopa, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência⁶⁷, espectrofotometria^{46,68,69}, cromatografia gasosa⁷⁰, quimioluminescência⁷¹ e análise por injeção em fluxo^{72,73}. Quanto às técnicas eletroquímicas, de acordo com a pesquisa realizada, existem poucos eletrodos de trabalhos desenvolvidos para a determinação deste fármaco, sendo assim, este trabalho vem a contribuir com um novo sistema sensor para a determinação da L-dopa em fármacos e com a possibilidade de determinação em meios biológicos.

A utilização de eletrodos modificados com nanotubos de carbono apresenta um grande interesse no desenvolvimento de sistemas sensores devido suas propriedades eletrocatalíticas. Trabalhos encontrados na literatura demonstram uma forte eletroatividade dos nanotubos de carbono na determinação de biomoléculas como o citocromo C, NADH, ácido ascórbico e catecolaminas (dopamina e epinefrina). Desta maneira, se justifica o interesse no estudo do desempenho do GCE-MWCNTs/PAH na determinação de L-dopa neste trabalho⁷⁴.

1.4.3.1- Métodos para determinação de levodopa

Além da determinação eletroquímica da L-dopa, outros métodos são encontrados na literatura para a quantificação e determinação de L-dopa^{63,75-77}.

CHEN *et al.*⁶³ determinaram levodopa em favas de feijão e em lentilhas por eletroforese de zona capilar. A condição ideal encontrada para esta determinação utilizou uma solução de tampão fosfato em pH 4,55, um potencial de 17,5 KV à temperatura de 30 °C. Com estes parâmetros foi obtida uma curva analítica com linearidade no intervalo de 5,0 a 300 µg/mL e o limite de detecção encontrado foi de 0,7 µg/mL.

MADRAKIAN *et al.*⁷⁸ determinaram L-dopa e propranolol utilizando a técnica de fluorescência em meio de micelas de dodecilssulfato de sódio. A curva analítica obtida apresentou uma linearidade no intervalo de $2,00 \times 10^{-8}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

para L-dopa e $3,60 \times 10^{-9}$ a $1,80 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o propranolol. Os limites de detecção foram de $4,83 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $7,76 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ para a L-dopa e propranolol respectivamente.

ZHAO *et al.*⁷⁹ utilizaram o método de eletroforese capilar com detecção por quimioluminescência para a determinação de L-dopa em plasma humano e em fármacos. Este método baseia-se na reação da L-dopa entre o luminol e o hexacianoferrato (III) de potássio em meio alcalino. Com o método desenvolvido foi possível obter-se uma curva analítica linear no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ a $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Um trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa por MARCOLINO-JÚNIOR *et al.*⁷³ desenvolveram um procedimento espectrofotométrico por injeção em fluxo para a determinação de L-dopa em comprimidos. A determinação da droga foi realizada pela reação com dióxido de chumbo (IV) imobilizada em resina de poliéster em um reator em fase sólida, sendo o dopacromo formado na reação monitorado em 520 nm. Em outro trabalho realizado em nosso grupo, Melo *et al.*⁸⁰ desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em resina de poliéster para determinação simultânea de L-dopa e carbidopa utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Neste trabalho obteve-se uma curva analítica linear na faixa de concentração de $2,6 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e $3,2 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para L-dopa e carbidopa, respectivamente. Os limites de detecção encontrados foram de $2,5 \times 10^{-5}$ e $3,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para L-dopa e carbidopa, respectivamente.

1.4.4- Carbidopa

O fármaco carbidopa ou ácido (-)-L-2(3,4-dihidroxibenzil)-2-propionico-hidrazina pertence à classe das catecolaminas e seu uso está associado ao fármaco L-dopa³⁴. A FIGURA 1.7 apresenta a estrutura química da carbidopa.

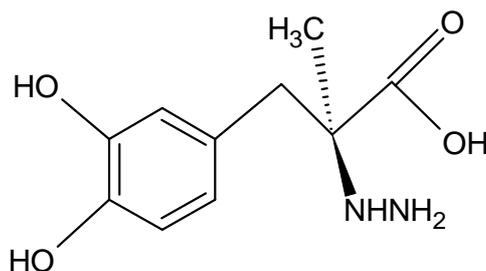


FIGURA 1.7- Estrutura química da carbidopa.

Como apresentado anteriormente, a L-dopa por ser um precursor da DA, é utilizada para a reposição de DA no cérebro a fim de se proporcionar uma melhora nos sintomas do mal de Parkinson, como por exemplo, os distúrbios do movimento^{80,81}. Apesar da eficiência na reposição de DA com o uso da L-dopa, alguns efeitos colaterais da DA podem aparecer se a L-dopa for utilizada isoladamente, pois ao entrar em contato com a mucosa intestinal, a L-dopa é descarboxilizada pelas enzimas da mucosa intestinal, sendo assim, uma grande quantidade de DA é formada antes de chegar ao cérebro, causando assim a ineficiência do tratamento. Assim, para um melhor efeito do tratamento com uma baixa toxicidade, a carbidopa é administrada em associação com a L-dopa (cerca de 10 a 25%). A carbidopa é uma catecolamina que inibe a atividade da enzima dopa descarboxilase, desta maneira o uso da L-dopa combinada com carbidopa promove um controle de forma que a DA atinja uma concentração ideal no cérebro, reduzindo assim os efeitos colaterais^{76,80,81}. Por outro lado, as catecolaminas são encontradas em várias formulações farmacêuticas e o desenvolvimento de técnicas simples, rápidas, precisas e exatas são de grande interesse. De acordo com a pesquisa realizada, poucos trabalhos que utilizam eletrodos modificados juntamente com a técnica de DPV foram encontrados para a determinação e quantificação da carbidopa. Sendo assim, esta parte do trabalho vem explorar o potencial deste eletrodo aliado à modificação com um filme de MWCNTs/PAH juntamente com a técnica de DPV, que é uma técnica útil para a determinação de muitas moléculas biológicas importantes. A sensibilidade e seletividade, a exatidão e precisão, simplicidade e a não necessidade de pré-tratamento da amostra, são as maiores vantagens desta técnica⁸⁰.

1.4.4.1- Métodos para determinação de carbidopa

A determinação de catecolaminas em amostras biológicas requer análises que utilizam técnicas de traço, principalmente a cromatografia com detecção fluorimétrica ou eletroquímica⁸². Outras técnicas empregadas incluem a espectrofotometria e a eletroforese de zona capilar com detecção eletroquímica⁸⁰.

KIM *et al.*⁷⁶ determinaram simultaneamente L-dopa e carbidopa em formulações farmacêuticas e em amostras de urina utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência síncrona. Em um $\Delta\lambda = 30$ nm pode-se detectar o sinal da carbidopa sem a influência da L-dopa, enquanto que em $\lambda = 65$ nm pode-se detectar o sinal da L-dopa sem a influência da carbidopa. Desta maneira foi obtida uma curva analítica para esses dois fármacos. O intervalo linear obtido foi de 0,019 a 1,971 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para L-dopa e 0,022 a 2,262 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para carbidopa. Os limites de detecção encontrados foram de 0,006 e 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para L-dopa e carbidopa respectivamente.

TALEBPOUR *et al.*⁸³ utilizaram espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H ($^1\text{H NMR}$) para identificar e quantificar L-dopa, carbidopa e metildopa em soro humano e em formulações farmacêuticas. As análises qualitativas e quantitativas são baseadas na ressonância característica dos grupos funcionais presentes na estrutura e a relação integral dos sinais selecionados pertencentes a diferentes compostos em relação aos de um padrão interno, respectivamente. Neste estudo foram obtidas curvas analíticas com linearidade no intervalo de 0,08 a 24 mg mL^{-1} para L-dopa, 0,04 a 12,0 mg mL^{-1} para carbidopa e 0,03 a 9,0 mg mL^{-1} para metildopa. Os limites de detecção calculados foram de 4,2; 1,7 e 1,6 para L-dopa, carbidopa e metildopa respectivamente.

ZHANG *et al.*⁸⁴ obtiveram a separação e a quantificação de L-dopa e carbidopa em comprimidos por eletroforese capilar com detector amperométrico. Um potencial de 900 mV (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1})) foi aplicado em um eletrodo de carbono. Em condições ideais foi possível separar completamente em 12 minutos esses dois fármacos, obtendo-se um intervalo linear de 1,2 a 100,0 e 1,2 a 150,0 $\mu\text{g/mL}$ e um limite de detecção de 0,6 e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de L-dopa e carbidopa respectivamente.

1.5- Conceitos básicos sobre farmacocinética e farmacodinâmica³⁴

O entendimento da ação de um fármaco no organismo não depende somente da compreensão de ação do fármaco em um tecido específico ou em um receptor. É necessária também a compreensão de dois assuntos, a farmacocinética e a farmacodinâmica. A farmacocinética estuda o processamento do fármaco no organismo, isto é, a absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e eliminação. Já a farmacodinâmica estuda a interação do fármaco com o organismo. Desta maneira, a farmacocinética e a farmacodinâmica explicam a ação terapêutica do fármaco no organismo.

1.5.1- Farmacocinética³⁴

A farmacocinética estuda o processamento do fármaco no organismo desde a absorção até a excreção, situações as quais, dependem do transporte através das membranas celulares. Desta maneira, a forma que ocorre esse transporte e as propriedades físico-químicas das moléculas e membranas é de grande importância para o entendimento da disposição dos fármacos no corpo humano. Características como massa molar e configuração, grau de ionização, lipossolubilidade relativa dos seus compostos ionizados e não-ionizados e ligações às proteínas séricas e teciduais, são responsáveis pelo mecanismo de transporte e a disponibilidade nos locais de ação.

A maioria dos fármacos é considerada como bases ou ácidos fracos presentes em solução na forma ionizada e não-ionizada. Em geral as moléculas não ionizadas são lipossolúveis e podem difundir facilmente pela membrana celular, já as moléculas ionizadas geralmente não conseguem penetrar na membrana lipídica, pois são pouco lipossolúveis. Desta maneira, a distribuição através das membranas de um eletrólito fraco é determinado pelo seu pK_a e pelo gradiente de pH através da membrana. O pK_a é igual a $-\log K_a$ sendo que quando o $pH = pK_a$, a metade do fármaco (eletrólito fraco) está na forma ionizada. A relação entre as formas ionizadas

e não ionizadas do fármaco em determinado pH é calculada facilmente pela equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

Onde $[A^-]$ é a concentração da forma ionizada e $[HA]$ a concentração da forma não ionizada.

A EQUAÇÃO 1 relaciona o pH do meio ao redor do fármaco e a constante de dissociação ácida do fármaco (pK_a) com a relação entre as formas ionizadas (A^- ou HA).

1.5.1.1- Absorção, biodisponibilidade e vias de administração dos fármacos³⁴

Entende-se por absorção como a transferência do fármaco do seu local de administração para o compartimento central e a amplitude com que isso ocorre. Para comprimidos ou cápsulas a absorção depende da dissolução do comprimido ou da cápsula, ocorrendo assim à liberação do fármaco. Durante a absorção do fármaco a biodisponibilidade é o fator de maior importância, pois explica a porcentagem na qual uma dose do fármaco chega ao seu local de ação. Durante a administração de um remédio via oral, ocorrerá primeiramente a absorção pelo estômago e intestino, mas este processo pode ser limitado de acordo com as propriedades físico-químicas do fármaco. Em seguida o fármaco passará pelo fígado onde pode ocorrer um metabolismo e excreção biliar antes que chegue a circulação sistêmica. Por este motivo, dependendo da capacidade metabólica ou excretora do fígado, pode ocorrer uma baixa biodisponibilidade do fármaco. Além do metabolismo do fígado, fatores anatômicos, fisiológicos e patológicos podem influenciar na biodisponibilidade, e a escolha da via de administração de um fármaco deve-se basear no conhecimento dessas condições. Dentre as vias de administração encontram-se a administração oral, sublingual, absorção transdérmica, retal, injeção parenteral (intravenosa, subcutânea ou intramuscular), via venosa, absorção pulmonar (através da respiração) e aplicação tópica (mucosa).

1.5.1.2- Distribuição dos fármacos³⁴

Após a absorção pelo organismo, o fármaco é distribuído para os líquidos intersticiais e intracelulares. Fatores fisiológicos e/ou físico-químicos podem interferir nesta etapa. Débito cardíaco, fluxo sanguíneo regional, permeabilidade capilar, e volume tecidual determinam a taxa de liberação e quantidade potencial do fármaco distribuído nos tecidos. Órgãos considerados bem irrigados, rins, fígado e cérebro recebem a maior parte do fármaco, já a parte de vísceras, músculos, pele e tecido adiposo apresentam uma liberação mais lenta.

1.5.1.3- Metabolismo dos fármacos³⁴

A dificuldade em eliminar um fármaco deve-se ao seu caráter lipofílico. Fármacos inalterados quando filtrados pelos glomérulos, são novamente reabsorvidos em grande parte para a circulação sistêmica durante a passagem pelos túbulos renais. O metabolismo dos fármacos em metabólitos mais hidrofílicos é essencial para sua eliminação do organismo, bem com a interrupção das atividades biológicas e farmacológicas. Geralmente esta biotransformação gera metabólitos inativos e com baixa toxicidade, entretanto, podem ocorrer a formação de metabólitos de alta atividade biológica ou toxicidade.

1.5.1.4- Excreção dos fármacos³⁴

Durante o processo de excreção, os fármacos podem ser excretados sem nenhuma alteração ou em forma de metabólitos, com exceção dos pulmões, os órgãos excretadores eliminam com mais eficácia os compostos polares do que as substâncias lipossolúveis. Por esta razão, os compostos lipossolúveis apresentam maior dificuldade para serem excretados, até que sejam transformados em compostos mais polares. O rim é o órgão mais importante para a excreção dos fármacos e seus metabólitos, entretanto, fármacos ingeridos por via oral que não foram absorvidos, metabólitos excretados na bile ou secretados diretamente no trato intestinal e que não foram absorvidos são eliminados nas fezes. Os fármacos também podem ser excretados pelo leite materno, sendo assim, esta forma de

excreção merece muita atenção, visto que, podem ocorrer efeitos indesejáveis no lactante durante o período de amamentação.

O suor, saliva e lágrimas também podem ser considerados vias de excreção de fármacos, mas a quantidade excretada pode ser considerada desprezível. A grande dificuldade em se excretar fármacos inalterados ou metabolizados por essas vias, se deve ao fato da difusão da forma lipossolúvel não ionizada dos fármacos pelas células epiteliais das glândulas e do pH, entretanto, a concentração de fármaco na saliva é praticamente igual à concentração plasmática, desta maneira, a saliva pode ser utilizada para análises clínicas quando há impossibilidade da coleta de sangue do paciente.

1.5.2- Farmacodinâmica³⁴

A farmacodinâmica tem como objetivo estudar os efeitos químicos e fisiológicos dos fármacos e seus mecanismos de ação. O entendimento da ação de um fármaco proporciona a compreensão do uso terapêutico racional e o desenvolvimento de outros agentes terapêuticos mais novos e eficazes. A farmacodinâmica também pode apresentar informações fundamentais acerca da regulação bioquímica e fisiológica.

A ação dos fármacos se deve em grande parte às interações com componentes macromoleculares que promovem alterações bioquímicas e fisiológicas, caracterizando assim o efeito do fármaco. Esses compostos macromoleculares são conhecidos como receptores. O efeito dos fármacos via receptores foi creditado a JOHN LANGLEY (1878) durante o estudo dos efeitos antagônicos da *antropina* na salivação induzida pela *pilocarpina*. Neste estudo foi observado que alguma substância (ou substâncias) das terminações nervosas ou células glandulares formavam compostos com a *antropina* e a *pilocarpina*, desta forma, descreveu essas substâncias como “receptoras”. Em 1909 o termo receptor foi introduzido por Paul Ehrlich, que justificava o efeito do fármaco no organismo devido a uma afinidade adequada entre o fármaco e seu receptor.

Dentre os grupos receptores, as proteínas se apresentam com o maior destaque, como exemplo têm-se os receptores dos hormônios, dos fatores de crescimento e de transcrição e os neurotransmissores, as enzimas das vias metabólicas cruciais ou reguladoras (diidrofolato redutase, acetilcolinesterase e

fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos), proteínas envolvidas no meio de transporte (Na^+ , K^+ - ATPase), glicoproteínas secretadas e as proteínas estruturais (tubulina). Os ácidos nucleicos também são importantes receptores farmacológicos, principalmente para os quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer. As interações dos fármacos com seus respectivos receptores podem ser realizadas via interação de Van der Waals e hidrofóbicas ou ligações iônicas, covalente e de hidrogênio. Quanto maior a energia de interação, maior o tempo do efeito do fármaco.

Existem também fármacos que apresentam efeitos sem a necessidade da interação com as macromoléculas receptoras. Alguns fármacos se ligam às moléculas pequenas ou íons existentes normal ou anormalmente em nosso organismo. Como exemplos existem os fármacos que combatem a acidez estomacal, o sulfonato de 2-mercapto-etano utilizado para a remoção de radicais livres que é eliminado rapidamente pelos rins e tem como objetivo de se ligar a metabólitos reativos associados a quimioterápicos para minimizar os efeitos colaterais nas vias urinárias e o manitol, que promove a diurese, expansão do volume circulante do compartimento vascular ou redução de edema cerebral.

1.6- Objetivos

Neste trabalho teve-se como objetivo o desenvolvimento e a caracterização eletroquímica de um eletrodo de carbono vítreo modificado nanotubos de carbono de paredes múltiplas em filme de hidrocloreto de poli(alilamina) para a determinação de analitos em produtos farmacêuticos empregando-se voltametria cíclica, amperometria e voltametria de pulso diferencial.

CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Instrumentação básica

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica da Mettler, modelo H10, com precisão de $\pm 0,0001$ mg.

Foi utilizado um banho de ultrassom da marca Unique, modelo UltraCleaner 1400 A, para a limpeza do GCE e para a formação da dispersão MWCNTs/PAH.

O controle de pH das soluções foi realizado empregando-se um pHmetro da Orion, modelo EA 940, sendo o eletrodo de vidro combinado da Analion, modelo V620, com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada de um deionizador da Millipore, modelo Milli-Q Gradient.

Para a análise da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH foi medido o potencial zeta (ζ), em um equipamento Zeta Nano Series da Malvern Instruments acoplado a um titulador MPT-2 Multipurpose Titrator e gerenciado pelo software Dispersion Technology Software 5.02.

Para a funcionalização dos MWCNTs foi utilizado um centrífuga da marca FANEM, modelo Excelsa Baby 206-R.

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de 45 mL contendo um eletrodo de trabalho (GCE, GCE-PAH ou GCE-MWCNTs/PAH), um eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) e um eletrodo auxiliar de platina, conectados em um potenciostato portátil PalmSens da Palm Instruments BV gerenciado pelo software Palm Sens PC.

As imagens dos filmes foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura de alta eficiência (MEV-FEG) da Philips, modelo XL-30, do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar (DEMA-UFSCar)

2.2- Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (PA) e todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

As soluções de tampão fosfato, utilizadas como eletrólito suporte, foram preparadas adicionando-se soluções de fosfato de sódio (J. T. Baker) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e fosfato dissódico (J. T. Baker) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nas devidas proporções de acordo com o pH desejado.

Soluções de KCl (Dinâmica) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 3,730 g de KCl em 500 mL de água deionizada.

Soluções de NaCl (J. T. Baker) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 2,922 g em 500 mL de água deionizada.

Soluções de NaNO_3 (Dinâmica) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 4,2495 g em 500 mL de água deionizada.

Soluções de KNO_3 (Dinâmica) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 5,0550 g de KNO_3 em 500 mL de água deionizada.

Soluções de H_2SO_4 (Merk) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas diluindo-se 2,0 mL de H_2SO_4 concentrado em 250 mL de água deionizada.

Soluções de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (Synth) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diluindo-se 1,5 mL de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ concentrado em 250 mL de água deionizada.

Uma solução contendo $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$ (HNO_3 , Nuclear) foi preparada em uma razão de 3:1 v/v

Soluções de PAH (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se 0,0160 g de PAH em 10,0 mL de água deionizada. Esta solução foi mantida em agitação por 16 horas para então ser utilizada.

Soluções de hexacianoferrato de potássio (HCF) (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se 0,0329 g de HCF em 10,0 mL de água deionizada.

Soluções estoque de ciprofibrato (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se 0,029 g de ciprofibrato em 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Soluções estoque de dopamina (DA) (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se 0,0019 g de DA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em urina artificial (pH 6). A urina artificial foi preparada conforme a literatura⁸⁸ e a TABELA 2.1 apresenta a composição da mesma.

Tabela 2.1- Composição da urina artificial⁸⁸

SUBSTÂNCIA	g L⁻¹
CaCl 2H ₂ O	1,10
NaCl	1,93
Na ₂ SO ₄	2,25
KH ₂ PO ₄	1,49
KCl	1,60
NH ₄ Cl	1,00
Uréia	25,0
Creatinina	1,10

Soluções estoque de L-dopa (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram preparadas diariamente dissolvendo-se 0,0019 g de L-dopa em 10 mL de NaCl 0,1 mol L⁻¹.

Soluções estoque de carbidopa (Sigma-Aldrich) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram preparadas diariamente dissolvendo-se 0,0023 g de carbidopa em 10 mL de NaCl 0,1 mol L⁻¹.

2.3- Dispersões de MWCNTs/PAH

Os MWCNTs foram obtidos da Sigma-Aldrich e apresentam as seguintes características:

- ✓ Diâmetro: 20 – 30 nm
- ✓ Espessura da parede: 1 – 2 nm
- ✓ Comprimento: 0,5 – 2 µm

Foram preparadas duas suspensões de MWCNTs para o estudo da estabilidade. Dispersou-se 1,0 mg de MWCNTs funcionalizado em 30,0 mL de solução de PAH $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e em 30,0 mL de água deionizada, chamadas respectivamente de MWCNTs/PAH e MWCNTs/H₂O. Ambas as dispersões foram mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos.

Para a formação de filmes dispersou-se 1,0 mg de MWCNTs funcionalizados em 1,0 mL de uma solução de PAH $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e manteve-se esta dispersão em banho de ultrassom por 30 minutos.

2.4- Preparo das amostras analisadas

As amostras farmacêuticas de ciprofibrato (100 mg por comprimido) foram preparadas com a trituração de 10 comprimidos até a obtenção de um pó fino e massas de interesse foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume foi completado com uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Eventuais excipientes insolúveis contido nas amostras foram removidos por filtração empregando-se papel de filtro.

Amostras comerciais de DA 5 mg mL⁻¹ foram preparadas com a diluição de 385 µL do medicamento em balões volumétricos de 10 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e em urina artificial.

Para a análise de L-dopa foram obtidas amostras da formulação farmacêutica contendo L-dopa/cloridrato de benzerazida (100/25 mg) foram preparadas com a abertura de 10 drágeas e massas de interesse foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL com o volume completado com uma solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Eventuais excipientes insolúveis contido nas amostras foram removidos por filtração empregando-se papel de filtro.

Para a análise de carbidopa foram obtidas amostras da formulação farmacêutica L-dopa/Carbidopa (100/27 mg) foram preparadas com a abertura de 10 drágeas e massas de interesse foram pesadas em balança analítica e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume foi completado com uma solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Eventuais excipientes insolúveis contido nas amostras foram removidos por filtração empregando-se papel de filtro.

2.5- Metodologia

2.5.1- Funcionalização dos MWCNTs

A funcionalização dos MWCNTs foi realizada segundo a literatura⁸⁵⁻⁸⁷. Uma massa de 100 mg de MWCNTs foi adicionada em uma solução de HNO₃:H₂SO₄ (3:1 v/v) mantendo-se sob agitação por 18 horas. Em seguida separou-se a mistura de MWCNTs da solução ácida por centrifugação a 6.000 rpm. Após a centrifugação, a solução ácida foi retirada com o auxílio de uma bomba peristáltica e lavaram-se os nanotubos por várias vezes com água deionizada. Em seguida, os MWCNTs foram secos em estufa a 120 °C durante 12h.

2.5.2- Estudo da estabilidade da dispersão de MWCNTs/PAH

Após o preparo da dispersão MWCNTs/PAH e MWCNTs/H₂O, alíquotas das duas dispersões foram submetidas a medidas de potencial ζ com a variação do pH.

2.5.3- Modificação da superfície do GCE com filmes de PAH e MWCNTs/PAH

Para a formação do filme de PAH foi depositado sobre a superfície do GCE uma alíquota de 20 μ L de uma solução de PAH $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para a formação do filme de MWCNTs/PAH foi depositado sobre a superfície do GCE uma alíquota de 20 μ L da dispersão de MWCNTs/PAH $1,0$ mg mL⁻¹

2.5.4- Caracterização eletroquímica dos filmes de PAH e MWCNTs/PAH

As caracterizações eletroquímicas dos filmes MWCNTs/PAH e PAH foram realizadas com medidas de voltametria cíclica com variação da velocidade de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mV s⁻¹) em um intervalo de -300

a 400 mV em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

2.5.5- Voltametria de pulso diferencial

A técnica de voltametria de pulso diferencial foi utilizada no procedimento eletroanalítico proposto para a determinação de ciprofibrato, L-dopa e carbidopa em formulações farmacêuticas.

Após o estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial, as curvas analíticas foram obtidas com adição de alíquotas das soluções padrões na célula eletroquímica. Após cada adição, os voltamogramas foram obtidos e as amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão.

2.5.6- Voltametria cíclica e amperometria

Inicialmente utilizou-se a voltametria cíclica para o estudo do perfil voltamétrico do eletrodo GCE-MWCNTs/PAH para o analito DA em KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5. A técnica de amperometria foi utilizada no procedimento eletroanalítico proposto para a determinação da DA em formulações farmacêuticas nos potenciais selecionados nos estudos ciclovolamétricos.

A curva analítica foi obtida pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica. As amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão.

2.5.7- Métodos de referência para determinação de teores de ciprofibrato, dopamina, L-dopa e carbidopa em amostras farmacêuticas

O procedimento de referência utilizado para a determinação de teores de ciprofibrato em amostras farmacêuticas foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) e todas as condições utilizadas foram de acordo com a encontrada na literatura³⁵. Foi utilizado um cromatógrafo da Shimadzu modelo SPD-M10AVP com uma coluna C18

(4,6 mm x 150 mm, 5 μ m) com detector espectrofotométrico. O comprimento de onda utilizado foi de 232 nm. A velocidade do fluxo foi de 1,5 mL/min. Como fase móvel foi utilizada uma solução de acetonitrila/ácido fosfórico (55/45).

O procedimento de referência utilizado para a determinação de teores de DA em amostras farmacêuticas foi o definido pela Farmacopéia Brasileira⁸⁹, que consiste em realizar medidas de absorvância de DA diretamente em 280 nm.

Como método de referência para a determinação de teores de L-dopa em amostras farmacêuticas foi utilizada a titulação potenciométrica conforme descrito na farmacopéia brasileira⁸⁹

O método de referência utilizado para a determinação de teores de carbidopa em formulações farmacêuticas foi o proposto pela farmacopéia européia⁹⁰ que preconiza o acompanhamento do espectro de UV-VIS 230 a 350 nm.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Estudos da estabilidade da dispersão do filme de MWCNTs/PAH e caracterização eletroquímica

3.1.1- Estudo da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH

Há alguns anos, o nosso grupo de pesquisa, LABBES, vem utilizando procedimentos encontrados na literatura⁸⁵⁻⁸⁷ para a funcionalização dos MWCNTs. Medidas de espectrofotométricas no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy) que comprovam a funcionalização dos nanotubos de carbono e que corroboram com a literatura⁸⁵⁻⁸⁷ foram realizadas, e os resultados publicados na literatura⁹¹.

Para o estudo da estabilidade da dispersão MWCNTs/PAH e MWCNTs/H₂O, foram realizadas medidas dos potenciais zeta (potencial ζ) gerados pelas respectivas dispersões. De acordo com a literatura, a estabilidade das dispersões podem ser afetadas com o pH e a força iônica, e quanto maior o valor do potencial ζ , maior é a estabilidade da dispersão⁹². Sendo esta dispersão estabilizada por atrações eletrostáticas, o estudo realizado apresenta a variação do potencial ζ em função da variação do pH. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 3.1.

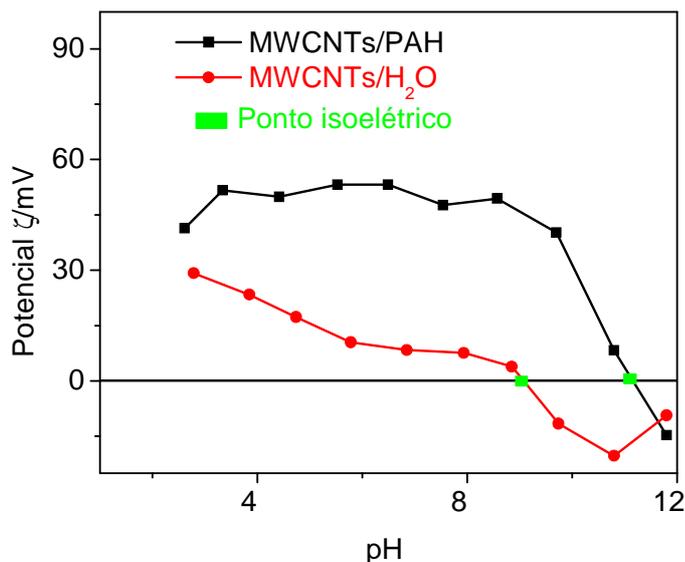
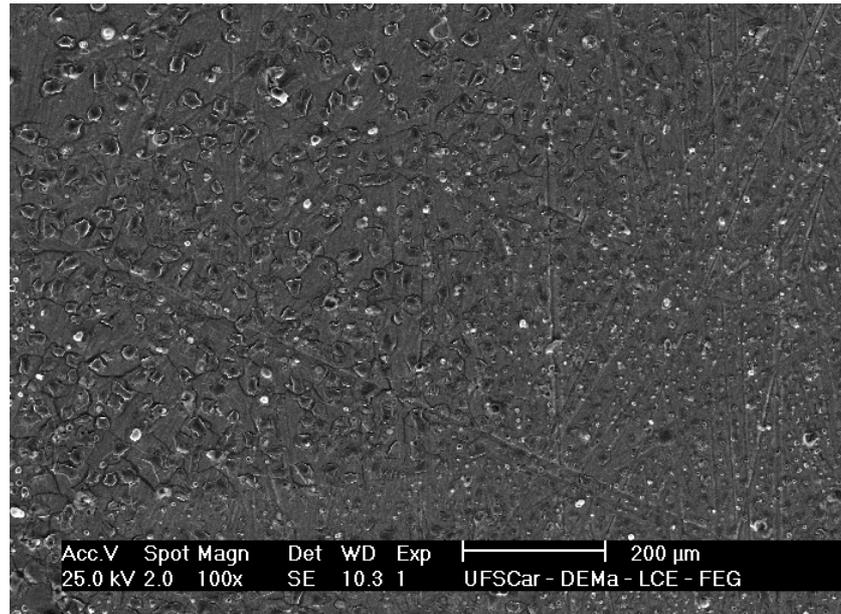


Figura 3.1- Resultados obtidos no estudo da estabilidade da dispersão do MWCNTs/PAH por medidas de potencial ζ em função da variação do pH.

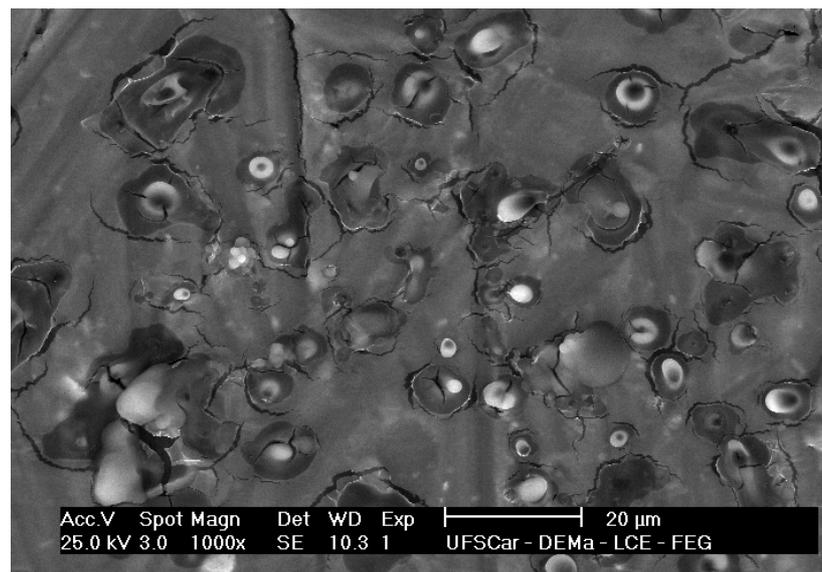
Como pode ser observado nesta figura, a dispersão MWCNTs/PAH apresentou os maiores valores de potencial ζ que variaram entre 40,2 e 50,2 mV, no intervalo de pH de 2,7 a 8,6. Em valores de pH superiores, há uma diminuição do potencial ζ da dispersão. Assim, o potencial ζ se manteve praticamente constante no intervalo de pH supramencionado, sendo que este comportamento é atribuído ao valor de pKa desse polímero que é igual a 8,5⁹². Sendo assim, para valores de pH menores que 8,5, o PAH apresenta um caráter catiônico (polímero catiônico) devido a protonação dos amino grupos, responsáveis pela atração eletrostática entre estes grupos e grupos carboxílicos presentes nos nanotubos de carbono funcionalizados. Por outro lado, para valores de pH maiores que 8,5, as moléculas de PAH começam a apresentar um caráter aniônico (grupos carboxilatos), e desta maneira as forças de repulsão aumentam gradativamente entre as moléculas de PAH e os grupos $-\text{COO}^-$ presentes nos MWCNTs, promovendo assim a instabilidade da dispersão. Para a dispersão dos nanotubos de carbono em água (MWCNTs/H₂O) pode ser observado valores menores de potencial ζ em relação à dispersão MWCNTs/PAH, o que comprova a influência da atração eletrostática para a estabilização da dispersão. Em um trabalho realizado por IAMSAMAI *et al.*⁹³ estudou-se a estabilidade de uma dispersão de MWCNTs em quitosana e foi observado que a estabilidade desta dispersão ocorre em altos valores de potencial ζ (entre 34 a 42 mV) devido à forte de

atração eletrostática entre os grupos aminos protonados da quitosana e os grupos aniônicos (carboxilato, hidroxila) dos MWCNTs. Desta maneira, os resultados obtidos neste experimento corroboram com aqueles apresentados na literatura.

Após o estudo da estabilidade, foi realizada a caracterização do filme de MWCNTs/PAH com a técnica de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG). A FIGURA 3.2 apresenta as imagens obtidas.

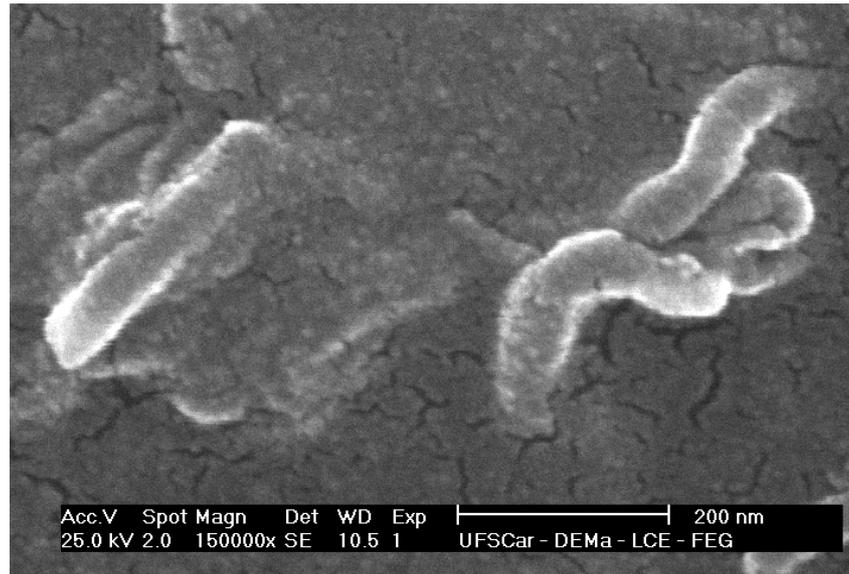


(a)



(b)

Figura 3.2- Imagens da superfície metálica utilizada para a formação do filme MWCNTs/PAH sem filme e com filme de PAH respectivamente. **(a)** 20 µ e **(b)**.200



(c)



(d)

Figura 3.2- imagens do filme de MWCNTs/PAH **(c)** 200 nm e **(d)**.200 nm. Os filmes de MWCNTs/PAH foram formados sobre um suporte metálico apropriado para a obtenção das imagens.

De acordo com as imagens obtidas, **FIGURA 3.2 b**, observa-se que o PAH apresenta uma nanoestrutura polimérica uniforme com alguns buracos e na **FIGURA c** e **d** pode-se observar a distribuição e a imobilização dos MWCNTs no filme de PAH.

3.1.2- Caracterização eletroquímica do filme de MWCNTs/PAH – cálculo da área ativa

Este estudo foi realizado a fim de se calcular a área ativa do eletrodo de carbono vítreo (GCE) sem modificação e modificados com filmes de PAH e MWCNTs/PAH empregando-se a equação de Randles-Sevcik^{85,86,94,95}. Desta maneira, foram realizadas medidas de voltametria cíclica em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a variação da velocidade de varredura de potencial. A EQUAÇÃO 2 apresenta a equação de Randles-Sevcik utilizada.

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

Sendo I_p a corrente de pico (A), A a área eletroativa (cm^2), D o coeficiente de difusão do ânion hexacianoferrato(III) de potássio ($[Fe(CN)_6]^{3-}$) em solução ($6,20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), n o número de elétrons envolvidos na reação redox, ν é a velocidade de varredura de potencial (V s^{-1}) e C a concentração de hexacianoferrato(III) de potássio $[Fe(CN)_6]^{3-}$ em solução (mol cm^{-3}). Substituindo-se estes valores na EQUAÇÃO 2, foi possível determinar as áreas ativas do eletrodo GCE, GCE-PAH e do GCE-MWCNTs/PAH.

A FIGURA 3.3 apresenta os resultados obtidos para o GCE. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e as velocidade de varredura de potencial empregadas foram de 10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mV s^{-1} .

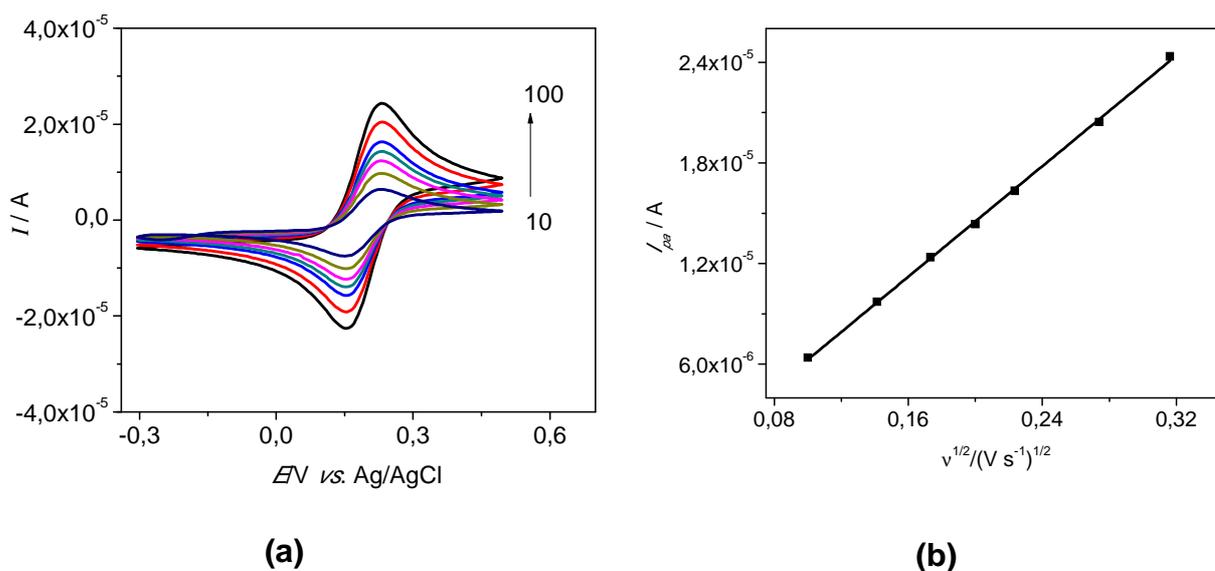


Figura 3.3 (a) Voltamogramas obtidos no estudo da velocidade de varredura de potencial utilizando um GCE para uma solução de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de potencial de 10 a 100 mV s^{-1} **(b)** Relação da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial em função do pico de corrente anódica para o cálculo da área ativa.

Para este sistema é observado uma dependência linear entre os valores de de corrente anódica (I_{pa}) em função da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) obtendo-se um $R = 0,999$ e a seguinte equação de reta:

$$I_{pa} = -1,95 \times 10^{-6} + 8,23 \times 10^{-5} \times v^{1/2} \quad \text{Equação 3}$$

Com estes resultados obtidos e a utilização da EQUAÇÃO 2 foi possível realizar o cálculo da área ativa para o GCE, obtendo-se um valor de $0,184 \text{ cm}^2$.

Em seguida, foram realizadas medidas de voltametria cíclica utilizando um eletrodo GCE-PAH para verificar propriedades eletrocatalíticas do polieletrólito PAH e o cálculo da área ativa do eletrodo modificado. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e as velocidade de varredura de potencial utilizadas foram de 10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mV s^{-1} . A Figura 3.4 apresenta os resultados obtidos

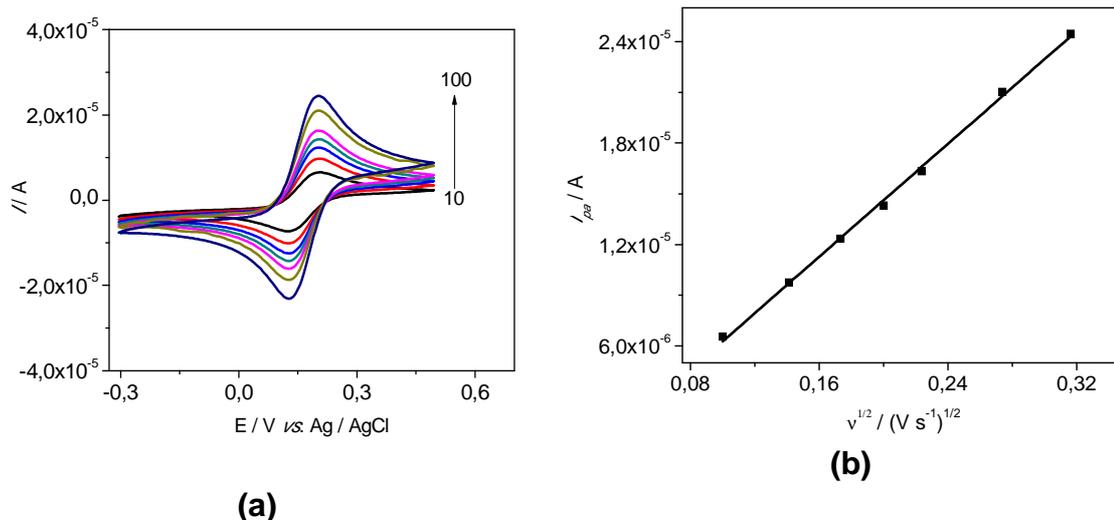


Figura 3.4- Voltamogramas obtidos no estudo da velocidade de varredura de potencial utilizando um GCE-PAH para uma solução de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de potencial de 10 a 100 mV s^{-1} **(b)** Relação da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial em função do pico de corrente anódica para o cálculo da área ativa.

Para este sistema, pode ser observado uma dependência linear entre os valores de pico de corrente anódica (I_{pa}) em função da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) obtendo-se um $R = 0,998$ e a seguinte equação

$$I_{pa} = -2,08 \times 10^{-6} + 8,35 \times 10^{-5} \times v^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

Substituindo-se os resultados obtidos na EQUAÇÃO 2 foi obtido o valor da área ativa para o GCE-PAH, obtendo-se um valor de $0,187 \text{ cm}^2$. Com este resultado também é observado que o filme de PAH não apresenta eletroatividade, visto que, os picos encontrados são característicos do indicador redox hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) devido os valores de pico de corrente anódica e catódica serem praticamente iguais aos obtidos no estudo em que foi utilizado o GCE sem modificação. Por exemplo, as correntes anódicas obtidas na velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} empregando-se os eletrodos de GCE e GCE-PAH foram iguais ($2,4 \times 10^{-5} \text{ A}$), indicando que o filme de PAH não teve nenhuma influência na

difusão do hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) até a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Na FIGURA 3.5 são apresentados os voltamogramas obtidos no estudo da velocidade de varredura de potencial sobre o perfil dos voltamogramas empregando-se o eletrodo de GCE-MWCNTs/PAH. Neste estudo, empregou-se solução de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sendo que a corrente catódica em função do quadrado das velocidades de varredura de potencial ($v^{1/2}$) foi linear no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} , indicando que a espécie eletroativa chega por difusão na superfície do eletrodo.

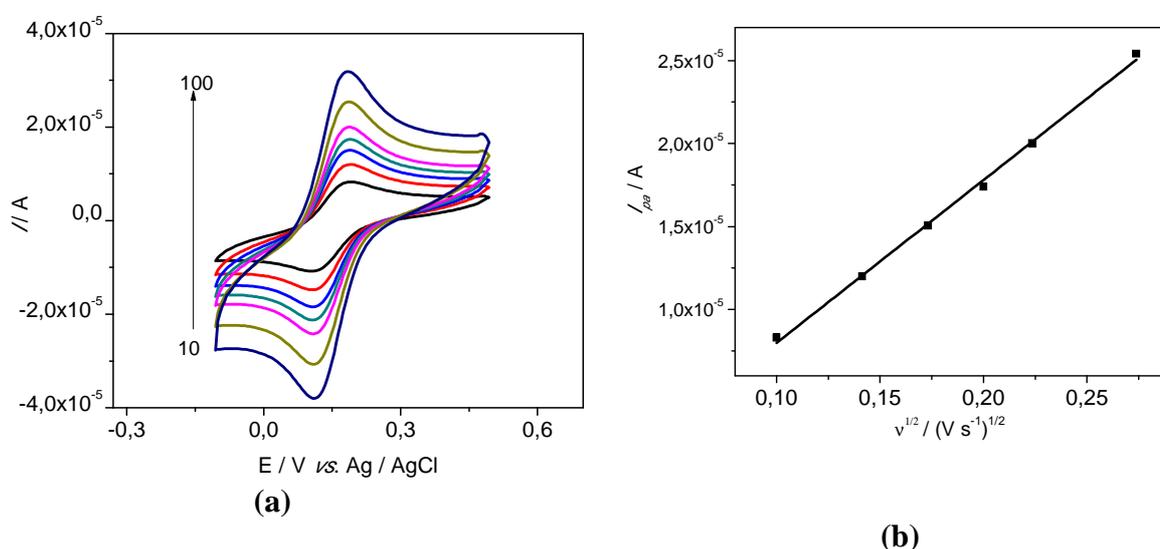


Figura 3.5- (a) Voltamogramas obtidos no estudo da velocidade de varredura de potencial utilizando um GCE-MWCNTs/PAH para uma solução de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de potencial de 10 a 100 mV s^{-1} (b) Relação da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial em função do pico de corrente anódica para o cálculo da área ativa.

Para este sistema, pode ser observado uma dependência linear entre os valores de pico de corrente anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) obtendo-se um $R = 0,997$ e a seguinte equação:

$$I_{pa} = -1,84 \times 10^{-6} + 9,82 \times 10^{-5} \times v^{1/2} \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

Com estes resultados obtidos e a utilização da equação de Randles-Sevcik (EQUAÇÃO 2), foi possível realizar o cálculo da área ativa para o GCE-MWCNTs/PAH, obtendo-se um valor de 0,221 cm².

A TABELA 3.1 apresenta todos os valores de áreas ativas obtidas.

Tabela 3.1- Valores de áreas ativas encontradas para os eletrodos de GCE, GCE-PAH e GCE-MWCNTs/PAH

Indicador redox	GCE (cm ²)	GCE-PAH (cm ²)	GCE-MWCNTs/PAH (cm ²)
hexacianoferrato(III) de potássio (K ₃ [FeCN] ₆)	0,184	0,187	0,221
Área geométrica = 0,196 cm ²			

Com um único eletrodo foi possível realizar aproximadamente 100 determinações de hexacianoferrato(III) de potássio (K₃[FeCN]₆) 6,6 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Analisando-se os valores das áreas ativas encontradas nesse trabalho (Tabela 3.1) para os eletrodos de GCE e o GCE-PAH, verifica-se que praticamente não houve variação da área ativa do eletrodo de GCE quando sobre o mesmo foi depositado o filme de PAH, indicando, como discutido, que o filme de PAH não afeta os processos redox do hexacianoferrato(III) de potássio (K₃[FeCN]₆). Por outro lado, com a adição dos nanotubos de carbono no filme polimérico (GCE-MWCNTs/PAH), pode ser observado um aumento de 1,2 vezes da área ativa desse eletrodo, confirmando a eletroatividade dos nanotubos de carbono.

Com os resultados obtidos dos gráficos da relação da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial em função do pico de corrente anódica, observa-se que há um aumento linear da corrente com o aumento da velocidade de varredura de potencial, o que sugere um transporte de massa por um processo de difusão. Já com os voltamogramas cíclicos obtidos com o GCE-MWCNTs/PAH em presença de hexacianoferrato(III) de potássio (K₃[FeCN]₆) observa-se que os picos de oxidações e reduções estão entre o intervalo de potencial de 150 e 300 mV. Em um trabalho realizado por SCHRÖPER *et al.*⁹⁶ que realizaram medidas de voltametria cíclica utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com

poliaminofenol e MWCNT foi também observado um par redox no intervalo de potencial de 150 e 300 mV.

Comparando-se os valores de ΔE obtidos empregando-se o eletrodo GCE/PAH ($\Delta E = 80$ mV) e GCE-MWCNTs/PAH ($\Delta E = 67$ mV) para solução de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), pode-se verificar que o emprego do CNTs no filme aumentou a transferência de elétrons entre o analito e o eletrodo base. Analisando-se os ciclos voltamogramas obtidos neste estudo, não foi observada nenhuma variação dos potenciais de picos de oxidação e redução em função do aumento da velocidade de varredura de potencial, indicando assim que o processo redox é reversível^{97, 98}. Ademais, observa-se um aumento de correntes de pico de oxidação e redução quando se empregou o eletrodo contendo CNTs (GCE/PAH-MWCNTs). A FIGURA 3.6 apresenta os voltamogramas obtidos para o GCE, GCE e GCE-MWCNTs/PAH em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) e velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} .

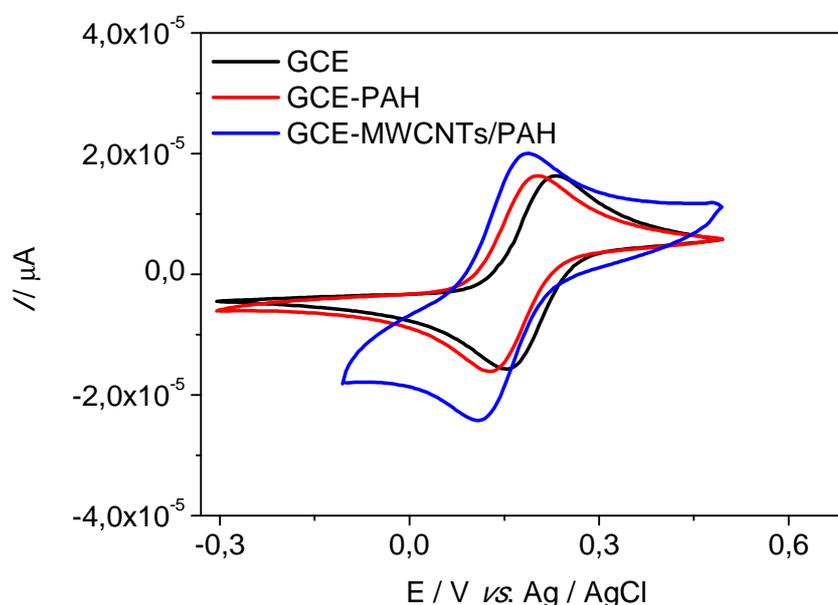


Figura 3.6- Comparação dos voltamogramas cíclicos para um GCE, GCE-PAH e GCE-MWCNTs/PAH obtidos no estudo de velocidade de varredura de potencial em presença de hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[FeCN]_6$) $6,6 \times 10^{-4}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado, o voltamograma cíclico obtido com o GCE-MWCNTs/PAH apresenta corrente catódica e anódica e uma corrente capacitiva maior que aquela observada empregando-se o GCE e o GCE-PAH. De acordo com a literatura, este efeito ocorre em eletrodos modificados com CNT, promovendo assim o aumento do sinal analítico (maior corrente)^{10, 11}. Já o GCE e o GCE-PAH apresentam voltamogramas semelhantes, comprovando assim que o filme de PAH não apresenta processos redox que possa provocar interferências durante as medidas.

3.2- Determinação de ciprofibrato

3.2.1- Eletroatividade do ciprofibrato

Inicialmente foram realizadas medidas de voltametria de pulso diferencial (DPV) a fim de se verificar a eletroatividade do ciprofibrato utilizando o GCE-MWCNTs/PAH, e para comparação foi realizado uma medida de DPV utilizando um GCE sem modificação. As medidas de DPV foram realizadas com uma velocidade de varredura de potencial (v) de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso (A) de 40 mV e o tempo de pulso (t) aplicado de $0,100 \text{ s}$. A concentração de ciprofibrato utilizada foi de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e como eletrólito suporte foi utilizado uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A FIGURA 3.7 apresenta os resultados obtidos.

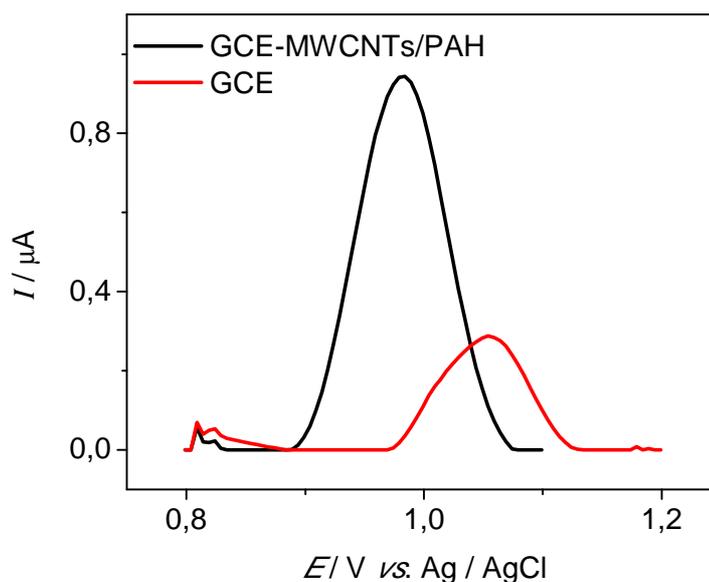


Figura 3.7- Estudo da eletroatividade do ciprofibrato $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com medidas de DPV utilizando um GCE-MWCNTs/PAH e um GCE em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

De acordo com os resultados obtidos, as medidas de DPV utilizando o GCE-MWCNTs/PAH em presença do ciprofibrato apresenta uma magnitude de corrente maior em um potencial menor aqueles obtidos com o eletrodo GCE típicos de processos eletrocatalíticos. A TABELA 3.2 apresenta as correntes de picos anódicos

e os potenciais obtidos respectivamente empregando-se os eletrodos de GCE-MWCNTs/PAH e o GCE.

Tabela 3.2- Picos de corrente anódica e potenciais de pico obtidos em medidas de DPV para o sistema GCE-MWCNTs/PAH e GCE em ciprofibrato $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Sistema	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$E / \text{V vs. Ag / AgCl}$
GCE-MWCNTs/PAH	0,94	0,97
GCE	0,28	1,1

3.2.2- Estudo do efeito do pH

Inicialmente foi estudado a influência do pH do eletrólito suporte sobre a resposta analítica empregando-se a técnica de DPV. Neste estudo foi utilizado como eletrólito suporte uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pHs 6,1; 6,4; 7,0 e 7,4. Para as medidas de DPV utilizou-se uma velocidade de varredura de potencial de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 40 mV e tempo de pulso de $0,100 \text{ s}$ e a concentração de ciprofibrato utilizada foi de $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A FIGURA 3.8 apresenta os resultados.

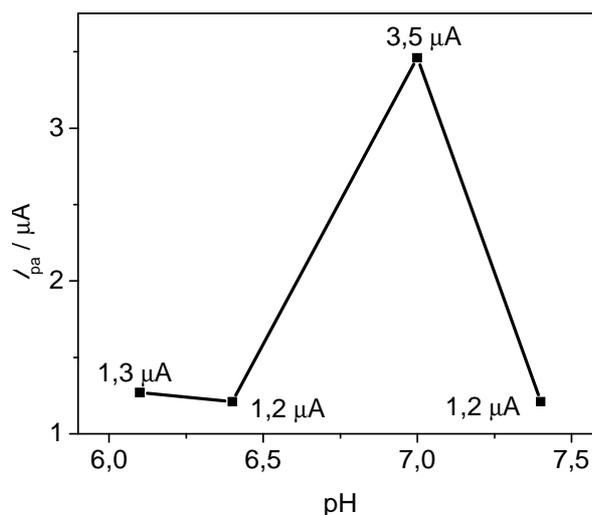


Figura 3.8- Estudo do comportamento da corrente anódica para a determinação de ciprofibrato $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em função da variação do pH do eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,1; 6,4; 7,0 e 7,4).

Como pode ser observado, o comportamento do pico de corrente anódica em função da variação do pH apresenta um maior valor de corrente (3,5 μA) em pH 7,0. A grande vantagem de se trabalhar em uma solução neutra é possibilidade de se utilizar este sensor para determinação de ciprofibrato em meios biológicos (pH em torno de 7,4), além da determinação em amostras farmacêuticas. Desta maneira, a solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) se apresenta como a mais adequada para a continuidade do trabalho.

3.2.3- Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Para a otimização das medidas de DPV na determinação de ciprofibrato foram avaliados os valores mais adequados para a velocidade de varredura de potencial, para a amplitude de pulso e para o tempo de pulso. A FIGURA 3.9 apresenta os resultados obtidos para o estudo de velocidade de varredura de potencial em um intervalo de 5 a 22 mV s⁻¹. Para todos os estudos foi utilizada uma solução de ciprofibrato, 2,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e uma janela de potencial de 0,8 a 1,1 V. A amplitude de pulso utilizado foi de 40 mV e o tempo de pulso 0,100 s.

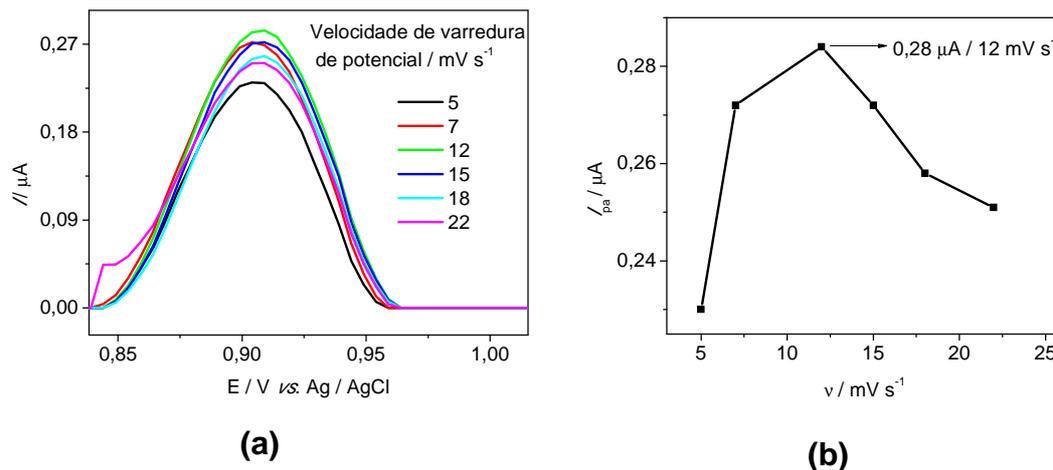


Figura 3.9- (a) Influência da variação da velocidade de varredura de potencial nos voltamogramas de pulso diferencial do ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), **(b)** Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação da velocidade de varredura de potencial. $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Como é observado, há um incremento do pico de corrente anódica (I_{pa}) em função da variação da velocidade de varredura de potencial no intervalo de 5 a 12 mV s^{-1} sendo observado um maior valor de I_{pa} ($0,28 \mu\text{A}$) na velocidade de varredura de potencial de 12 mV s^{-1} . Após a velocidade de varredura de potencial de 12 mV s^{-1} observa-se um decréscimo nos valores de I_{pa} com o aumento da velocidade de varredura de potencial. Uma possível explicação para este fato se deve a baixa velocidade de reação de oxidação do ciprofibrato. Desta maneira, a velocidade de varredura de potencial escolhida para a determinação de ciprofibrato foi de 12 mV s^{-1} .

Em seguida foi realizado o estudo da amplitude de pulso aplicado. Neste experimento a velocidade de varredura de potencial e o tempo foram fixados em 12 mV s^{-1} e $0,100 \text{ s}$, respectivamente. Os valores de pulsos estudados foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 mV. As medidas foram realizadas em presença de ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A FIGURA 3.10 apresenta os resultados obtidos.

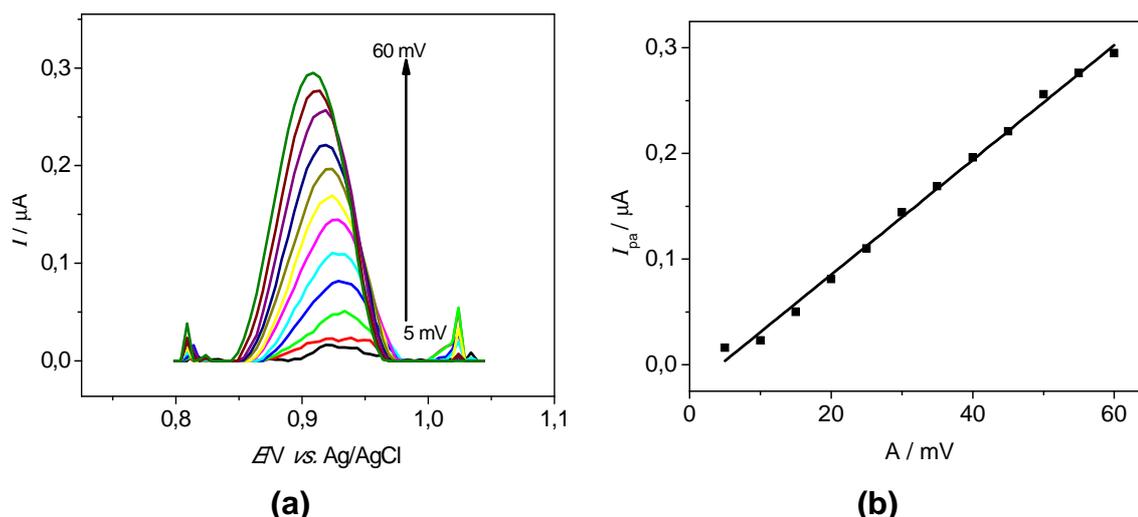


Figura 3.10- (a) Influência da variação da amplitude de pulso nos voltamogramas de pulso diferencial do ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), (b) Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação da A. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Neste caso, pode-se observar que o aumento da amplitude do pulso proporciona um aumento linear da I_{pa} e um deslocamento dos voltamogramas para potenciais menos positivos. O maior valor de I_{pa} ($0,30 \mu\text{A}$) é observado para a amplitude de pulso de 60 mV. Sendo assim, este foi o potencial selecionado para as medidas em ciprofibrato.

Em seguida, foi estudado o tempo de pulso a ser aplicado. Os tempos utilizados foram de 0,080; 0,090; 0,100; 0,150 e 0,170 s. As medidas foram realizadas em presença de ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) com velocidade de varredura de potencial e amplitude de pulso de 12 mV s^{-1} e 60 mV, respectivamente. A FIGURA 3.11 apresenta os resultados obtidos.

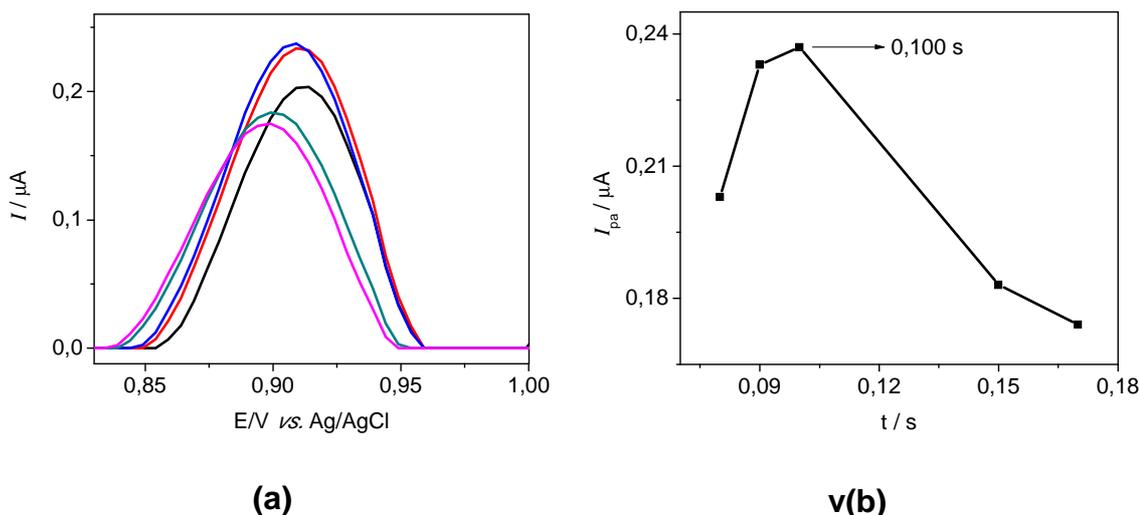


Figura 3.11- (a) Influência do tempo de pulso aplicado nos voltamogramas de pulso diferencial do ciprofibrato $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), (b) Comportamento dos picos de corrente anódica em função da variação do tempo. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 60 \text{ mV}$.

Como é observado, há um aumento da I_{pa} em um intervalo de 0,080 a 0,100 s, sendo o maior valor de I_{pa} ($0,24 \mu\text{A}$) em um tempo igual a 0,100 s. Após o tempo de 0,100 s observa-se um decréscimo da I_{pa} e uma possível explicação para este comportamento se deve a velocidade de varredura de potencial de reação do ciprofibrato, ou seja, para tempos maiores não é possível uma oxidação completa do ciprofibrato, proporcionando assim uma menor transferência de carga. Sendo assim, o tempo de pulso escolhido foi de 0,100 s. Desta maneira a TABELA 3.3 apresenta os valores dos parâmetros da DPV para a determinação de ciprofibrato.

Tabela 3.3- Parâmetros, intervalos estudados e valores escolhidos para medidas de DPV na determinação de ciprofibrato

Parâmetros	Intervalos estudados	Valores escolhidos
Velocidade de varredura de potencia / mV s^{-1}	5 - 22	12
Amplitude de pulso / mV	5 - 60	60
Tempo de pulso / s	0,080 – 0,170	0,100

3.2.4- Estudo de interferentes em potencial

O estudo do efeito dos interferentes em potencial na determinação de ciprofibrato em formulações farmacêuticas foi avaliado para os excipientes presentes em amostras comerciais de ciprofibrato, como o lauril sulfato de sódio (LSS), a lactose e o amido. As medidas de DPV contendo somente ciprofibrato a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram comparadas com as medidas de DPV contendo ciprofibrato + interferentes. A concentração de todos os interferentes foi de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, tendo-se assim uma razão de concentração ciprofibrato:interferente de 1:10. Todas as medidas foram realizadas em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A FIGURA 3.12 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtido.

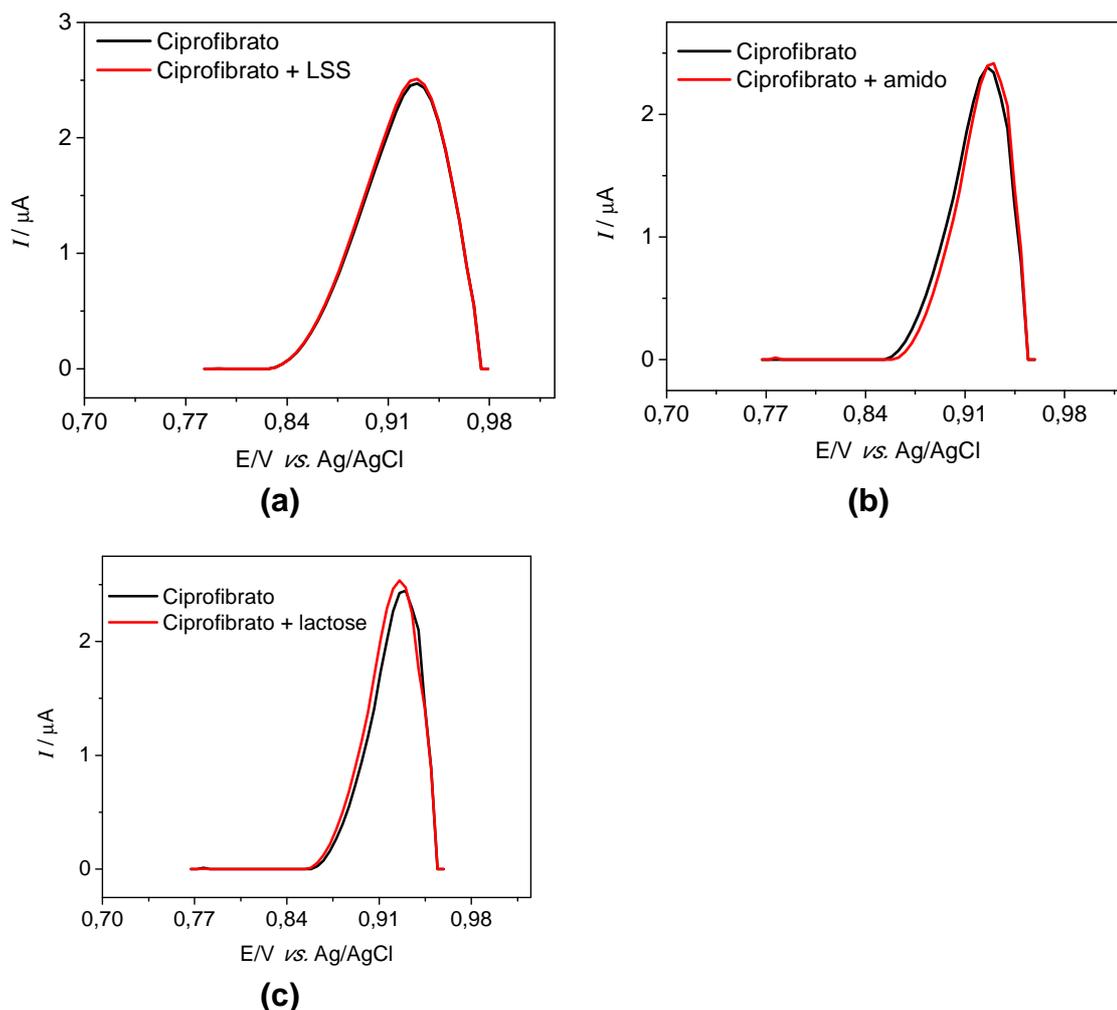


Figura 3.12- Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo de interferentes em potencial na determinação de ciprofibrato em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); **(a)** Ciprofibrato:LSS, **(b)** Ciprofibrato:Amido e **(c)** Ciprofibrato:Lactose. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$. $[\text{Ciprofibrato}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{interferentes}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Com os voltamogramas obtidos foi possível calcular a porcentagem de interferência destes concomitantes à solução de ciprofibrato nas razões de concentrações estipuladas. Para o LSS foi obtido uma interferência positiva de 1,1%. Com o amido uma interferência positiva de 1,3% e com a lactose uma interferência positiva de 3,6%. Como é observado, todas as porcentagens de interferências são pequenas e pode-se desconsiderar o efeito de cada excipiente. Vale ressaltar que os teores de todos os excipientes estudados estão acima dos valores utilizados em formulações farmacêuticas presentes no mercado. Desta maneira, o método

voltamétrico em estudo pode ser aplicado para a quantificação de ciprofibrato sem a interferência desses concomitantes.

3.2.5- Curva analítica e aplicação

Após a avaliação das melhores condições de trabalho e dos parâmetros para o GCE-MWCNTs/PAH, foram realizadas medidas de DPV em um intervalo de 0,8 a 1,0 V (vs. Ag/AgCl) em diferentes concentrações de ciprofibrato, afim de se obter uma curva analítica. A FIGURA 3.13 apresenta os resultados obtidos. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 12 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 60 mV e o tempo de pulso de 0,100 s.

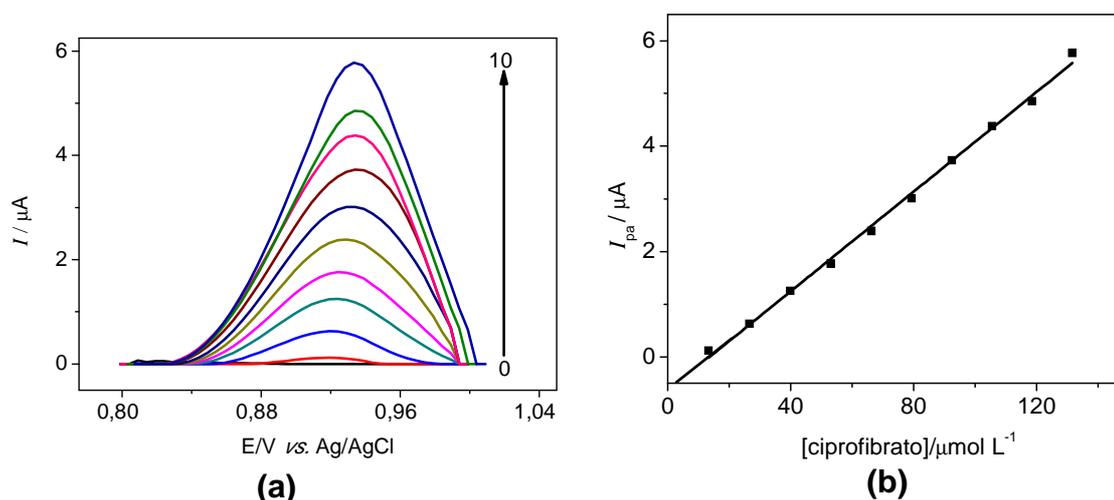


Figura 3.13 a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de ciprofibrato em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0): (0) 0, (1) $1,3 \times 10^{-5}$, (2) $2,6 \times 10^{-5}$, (3) $4,0 \times 10^{-5}$, (4) $5,3 \times 10^{-5}$, (5) $6,6 \times 10^{-5}$, (6) $7,9 \times 10^{-5}$, (7) $9,2 \times 10^{-5}$, (8) $1,0 \times 10^{-4}$, (9) $1,1 \times 10^{-4}$ e (10) $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; **(b)** Curva analítica para o ciprofibrato. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Como se observa, há um aumento linear na I_{pa} com o aumento da concentração de ciprofibrato, ou seja, o aumento da concentração de ciprofibrato contribui de maneira proporcional para o incremento do valor da I_{pa} . A equação da reta obtida para este estudo é $I_{pa} / \mu\text{A} = -0,700 + 4,75 \times 10^{-4} \times [\text{ciprofibrato} / \text{mol L}^{-1}]$ com um $R = 0,996$ e o limite de detecção encontrado foi de $8,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O

desvio padrão relativo encontrado foi de 1,5% (n = 3) para o ciprofibrato $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

O método proposto foi aplicado na determinação de ciprofibrato em amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com os obtidos empregando-se o método padrão encontrados na literatura⁴. A TABELA 3.4 apresenta os valores para análise de amostra.

Tabela 3.4- Determinação de ciprofibrato em produtos farmacêuticos

Amostra	Valor rotulado (mg)	Método de referência	Método proposto	RE _c ²
A	100	98±5	100 ± 3	2
B	100	100±7	99 ± 4	-1
C	100	100±4	99 ± 6	-1
D	100	104±2	100 ± 6	-4

empregando-se o método proposto e o método padrão

$$RE_c^2 = 100 \times (\text{voltamétrico} - \text{referência}) / \text{referência}$$

Com os resultados obtidos foram empregados para ambos os métodos o teste t pareado⁹⁹ para comparação. O valor do t calculado foi de 2,77 e o t encontrado foi de 0,55, indicando desta maneira que o método proposto possui uma boa exatidão, uma vez que não foi observada uma diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

3.2.6- Adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação de ciprofibrato nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado a fim de se verificar a influência de possíveis interferentes existentes da matriz das amostras sobre a determinação deste analito no método voltamétrico proposto, sendo obtido uma recuperação em um intervalo de 99,8% a 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata para quatro amostras de ciprofibrato nas dosagens de 100 mg. A TABELA 3.5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3.5- Estudo de adição e recuperação de ciprofibrato em formulações farmacêuticas empregando um GCE-MWCNTs/PAH e DPV

Ciprofibrato / (10^{-5} mol L⁻¹)			
Amostras	Adicionado	Recuperado	Recuperação^a(%)
A	6,62	6,61 ± 0,01	99,8
	7,93	7,94 ± 0,01	100
	9,25	9,25 ± 0,02	99,9
B	6,62	6,61 ± 0,02	99,8
	7,93	7,92 ± 0,01	99,8
	9,25	9,24 ± 0,02	99,8
C	6,62	6,61 ± 0,01	99,8
	7,93	7,92 ± 0,01	99,8
	9,25	9,25 ± 0,02	100
D	6,62	6,63 ± 0,02	100
	7,93	7,91 ± 0,02	99,8
	9,25	9,23 ± 0,01	100

^a média aritmética de 3 medidas/amostras

3.2.7- Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade

Para este estudo foram utilizados 3 eletrodos de GCE-MWCNTs/PAH. Foram realizadas 5 medidas de DPV em presença de ciprofibrato $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹ (pH 7,0) com cada eletrodo em 3 dias consecutivos, obtendo-se um desvio padrão relativo de 0,2 % para repetibilidade e 1,0 % para a reprodutibilidade. Com um filme sobre o eletrodo foi possível realizar mais de 50 determinações sem a variação significativa do sinal analítico.

3.3- Determinação de dopamina

3.3.1- Comportamento eletroquímico da dopamina utilizando o eletrodo de GCE-MWCNTs/PAH

Para o estudo de determinação de dopamina (DA) foram primeiramente realizadas medidas de voltametria cíclica para observar e comparar os possíveis processos redox deste fármaco usando o GCE e o GCE-MWCNTs/PAH. As medidas foram realizadas na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5. O intervalo de potencial usado foi de -0,2 a 0,8 V vs. Ag / AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) com uma velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} . A FIGURA 3.14 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos com os diferentes eletrodos.

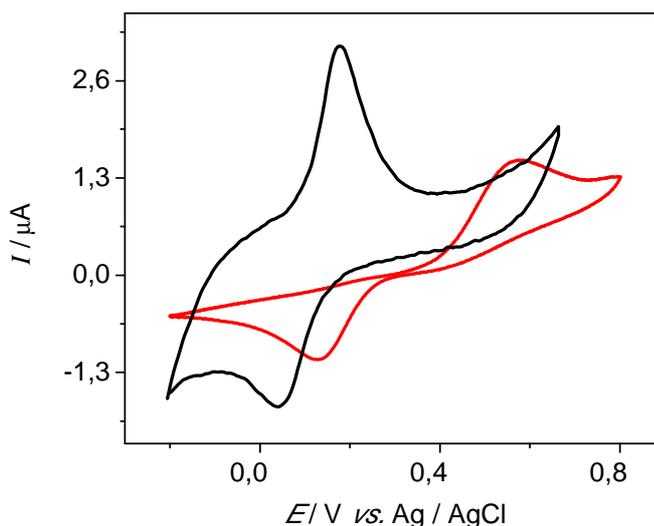


Figura 3.14- Voltamogramas cíclicos empregando-se um —GCE-MWCNTs/PAH e um — GCE em DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 e $v = 50 \text{ mV/s}$.

O resultado obtido mostra que em presença de DA, o eletrodo GCE modificado com o filme MWCNTs/PAH promove um efeito eletrocatalítico e um incremento de corrente (anódica e catódica) em relação ao eletrodo sem modificação. De acordo com a literatura, eletrodos modificados com nanotubos de carbono promovem uma eletrocatalise (aumento das correntes de pico anódica e catódica e diminuição dos potenciais dos dois processos) em presença de um

analito de interesse. Sendo assim, este resultado obtido corrobora com a literatura^{10,11}. Com os valores de potenciais obtidos nos picos de oxidação e redução foi calculado um $\Delta E = 0,5$ V para o eletrodo GCE e um $\Delta E = 0,1$ V para o eletrodo GCE-MWCNTs/PAH, indicando uma maior cinética de transferência de elétrons para o eletrodo GCE-MWCNTs/PAH^{97,98}. A TABELA 3.6 apresenta os valores de pico de corrente anódica e catódica e com os respectivos potenciais de obtenção para o GCE sem modificação e para o GCE-MWCNTs/PAH.

Tabela 3.6- Valores das correntes de pico anódica e catódica e respectivos potenciais para os eletrodos GCE e para o GCE-MWCNTs/PAH na presença de DA $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

Eletrodo	$I_{pa} / \mu A$	E / V	$I_{pc} / \mu A$	E / V
GCE-sem modificação	1,5	0,6	-1,1	0,1
GCE-MWCNTs/PAH	3,0	0,1	-1,8	0,0

Com o valor do potencial para o pico da corrente anódica apresentada na TABELA 3.5 e com alguns trabalhos encontrados na literatura, pode-se constatar que o filme proposto neste estudo apresentou bom efeito eletrocatalítico. A TABELA 3.7 apresenta alguns resultados encontrados na literatura.

Tabela 3.7- Resultados encontrados na literatura para a determinação de DA

Eletrodo	E_{pa}/V	Referência
A	$\approx 0,3$	38
B	$\approx 0,2$	41
C	$\approx 0,3$	3
D	$\approx 0,2$	100
E	$\approx 0,1$	Este trabalho

A= GCE/Ácido cromo azul K, B= Carbono mesoporus/Nafion, C= Eletrodo de compósito de carbono, D= GCE/f-MWCNTs(nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados), E= GCE/MWCNTs/PAH.

De acordo com a literatura¹⁰¹⁻¹⁰³, o pico anódico é referente à oxidação da DA à *o*-quinona com a participação de dois elétrons no processo. A FIGURA 3.15 apresenta o mecanismo do processo redox para a DA.

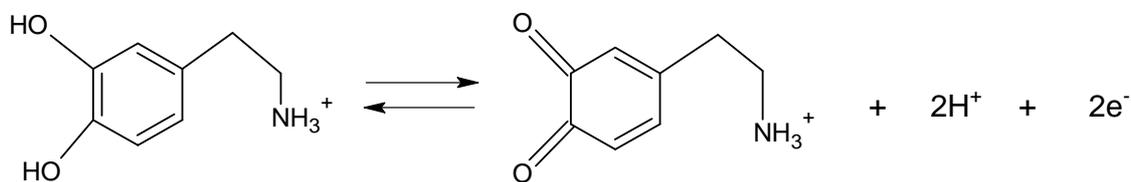


Figura 3.15- Esquema da reação de oxidação da DA¹⁰¹⁻¹⁰³.

3.3.2- Efeito da velocidade de varredura de potencial

A influência da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta voltamétrica do GCE-MWCNTs/PAH no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} (vs. Ag/AgCl) foi investigada para a uma solução de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de DA em solução cloreto de potássio (KCl) $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5. A FIGURA 3.16 apresenta os resultados obtidos.

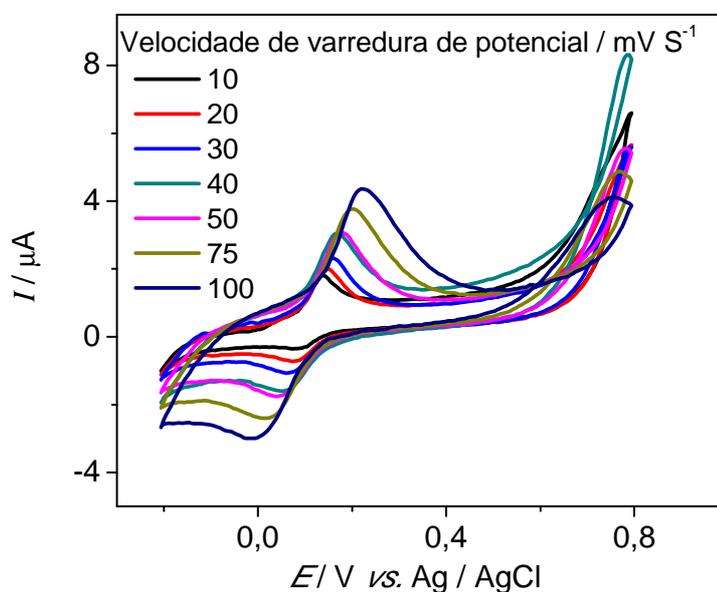


FIGURA 3.16- Variação da resposta voltamétrica do GCE-MWCNTs/PAH com velocidade de varredura de potencial na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). $v = 10, 20, 30, 40, 50, 75$ e 100 mV s^{-1} .

Os valores encontrados da corrente de pico anódica foram colocados em gráfico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial como apresentado na FIGURA 3.17.

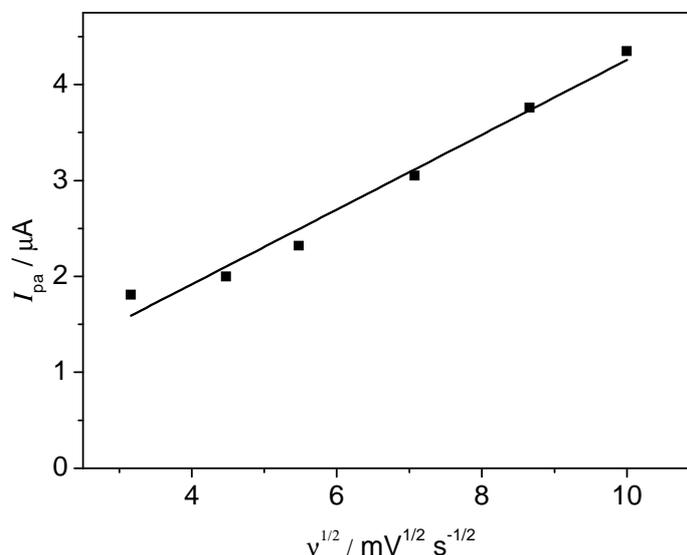


FIGURA 3.17- Dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial para o GCE-MWCNTs/PAH na presença de DA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Como é observado, há uma dependência linear entre as correntes de pico anódica com a $v^{1/2}$. Isto sugere um processo controlado por difusão. Da mesma maneira a equação que descreve essa dependência: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,36 + 0,39 v^{1/2} (\text{mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2})$, não intercepta o eixo y na posição zero, indicando que o processo de transferência de elétrons não ocorre somente na interface do eletrodo e a solução, sugerindo que etapas de adsorção e/ou de interação com sítio ativo podem estar envolvidas.

3.3.3- Efeito do Eletrólito Suporte

Foram avaliados como eletrólitos suporte para determinação amperométrica de DA uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para as medidas em tampão fosfato o melhor potencial de trabalho foi de 0,2 V e para medidas em KCl o melhor potencial foi de 0,3 V. As concentrações de DA utilizadas foram $3,3 \times 10^{-6}$; $6,6 \times 10^{-6}$; $9,9 \times 10^{-6}$; $1,3 \times 10^{-5}$; $1,6 \times 10^{-5}$; $1,9 \times 10^{-5}$; $2,2$

$\times 10^{-5}$; $2,6 \times 10^{-5}$; $2,9 \times 10^{-5}$ e $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A Figura 3.18 apresenta os resultados obtidos para este estudo.

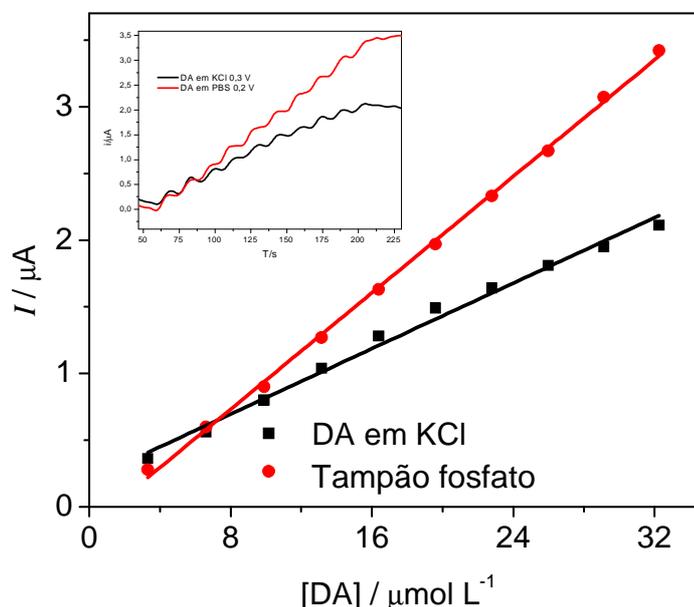


Figura 3.18- Curvas analíticas obtidas amperometricamente para a DA em meio de solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ e solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

As medidas realizadas em solução de tampão fosfato apresentam uma maior inclinação da curva analítica, logo, uma maior sensibilidade. Desta maneira, todas as medidas para DA foram realizadas em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

3.3.4- Estudo de interferentes em potencial

Estudo de interferentes em potencial na determinação amperométrica de DA, como o ácido úrico (AU) e ácido ascórbico (AA) foram realizados. Essas substâncias coexistem com a DA em meios biológico sendo assim, o maior problema encontrado durante a determinação de DA é a sobreposição dos potenciais de pico do ácido úrico e ascórbico, interferindo desta maneira na quantificação de DA quando se utiliza eletrodos sem modificação. Desta maneira é de grande importância o desenvolvimento de eletrodos que apresentem a capacidade de determinar AU, AA e DA sem que ocorram interferências¹⁰⁴ de um composto na determinação do outro

composto de interesse. A FIGURA 3.19 apresenta um voltamograma cíclico em presença de DA, AU e AA em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A concentração de DA utilizada foi de 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e de AA e AU foi de 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (1:10). A velocidade de varredura de potencial foi de 50 mV s⁻¹ em um intervalo de potencial de -0,1 a 0,5 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

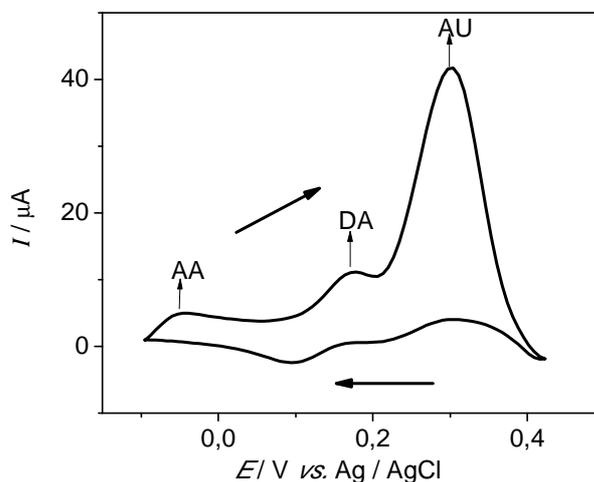


Figura 3.19- Voltamograma cíclico de solução contendo DA 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ AA e AU (2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Com o voltamograma obtido verificou-se que a variação de potencial entre os picos de oxidação de DA-AA, DA-AU e AA-AU foram de 0,2 V, 0,1 V e 0,3 V respectivamente. Resultados encontrados na literatura^{42,104-107} também apresentam valores semelhantes, desta maneira, o sistema GCE-MWCNTs/PAH apresenta um bom desempenho na seletividade entre a DA, AA e AU durante medidas simultâneas. Desta maneira, durante este estudo não foi observado nenhuma interferência na razão de concentração utilizada.

3.3.5- Curva analítica e aplicação

Determinações amperométricas empregando eletrodo GCE-MWCNTs/PAH em um potencial de 0,2 V (vs .Ag/AgCl) foram realizadas em diferentes concentrações de DA para se obter uma curva analítica. A FIGURA 3.20 apresenta o amperograma e a curva de calibração obtida. As concentrações utilizadas foram de 3,3 x 10⁻⁶; 6,6 x 10⁻⁶; 9,9 x 10⁻⁶; 1,3 x 10⁻⁵; 1,6 x 10⁻⁵; 1,9 x 10⁻⁵; 2,2 x 10⁻⁵; 2,6 x 10⁻⁵; 2,9 x 10⁻⁵ e 3,3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

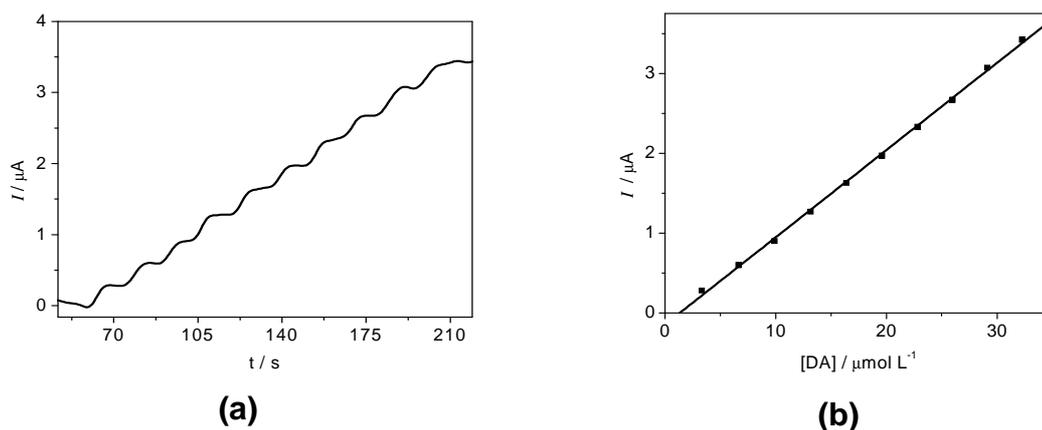


Figura 3.20- (a) Amperograma obtido para a determinação de DA nas concentrações de $3,3 \times 10^{-6}$; $6,6 \times 10^{-6}$; $9,9 \times 10^{-6}$; $1,3 \times 10^{-5}$; $1,6 \times 10^{-5}$; $1,9 \times 10^{-5}$; $2, \times 10^{-5}$; $2,6 \times 10^{-5}$; $2,9 \times 10^{-5}$ e $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e E = 0,2 V; (b) Curva analítica obtida para DA.

A curva analítica obtida apresentou uma linearidade na faixa de concentração do analito de $3,32 \times 10^{-6}$ a $3,32 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e, a equação da curva analítica foi I_{pa} (μA) = -0,1418 + 1,091 × 10⁵ [DA] com um R=0,999. O limite de detecção encontrado foi de $5,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com um desvio padrão relativo de 1,5% (n = 3) para DA $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Em um trabalho realizado por SOLÍS *et al.*¹⁰³ utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com a enzima polifenol oxidase extraída de batata, obteve-se uma quantificação amperométrica de DA no intervalo de concentração de $1,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e com um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Já no trabalho realizado por SILVA *et al.*¹⁰⁸, utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com polifenol oxidase (PPO), também quantificaram DA amperometricamente em um sistema em fluxo, obtendo-se uma linearidade em uma faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. No trabalho realizado por SERRANO *et al.*¹⁰⁵ utilizando um eletrodo de grafite pirolítico modificado em solução de DA foi determinado DA por DPV obtendo-se uma curva analítica linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $1,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A TABELA 3.8 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos encontrados em alguns artigos da literatura com aqueles obtidos nesta tese.

TABELA 3.8- Resultados encontrados na literatura para a determinação de DA

Eletrodo	Técnica	Intervalo de concentração/mol L ⁻¹	Limite de detecção/mol L ⁻¹	Referência
A	Amperometria	1,5 x 10 ⁻⁶ - 2,5 x 10 ⁻⁴	1,5 x 10 ⁻⁶	103
B	Amperometria	2,0 x 10 ⁻⁴ - 2,0 x 10 ⁻²	1,5 x 10 ⁻⁴	108
C	DPV	1,0 x 10 ⁻⁶ - 2,0 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁷	105
D	Amperometria	3,3 x 10 ⁻⁶ - 3,3 x 10 ⁻⁵	5,7 x 10 ⁻⁷	Este trabalho

A= eletrodo de pasta de carbono carbono modificado com a enzima polifenol oxidades extraída de batata, B= eletrodo de pasta de carbono modificado com PPO, C= eletrodo de grafite pirolítico modificado com DA e D= eletrodo GCE-MWCNTs/PAH.

De acordo com a comparação obtida na Tabela 3.8 é observado que o método proposto e o sensor em estudo apresenta um bom potencial para para a aplicação na determinação de DA.

O método proposto foi aplicado na determinação de DA em amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se um método espectrofotométrico descrito pela farmacopéia brasileira⁸⁹. A TABELA 3.9 apresenta os teores de dopamina encontrados em quatro amostras empregando-se o método de referência e o método amperométrico desenvolvido nesta tese.

Tabela 3.9- Determinação de DA em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método espectrofotométrico (referência)⁸⁹

Amostra	Rotulado/mL	Referência	Proposto	RE _c ²
A	5,0	5,0 ± 0,3	,1 ± 0,2	2,0
B	5,0	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,1	0,0
C	5,0	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,1	-3,8
D	5,0	5,2 ± 0,4	5,5 ± 0,5	5,8

RE_c² = 100 x (Valor amperométrico – valor método de referência) / valor método de referência

Os resultados obtidos empregado-se para ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado [14]. O valor do t crítico foi de 2,18 e o t calculado foi de 0,33 indicando desta maneira que o procedimento proposto possui

uma boa exatidão, uma vez que não foi observada uma diferença significativa entre os resultados obtidos, a um nível de confiança de 95%.

A DA também pode ser determinada em amostras biológicas e este tipo de determinação é de grande importância devido à possibilidade de diagnosticar e monitorar várias doenças, além de fornecer informações sobre a interação desta espécie nos processos fisiológicos¹⁰⁵. Sendo assim, foram realizadas determinações amperométricas de DA em urina artificial⁸⁸ empregando-se o eletrodo GCE-MWCNTs/PAH. A FIGURA 3.21 apresenta o amperograma e a curva analítica obtida. As concentrações de DA e as condições de medidas foram as mesmas utilizadas no experimento anterior.

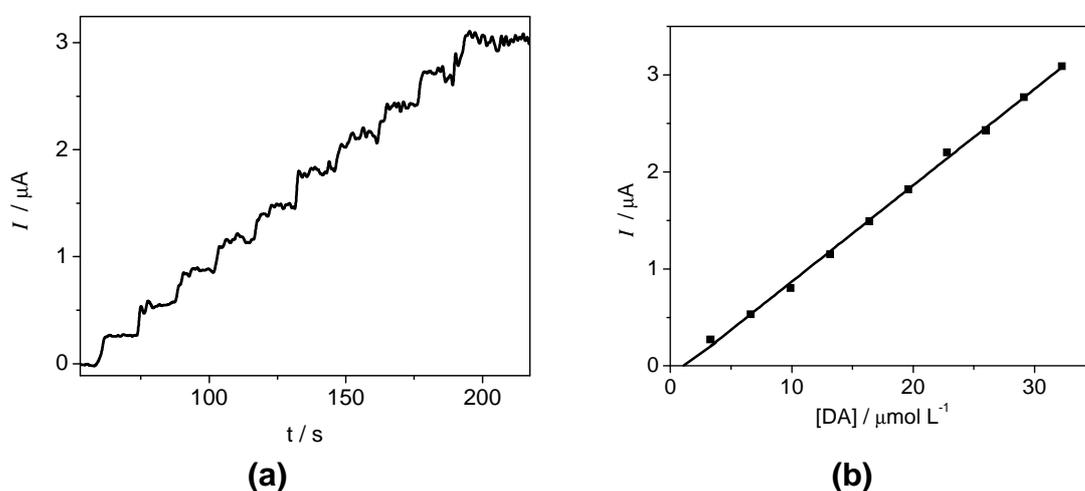


Figura 3.21- (a) Amperograma obtido para a determinação de DA em urina artificial (b) Curva analítica obtida para DA em urina artificial. Medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), E = 0,200 V.

A curva analítica obtida apresentou uma linearidade na faixa de concentração do analito de $3,3 \times 10^{-6}$ a $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta obtida é $I_{pa} (\mu A) = -0,1244 + 9,931 \times 10^{-4} + [DA]$ com um R = 0,998 (n = 3) e um limite de detecção de $8,46 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo foi de 1,5 % (n = 3) para DA $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

3.3.6- Adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação de ciprofibrato nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado a fim de se verificar a influência de possíveis interferentes existentes da matriz das amostras sobre a determinação deste analito no método amperométrico proposto, sendo obtido uma recuperação em um intervalo de 98,8 a 102%. A TABELA 3.10 apresenta os resultados obtidos. Para este estudo foi utilizada uma urina artificial na mesma condição anterior.

Tabela 3.10- Resultados do teste de recuperação de DA adicionada em urina sintética empregando o GCE-MWCNTs/PAH proposto

Amostras	DA/(10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação ^a %
A	1,31	1,29 ± 0,02	99,5
	1,63	1,67 ± 0,01	102
	1,96	1,92 ± 0,01	102
B	1,31	1,30 ± 0,02	99,2
	1,63	1,63 ± 0,03	100
	1,96	1,95 ± 0,02	99,5
C	1,31	1,34 ± 0,06	102
	1,63	1,61 ± 0,03	98,8
	1,96	1,95 ± 0,02	99,5
D	1,31	1,32 ± 0,01	101
	1,63	1,61 ± 0,02	99,4
	1,96	1,96 ± 0,02	100

^amédia aritmética de 3 medidas

3.3.7- Teste da repetibilidade e da reprodutibilidade

Para este estudo foram utilizados 3 eletrodos de GCE-MWCNTs/PAH. Foram realizadas cinco medidas de voltametria cíclica (50 mV s⁻¹) com cada eletrodo durante 3 dias consecutivos em presença de DA 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), obtendo-se um desvio padrão relativo de 0,4 % para repetibilidade e 0,9% para reprodutibilidade. Com um único eletrodo foi possível realizar aproximadamente 60 determinações sem a variação do sinal analítico.

3.4- Determinação de levodopa

3.4.1- Comportamento eletroquímico da levodopa utilizando um GCE-MWCNTs/PAH

Inicialmente foi realizada uma medida de voltametria cíclica (VC) a fim de se observar o comportamento eletroquímico da Levodopa (L-dopa) com o GCE-MWCNTs/PAH e verificar os processos redox deste fármaco. As medidas foram realizadas em presença de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A velocidade de varredura de potencial foi de 50 mV s^{-1} em um intervalo de potencial de $-0,8 \text{ V}$ a $0,8 \text{ V}$ (vs. Ag / AgCl). A FIGURA 3.22 apresenta o resultado obtido.

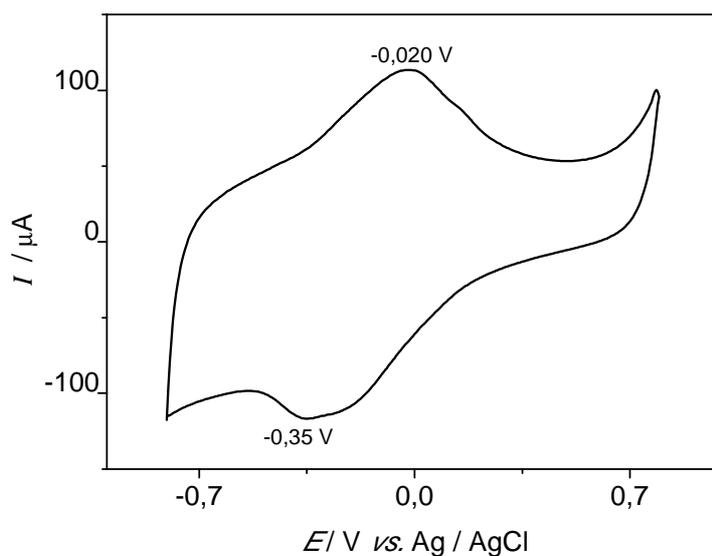


Figura 3.22- Ciclo voltamograma em presença de L-dopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ obtido com um GCE-MWCNTs/PAH em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir do voltamograma cíclico obtido é observado um pico de oxidação e de redução da L-dopa em $-0,020 \text{ V}$ e $-0,350 \text{ V}$ respectivamente. De acordo com LIU *et al.*¹⁰⁹ o pico anódico está relacionado com a oxidação da L-dopa para dopaquinona e o pico catódico está relacionado com a redução da dopacroma para ciclodopa.

Neste mecanismo há o envolvimento dois elétrons. A FIGURA 3.23 apresenta o mecanismo completo envolvido neste processo redox.

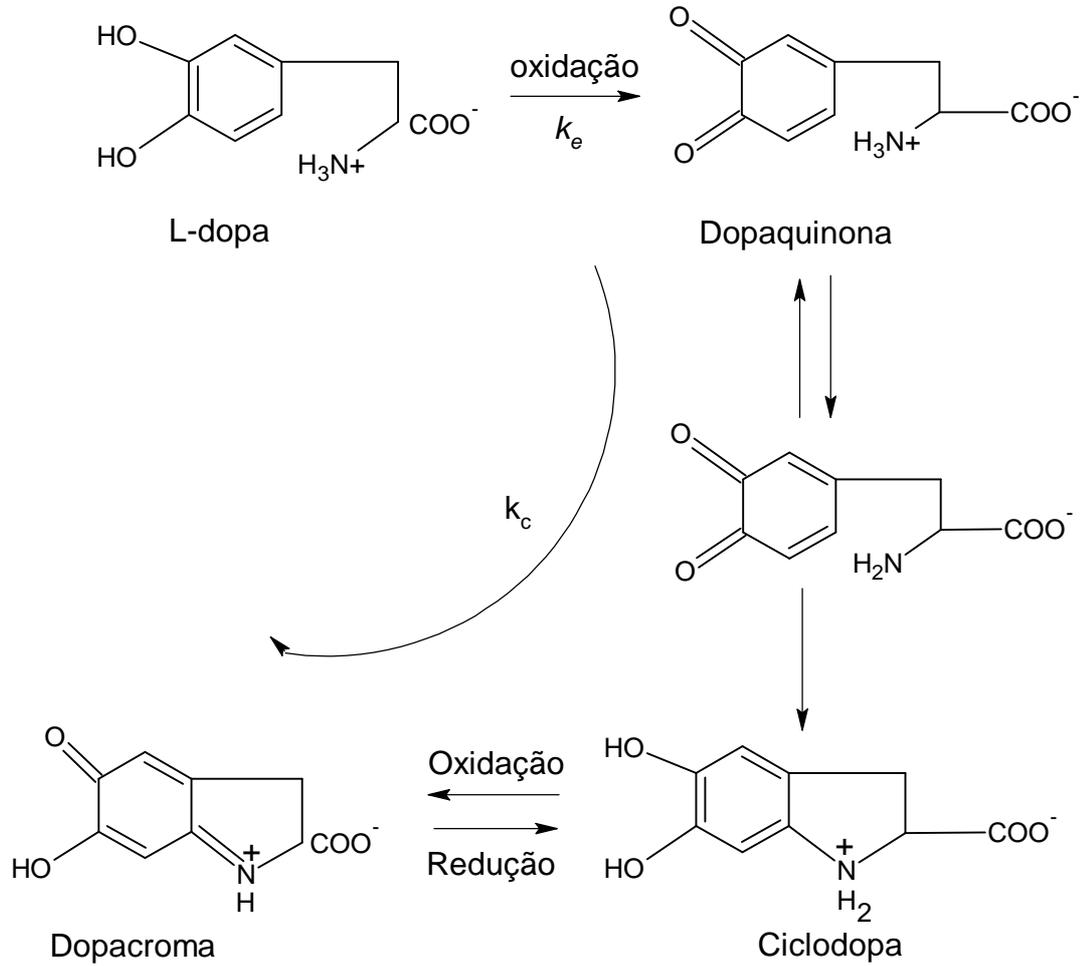


Figura 3.23- Esquema do mecanismo redox da L-dopa¹⁰⁹.

A TABELA 3.11 apresenta os valores de potenciais de picos anódicos e catódicos para determinação de L-dopa utilizando medidas de voltametria cíclica.

TABELA 3.11- Valores de potenciais de picos anódicos e catódicos para a L-dopa encontradas na literatura

Eletrodo	E_{ox} / V (vs. Ag / AgCl)	E_{red} / V (vs. Ag / AgCl)	Referência
A	≈0,2	≈0,19	110
B	≈0,6	≈0,2	111
C	≈0,7	≈0,4	80
D	-0,02	-0,3	Este trabalho

A= Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e poly(pirrol) dopado com Tiron, B= Eletrodo de grafite poliuretano modificado com um filme de Oxovanadio-Salen, C= Eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em resina de poliester, D= GCE-MWCNTs/PAH.

Os resultados obtidos nesta parte trabalho apresentam valores de oxidação e redução menores em relação aos trabalhos encontrados na literatura, isto é, houve uma diminuição do sobrepotencial de trabalho. Conforme estudado anteriormente na literatura^{10, 11} este efeito é devido à presença de CNT sobre a superfície do GCE. Outra vantagem oferecida quando se trabalha em baixos potenciais (próximos a 0 V) é que menores serão as chances de ocorrer interferências durante as medidas por substâncias encontradas no analito de interesse. Desta maneira, o sistema em estudo apresenta um bom potencial para sua aplicação na determinação da L-dopa.

Observou-se também o comportamento eletroquímico do GCE e do GCE-MWCNTs/PAH para L-dopa $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) aplicando-se a técnica DPV nas seguintes condições: amplitude de pulso (A) de 40 mV velocidade de varredura de potencial (v) de 10 mV s^{-1} , tempo de pulso (t) de 0,100 s e janela de potencial de -0,2 a 0,6 V (vs. Ag/AgCl). A FIGURA 3.24 apresenta os voltamogramas obtidos.

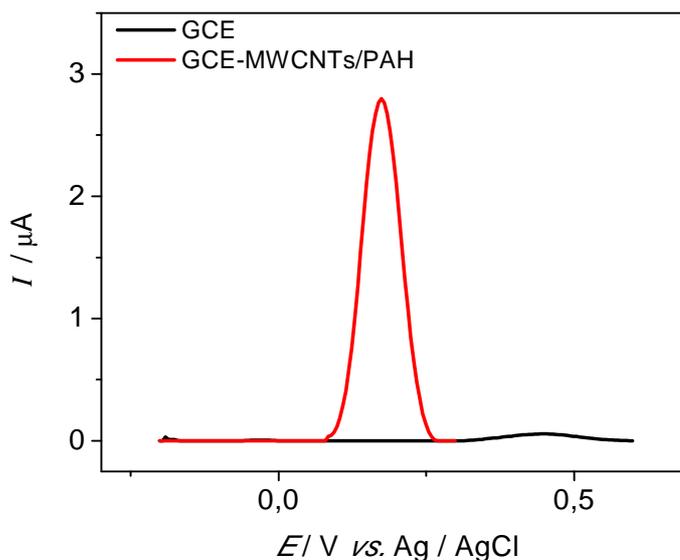


Figura 3.24- Voltamogramas de pulso diferencial para a comparação do comportamento do — GCE e do — GCE-MWCNTs/PAH em presença de L-dopa $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). $A = 40 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Pode-se observar que, em presença de L-dopa, o eletrodo GCE modificado com o filme MWCNTs/PAH promove um efeito eletrocatalítico e um incremento de corrente anódica em relação ao eletrodo sem modificação. Para o GCE em meio de L-dopa observa-se uma corrente anódica de $0,05 \mu\text{A}$ em $0,4 \text{ V}$ e para o GCE-MWCNTs/PAH é observado uma corrente anódica de $2,79 \mu\text{A}$ em $0,2 \text{ V}$. Desta maneira, este resultado corrobora com a literatura no que diz respeito ao efeito eletrocatalítico e ao incremento de corrente promovido por eletrodos modificados com nanotubos de carbono em presença de analitos de interesse^{10, 11}.

3.4.2- Efeito do Eletrólito Suporte

Avaliou-se então o eletrólito mais adequado para a determinação da L-dopa. Este estudo foi realizado com medidas de DPV em presença de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Foram avaliadas soluções de H_2SO_4 , ácido acético (HAc), KCl, KNO_3 , NaCl e NaNO_3 na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Desta maneira aplicou-se a técnica DPV nas seguintes condições: amplitude de pulso (A) de 40 mV velocidade de varredura de potencial (v) de 10 mV s^{-1} , tempo de pulso (t) de $0,100 \text{ s}$ e janela de potencial de

-0,2 a 0,6 V (vs. Ag/AgCl). VER ANTERIOR A FIGURA 3.25 apresenta o efeito de cada eletrólito utilizado.

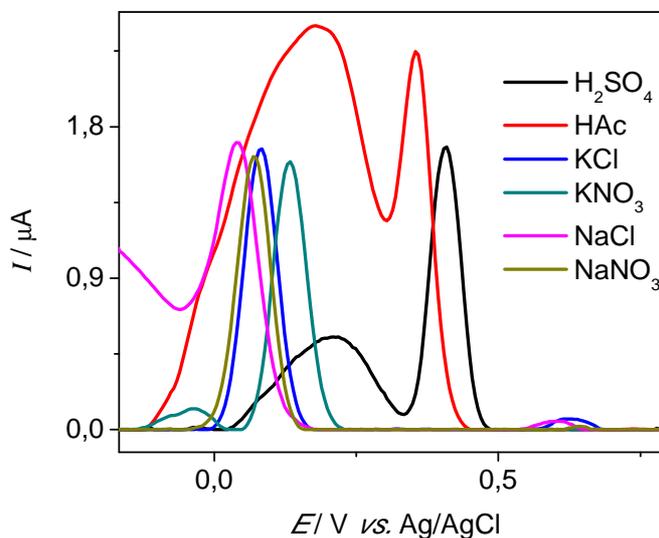


Figura 3.25- Comportamento do pico de corrente anódica da L-dopa em diferentes eletrólitos suportes. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Como pode ser observado, o maior valor de corrente anódica é apresentado pelo eletrólito HAc $2,4 \mu\text{A}$ em um potencial de $0,179 \text{ V}$. Entretanto como explicado anteriormente, picos anódicos ou catódicos com baixo valores de potencial apresentam menores chances de interferências, logo, o eletrólito mais apropriado para a continuidade deste trabalho foi a solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.3- Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Para a otimização das medidas de DPV na determinação de L-dopa foram avaliados os valores mais adequados para a velocidade de varredura de potencial, para a amplitude de pulso e para o tempo de pulso. A FIGURA 3.26 apresenta os resultados obtidos para o estudo do tempo de pulso aplicado. Para todos os estudos foi utilizada uma solução de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e um intervalo de potencial de $-0,2$ a $0,3 \text{ V}$. A velocidade de varredura de potencial foi de 10 mV s^{-1} e a amplitude de pulso de 40 mV . O intervalo de tempo estudado foi de $0,08$ a $0,140 \text{ s}$.

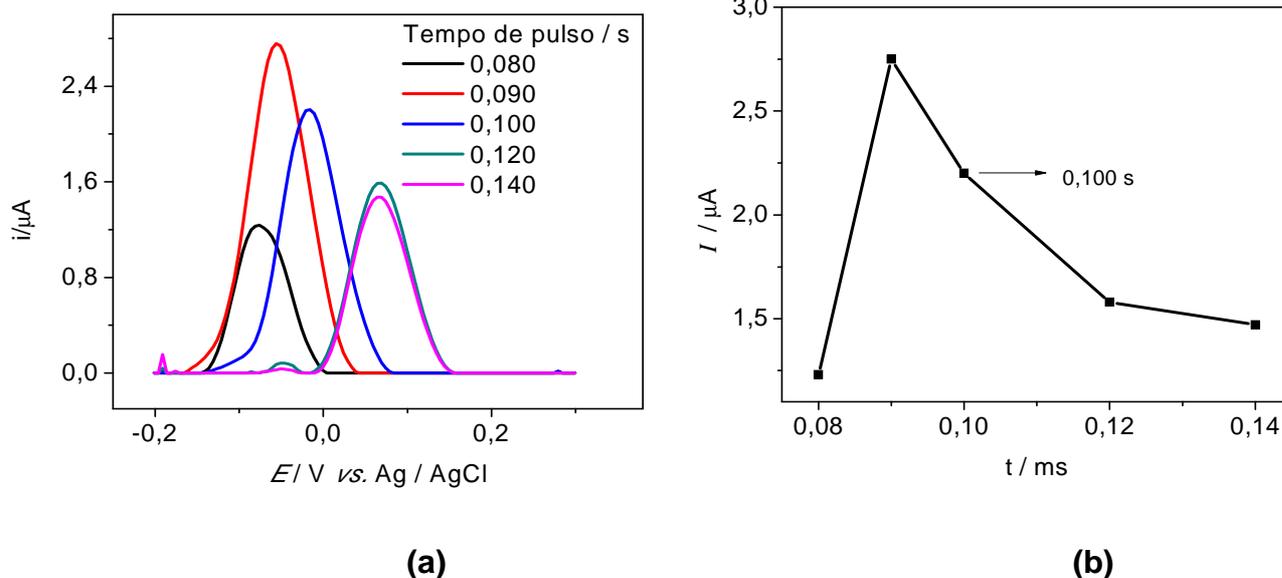


FIGURA 3.26- (a) Influência da variação do tempo de pulso aplicado nos voltamogramas de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 40 \text{ mV}$), (b) Dependência da corrente de pico anódico com a variação do tempo de pulso aplicado para a L-dopa.

Observa-se que houve um aumento na corrente anódica até 0,090 s e em seguida um decréscimo dos valores de corrente, além de que à medida que se aumenta o tempo de pulso há um deslocamento do pico anódico para potenciais mais positivos. Mesmo com o valor de corrente maior em 0,090 s o tempo de 0,100 s foi escolhido por apresentar um pico de corrente anódica próximo ao potencial de 0 V. Em seguida foi investigado o efeito da variação da velocidade de varredura de potencial sobre o sinal analítico. Neste estudo foi utilizado o intervalo de 1 a 12 mV s^{-1} . A FIGURA 3.27 apresenta os resultados obtidos.

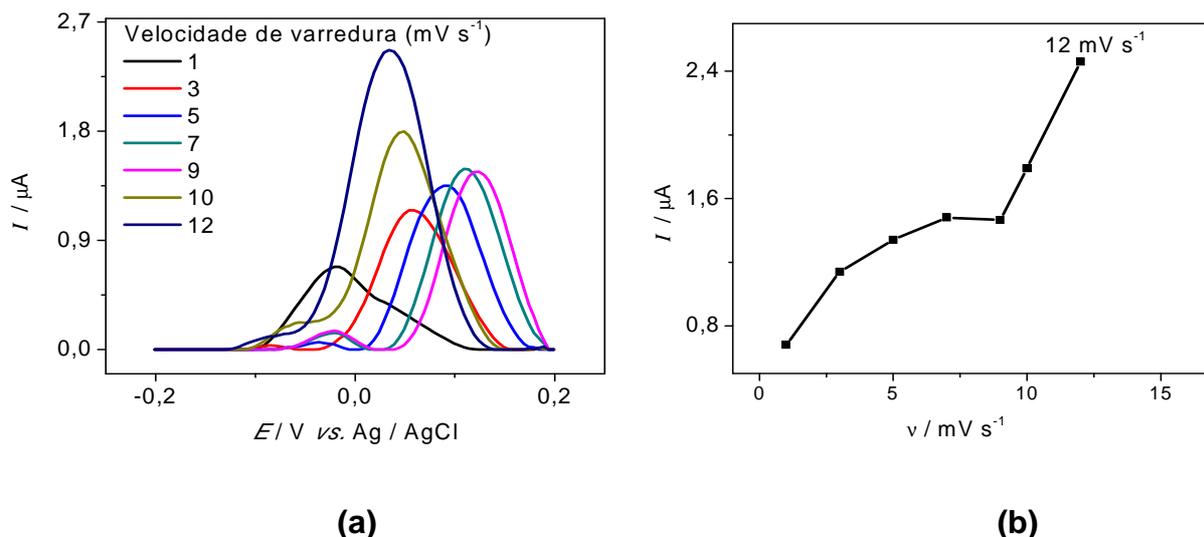


FIGURA 3.27- (a) Influência da velocidade de varredura de potencial aplicado nos voltamogramas de pulso diferencial de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$), (b) Dependência da corrente de pico anódico com variação da velocidade de varredura de potencial.

Como pode ser observado nesta figura há um aumento da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura de potencial no intervalo de $2,5$ a $7,5 \text{ mV s}^{-1}$, permanecendo constante entre $7,6$ e $9,0 \text{ mV s}^{-1}$ e aumentando novamente em velocidades de varredura de potencial superiores. Desta maneira a velocidade de varredura de potencial selecionada foi de 12 mV s^{-1} para estudos posteriores.

Em seguida foi avaliada a influência da amplitude de pulso aplicado. O tempo de pulso aplicado foi de $0,100 \text{ s}$ e a velocidade de varredura de potencial de 12 mV s^{-1} . O intervalo investigado foi de 10 a 70 mV , como pode ser observado na FIGURA 3.28. O aumento da amplitude de pulso faz com que ocorra um aumento na magnitude da corrente e o deslocamento do potencial de pico para valores menores (menos positivos). Para o intervalo de $0,05$ a $0,07 \text{ V}$ é observado um comportamento linear, desta maneira a amplitude de $0,06 \text{ V}$ foi a selecionada para o desenvolvimento dos experimentos posteriores.

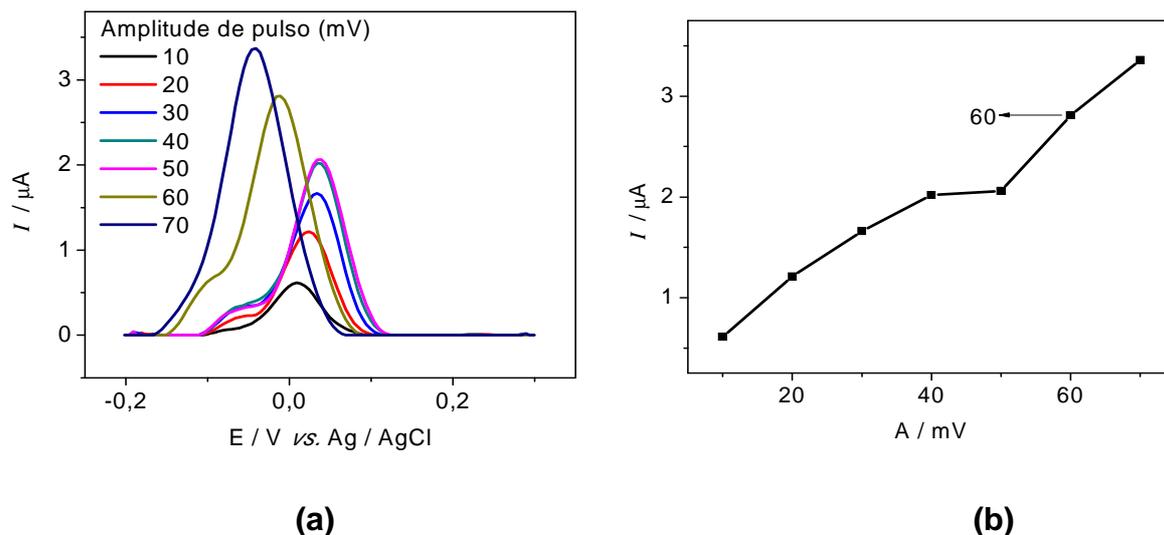


FIGURA 3.28- (a) Influência da variação da amplitude de pulso de potencial nos voltamogramas de L-dopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 12 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100 \text{ s}$), (b) Dependência da corrente de pico anódico com a variação da amplitude de pulso de potencial para a L-dopa.

Desta maneira os valores a serem utilizados na seqüência deste estudo estão apresentados na TABELA 3.12.

TABELA 3.12- Valores de tempo de pulso, velocidade de varredura de potencial e amplitude de pulso aplicado para determinação de L-dopa usando a técnica de DPV

Parâmetros	Intervalos estudados	Valores selecionados
Amplitude de pulso (mV)	10 - 70	60
velocidade de varredura de potencial (mV s^{-1})	10 - 15	12
Tempo de pulso (s)	0,080 - 0,120	0,100

3.4.4- Estudo de interferentes em potencial

Estudos de interferentes em potencial da L-dopa, como o manitol, polivinilpirrolidona (PVP) e amido foram realizados. Essas substâncias são as encontradas como excipientes nos medicamentos adquiridos para análise. As substâncias avaliadas foram diluídas em solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ todas em uma

razão de concentração de 1:10 (analito:interferente). A concentração de L-dopa utilizada foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e dos interferentes de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as substâncias investigadas não causaram interferência na determinação de L-dopa nesta razão de concentração.

3.4.5- Curva analítica e aplicação

Após estudar as condições de trabalho para o GCE-MWCNTs/PAH, realizaram-se medidas de DPV no intervalo de -0,3 a 0,1 V (vs. Ag/AgCl) em diferentes concentrações de L-dopa em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de se obter uma curva analítica. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 12 mV s^{-1} , amplitude de 60 mV e o tempo de pulso de 0,100 s. A FIGURA 3.29 apresenta os resultados obtidos.

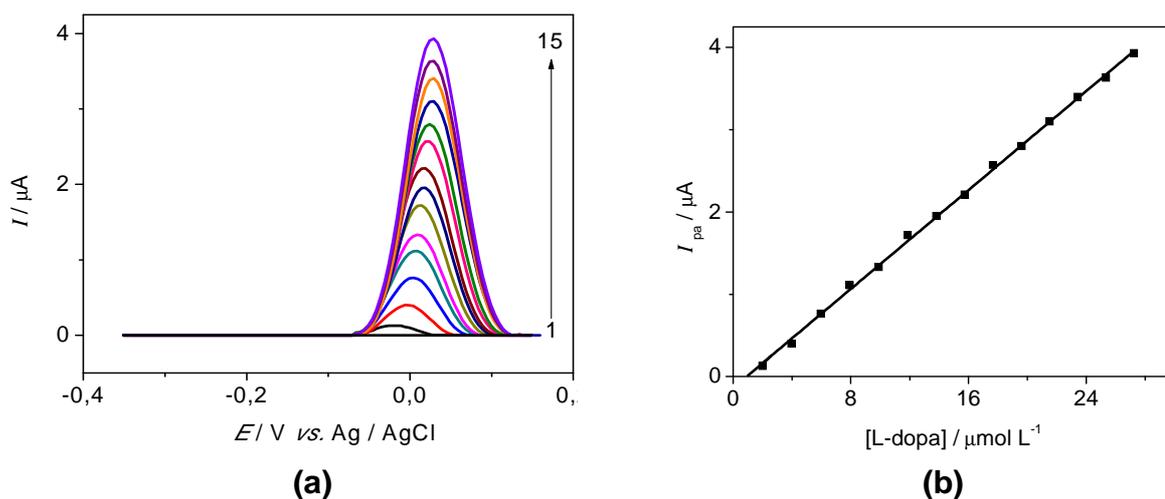


FIGURA 3.29- (a) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de L-dopa em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-6}$; (3) $3,9 \times 10^{-6}$; (4) $5,9 \times 10^{-6}$; (5) $7,9 \times 10^{-6}$; (6) $9,9 \times 10^{-6}$; (7) $1,1 \times 10^{-5}$; (8) $1,3 \times 10^{-5}$ (9) $1,5 \times 10^{-5}$; (10) $1,7 \times 10^{-5}$; (11) $1,9 \times 10^{-5}$; (12) $2,1 \times 10^{-5}$; (13) $2,3 \times 10^{-5}$; (14) $2,5 \times 10^{-5}$; (15) $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $v = 12 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 60 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$. **(b)** Curva analítica para L-dopa.

A equação da curva analítica obtida foi $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,138 + 1,50 \times 10^5 [\text{L-dopa}]$ para o intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $8,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um desvio padrão relativo menor que 1,5 % ($n=3$) para L-dopa $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Em um trabalho realizado por VIEIRA *et al.*⁸⁰ foi determinado por DPV, o fármaco L-dopa, utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em resina de poliéster e obtiveram linearidade no intervalo de $2,6 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. No trabalho realizado por SHAO *et al.*¹¹² utilizando um eletrodo de grafite pirolítico modificado com um filme de nanopartículas de ouro com nanotubos de carbono, determinou-se por DPV L-dopa em um intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de 50×10^{-9} mol L⁻¹. Já em um trabalho realizado por TONG *et al.*⁷⁴, desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de parede simples para a determinação de L-dopa por DPV, onde foi obtida uma linearidade de $5,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Outro trabalho encontrado na literatura, realizado por BOCCHI¹¹³ *et al.*, foi desenvolvido um eletrodo de pasta de carbono modificado com um complexo amino rutênio trinuclear incorporado em zeólitas NaY, que por medidas de voltametria cíclica (VC) obteve-se uma linearidade de $1,2 \times 10^{-4}$ a 1×10^{-2} mol L⁻¹ e um limite de detecção de $8,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A TABELA 3.13 apresenta os resultados encontrados na literatura.

TABELA 3.13- Resultados para determinação de L-dopa encontrados na literatura

Eletrodo	Técnica	Intervalo de concentração/mol L ⁻¹	Limite de detecção/mol L ⁻¹	Referência
A	DPV	$2,6 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-5}$	80
B	DPV	$1,0 \times 10^{-7}$ a 150×10^{-6}	50×10^{-9}	112
C	DPV	$5,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-7}$	74
D	VC	$1,2 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$	$8,5 \times 10^{-5}$	113
E	DPV	$2,0 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-7}$	Este trabalho

A= eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em resina de poliéster; B= eletrodo de grafite pirolítico modificado com um filme de nanopartículas de ouro com nanotubos de carbono; C= eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de parede simples; D= eletrodo de pasta de carbono modificado com um complexo amino rutênio trinuclear incorporado em zeólitas NaY e E= GCE-MWCNTs/PAH.

O método proposto foi aplicado na determinação de L-dopa em amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método de referência⁹⁰. A TABELA 3.14 apresenta os valores para análise de amostra de L-dopa.

TABELA 3.14- Determinação de L-dopa em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método de titulação potenciométrica⁹⁰

Amostra	Valor rotulado (mg/drágea)	Método de referência	Método proposto	RE _c ²
A	100	99,7 ± 0,8	99,4 ± 1	-0,3
B	100	98,7 ± 0,9	101 ± 1	2,3
C	100	101,3 ± 1	100 ± 2	-1,3
D	100	102,5 ± 2	100 ± 2	-2,4

$RE_c^2 = 100 \times (\text{voltamétrico} - \text{valor método de referência}) / \text{valor método de referência}$

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado e não foi observada uma diferença significativa entre os resultados obtidos a um nível de confiança de 95%, indicando assim que o método proposto apresenta uma boa exatidão.

3.4.6- Adição e recuperação

O estudo de adição e recuperação de L-dopa nas formulações farmacêuticas de interesse foi realizado a fim de se verificar a influência de possíveis interferentes existentes da matriz das amostras sobre a determinação deste analito no método voltamétrico proposto, sendo obtida uma recuperação em um intervalo de 92 a 105%. A TABELA 3.15 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 3.15- Resultados obtidos para o estudo de adição e recuperação da L-dopa em amostras comerciais

Amostras	L-dopa/(10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação*
A	0,79	0,80 ± 0,01	101
	0,99	0,97 ± 0,02	98
	1,20	1,2 ± 0,02	100
B	0,79	0,83 ± 0,02	105
	0,99	1,0 ± 0,06	101
	1,20	1,1 ± 0,1	92
C	0,79	0,77 ± 0,01	98
	0,99	0,98 ± 0,01	99
	1,20	1,2 ± 0,2	100
D	0,79	0,76 ± 0,01	96
	0,99	0,98 ± 0,01	99
	1,20	1,17 ± 0,06	97

3.4.7- Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade

Para este estudo foram utilizados 3 eletrodos de GCE-MWCNTs/PAH. Foram realizadas 5 medidas de DPV em L-dopa $1,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ com cada eletrodo em 3 dias consecutivos obtendo-se um desvio padrão relativo de 0,01 % para repetibilidade e de 1,1% para reprodutibilidade. Foi possível realizar aproximadamente 55 determinações de L-dopa com um GCE-MWCNTs/PAH.

3.5- Determinação de carbidopa

3.5.1- Comportamento eletroquímico da carbidopa utilizando um eletrodo GCE-MWCNTs/PAH

Inicialmente foi avaliado o comportamento eletroquímico (processos redox) da carbidopa utilizando um GCE e um GCE-MWCNTs/PAH. As medidas foram realizadas em presença de carbidopa $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} em um intervalo de potencial de $-0,6$ a $0,6 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). A FIGURA 3.30 apresenta os voltamogramas obtidos.

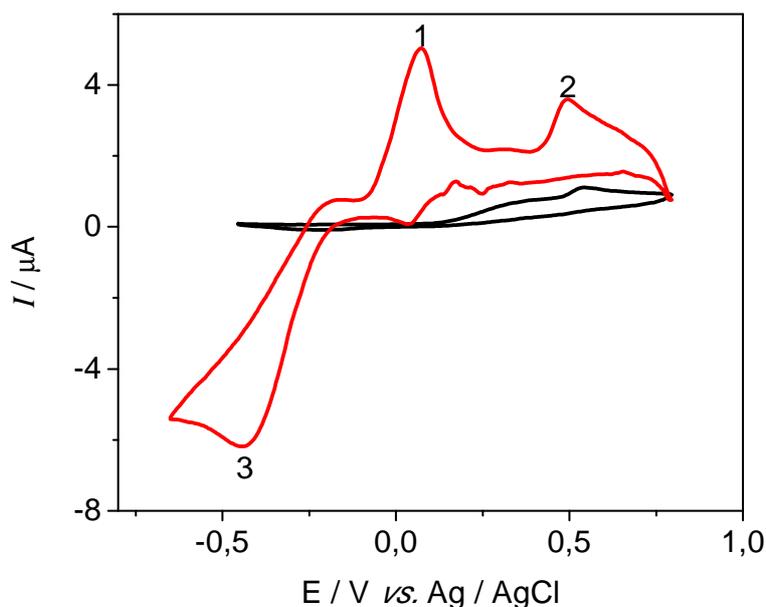


FIGURA 3.30- Voltamogramas cíclicos obtidos para carbidopa $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um — GCE e um — GCE-MWCNTs/PAH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (pH 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Trabalhos encontrados na literatura desenvolvidos por QUINTINO *et al.*¹¹⁴ e VIEIRA *et al.*⁸⁰ demonstram um comportamento semelhante ao obtido nesta parte do trabalho, nos quais há presença de dois picos de oxidação e um de redução durante medidas de voltametria cíclica em presença de carbidopa em meio neutro. O primeiro pico (1) obtido em $0,07 \text{ V}$ corresponde à reação eletroquímica dos dois

grupos hidroxilas e o segundo pico (2) encontrado em 0,5 V é correspondente ao grupo imino da carbidopa. Já o pico catódico (3) próximo de -0,5 V, corresponde a redução da dopaquinona. De acordo com estudos realizados por QUINTINO *et al.*¹¹⁴, a carbidopa por apresentar uma estrutura semelhante a da L-dopa, deve obedecer a um mecanismo de oxidação eletroquímica similar a L-dopa.

3.5.2- Efeito do Eletrólito Suporte

Avaliou-se então o eletrólito mais adequado para a determinação da carbidopa. Este estudo foi realizado com medidas de DPV em presença de carbidopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Foram avaliadas soluções de H_2SO_4 , ácido acético (HAc), KCl, KNO_3 , NaCl e NaNO_3 na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Desta maneira aplicou-se a técnica DPV nas seguintes condições: amplitude de pulso (A) de 40 mV velocidade de varredura de potencial (v) de 10 mV s^{-1} , tempo de pulso (t) de 0,100 s e janela de potencial de -0,2 a 0,6 V (vs. Ag/AgCl). Durante este estudo foi observado um comportamento semelhante ao estudo de eletrólitos para L-dopa, e sendo assim, o eletrólito mais adequado para a determinação de carbidopa foi a solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.5.3- Estudo dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Para a otimização das medidas de DPV na determinação de carbidopa foram avaliados os valores mais adequados para a velocidade de varredura de potencial, para a amplitude de pulso e para o tempo de pulso. Para todos os estudos foi utilizada uma solução de carbidopa $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma janela de potencial de 0,3 a 0,8 V. A FIGURA 3.31 apresenta os resultados obtidos para o estudo de velocidade de varredura de potencial em um intervalo de 5 a 20 mV s^{-1} . A amplitude de pulso utilizado foi de 40 mV e o tempo de pulso 0,100 s.

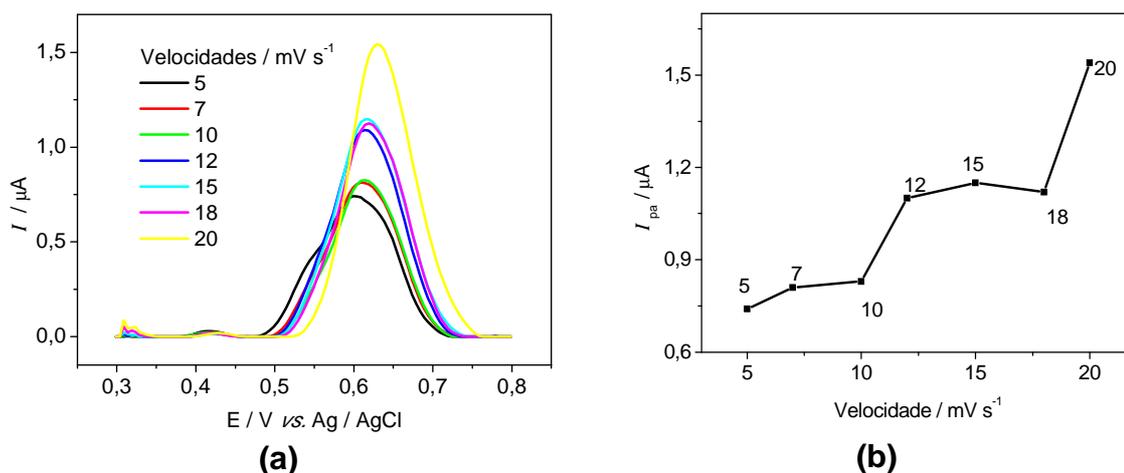


FIGURA 3.31- (a) Voltamogramas obtidos para a variação da velocidade de varredura de potencial utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (b) Variação dos picos de corrente anódica em função da variação da velocidade de varredura de potencial. $A = 40 \text{ mV}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Os resultados obtidos demonstram um aumento dos picos anódicos em função do aumento da velocidade de varredura de potencial e um deslocamento dos voltamogramas para potenciais mais positivos. Uma maior corrente anódica foi obtida em 20 mV s^{-1} , sendo esta velocidade de varredura de potencial a selecionada para o desenvolvimento deste trabalho.

O próximo parâmetro estudado foi a variação da amplitude de pulso em um intervalo de 10 a 90 mV. Neste estudo, a velocidade de varredura de potencial foi de 20 mV s^{-1} e o tempo de pulso de 0,100 s. A FIGURA 3.32 apresenta os resultados obtidos.

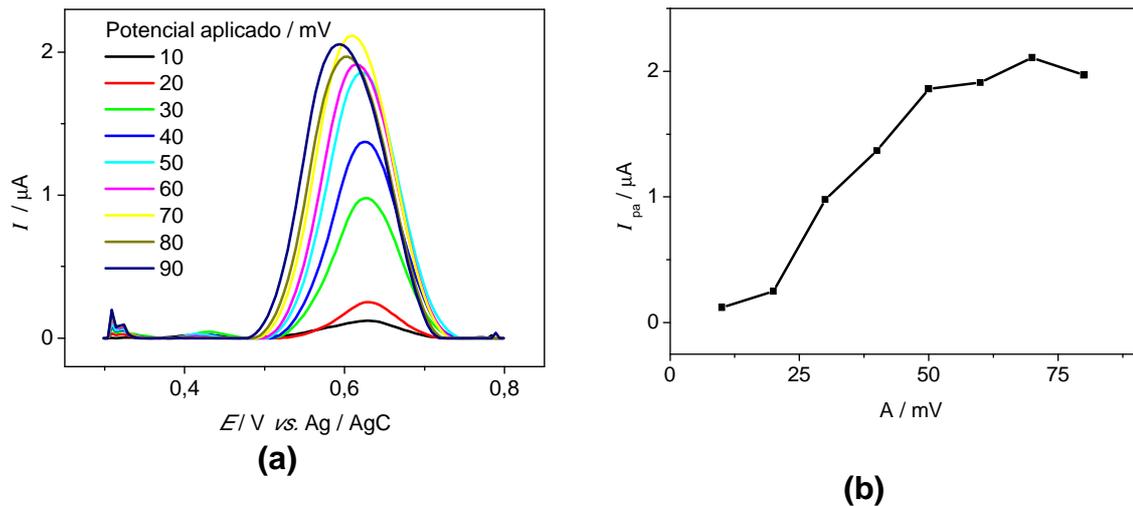


FIGURA 3.32- (a) Voltamogramas obtidos para a variação da amplitude de pulso utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, **(b)** Variação dos picos de corrente anódica em função da variação da amplitude de pulso. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 0,100 \text{ s}$.

Com o resultado obtido é observado um aumento da corrente anódica até a amplitude de 70 mV e desta maneira este foi o potencial selecionado para estudos posteriores. Em seguida, foi avaliado o tempo de pulso aplicado em um intervalo de 0,010 a 0,060 s. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 20 mV s^{-1} e uma amplitude de 70 mV foi também selecionada. A FIGURA 3.33 apresenta o resultado obtido.

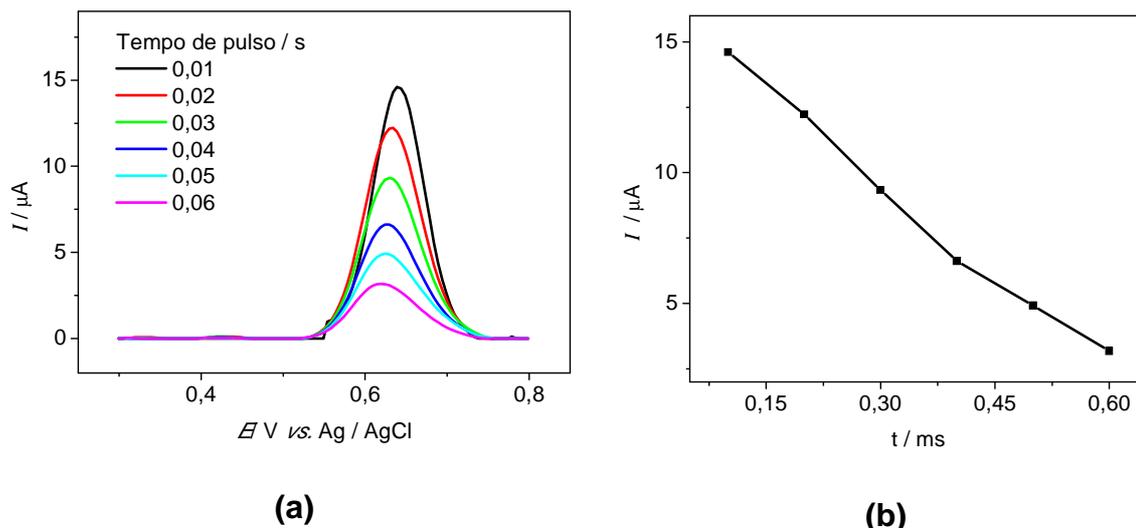


FIGURA 3.33- (a) Voltamogramas obtidos para a variação do tempo de pulso utilizando um GCE-MWCNTs/PAH em presença de carbidopa, (b) Variação dos picos de corrente anódica em função da variação do tempo de pulso. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 70 \text{ mV}$.

Observa-se uma queda dos valores de corrente anódica com a variação do tempo de pulso. A maior corrente anódica é observada no tempo de 0,010 s, sendo então o tempo selecionado para estudos posteriores.

A TABELA 3.16 apresenta os parâmetros estudados, os intervalos utilizados e os valores selecionados para a determinação da carbidopa por DPV.

TABELA 3.16- Parâmetros estudados, intervalos utilizados e valores selecionados para a determinação de carbidopa por DPV

Parâmetros	Intervalos estudados	Valores selecionados
velocidade de varredura de potencial (mV s^{-1})	5 a 20	20
Amplitude de pulso (mV)	10 a 90	70
Tempo de pulso (s)	0,010 a 0,600	0,010

3.5.4- Estudo de interferentes em potencial

Estudos de interferentes em potencial da carbidopa, como o manitol, polivinilpirrolidona (PVP) e amido foram realizados. Essas substâncias são as encontradas como excipientes nos medicamentos adquiridos para análise. As

substâncias avaliadas foram diluídas em solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ todas em uma razão de concentração de 1:10 (analito:interferente). A concentração de carbidopa utilizada foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração dos interferentes foram de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as substâncias investigadas não causaram interferência na determinação de carbidopa nesta razão de concentração.

3.5.5- Curva analítica e aplicação

Após a avaliação das melhores condições de trabalho para o GCE-MWCNTs/PAH, realizaram-se medidas de DPV no intervalo de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) em diferentes concentrações de carbidopa, a fim de se obter uma curva analítica. A FIGURA 3.34 apresenta os resultados obtidos. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 20 V s^{-1} , amplitude de pulso de 70 mV e o tempo de pulso de $0,010 \text{ s}$.

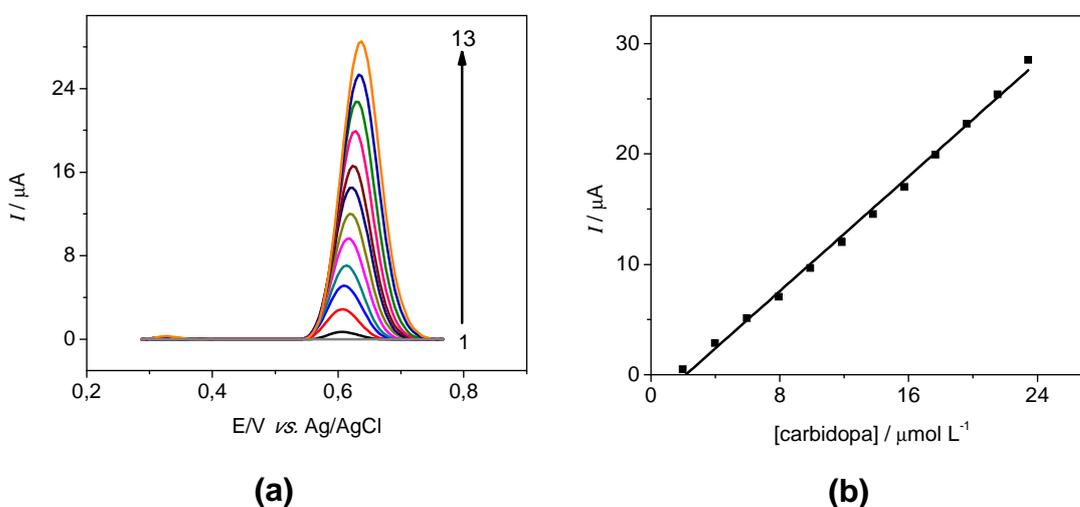


FIGURA 3.34- (a) Voltamogramas de pulsos diferencial obtidos em diferentes concentrações de carbidopa (1) 0; (2) $2,0 \times 10^{-6}$; (3) $3,9 \times 10^{-6}$; (4) $5,9 \times 10^{-6}$; (5) $7,9 \times 10^{-6}$; (6) $9,9 \times 10^{-6}$; (7) $1,1 \times 10^{-5}$; (8) $1,3 \times 10^{-5}$ (9) $1,5 \times 10^{-5}$; (10) $1,7 \times 10^{-5}$; (11) $1,9 \times 10^{-5}$; (12) $2,1 \times 10^{-5}$ e (13) $2,3 \times 10^{-5}$, **(b)** Curva analítica para carbidopa. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 70 \text{ mV}$ e $t = 0,010 \text{ s}$.

O sistema em estudo forneceu uma curva analítica linear no intervalo de $2,0 \times 10^{-6}$ a $2,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $6,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um desvio padrão relativo menor que 1,5 % (n=3) para L-dopa $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A equação obtida foi $I_{pa} (\mu A) = -2,8 + 1,3 \times 10^6 \times [\text{carbidopa}]$.

Em um trabalho realizado por MELO *et al.*⁸⁰ utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em uma resina de poliéster, foi quantificado carbidopa por DPV onde foi obtida uma curva analítica linear em um intervalo de concentração de $3,2 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $3,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. No trabalho realizado por QUINTINO *et al.*¹¹⁴, utilizando um eletrodo de carbono vítreo e por técnica de DPV, foi quantificado carbidopa em um intervalo de $5,0 \times 10^{-7}$ a $5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e obtiveram um limite de detecção de $3,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

A TABELA 3.17 apresenta os resultados encontrados.

TABELA 3.17- Resultados para determinação de cabidopa encontrados na literatura

Eletrodo	Técnica	Intervalo de concentração/mol L ⁻¹	Limite de detecção/mol L ⁻¹	Referência
A	DPV	$3,2 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-6}$	80
B	DPV	$5,0 \times 10^{-7}$ a $5,4 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	114
C	DPV	$2,0 \times 10^{-6}$ a $2,3 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-7}$	Este trabalho

A= eletrodo de pasta de carbono modificado com dióxido de chumbo imobilizado em uma resina de poliéster, B= Eletrodo de carbono vítreo e C= GCE-MWCNTs/PAH.

O método proposto foi aplicado na determinação de carbidopa em amostras farmacêuticas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método oficial⁹⁰. A TABELA 3.18 apresenta os valores para análise de amostra carbidopa.

TABELA 3.18- Determinação de carbidopa em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto e o método oficial⁹⁰

Amostra	Valor rotulado (mg/drágea)	Método proposto	Método de referência	RE _c ²
A	12	12,1 ± 0,2	12,2 ± 0,3	-0,8
B	12	12,1 ± 0,2	12,4 ± 0,3	-2,4
C	12	12,2 ± 0,1	12,1 ± 0,2	0,8
D	12	11,9 ± 0,1	11,9 ± 0,1	0

RE_c² = 100 x (Valor voltamétrico – valor método de referência) / valor método

de referência

Os resultados obtidos empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado e não foi observada uma diferença significativa entre os resultados a um nível de 95%, indicando assim que o método proposto apresenta uma boa exatidão.

3.5.6- Adição e recuperação

Estudos de adição e recuperação da carbidopa foram realizados a fim de se avaliar a influência de possíveis interferentes existentes na amostra sobre o método proposto, obtendo-se uma recuperação em um intervalo de 96,0 a 102%. A TABELA 3.19 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 3.19- Resultados obtidos para o estudo de adição e recuperação da carbidopa em amostras comerciais

Amostras	carbidopa/(μ mol L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação %
A	11,80	11,63 \pm 0,02	98,6
	15,70	15,03 \pm 0,03	98,0
	17,60	17,97 \pm 0,01	102
B	11,80	11,59 \pm 0,05	98,6
	15,70	15,00 \pm 0,07	96,0
	17,60	18,01 \pm 0,04	102
C	11,80	11,65 \pm 0,04	98,6
	15,70	15,02 \pm 0,03	96,0
	17,60	17,97 \pm 0,02	102
D	11,80	11,64 \pm 0,05	98,6
	15,70	15,93 \pm 0,04	96,0
	17,60	17,98 \pm 0,03	102

3.5.7- Estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade

Para este estudo foram utilizados 3 GCE modificados com o filme de MWCNTs/PAH. Foram realizadas 5 medidas de DPV em presença de carbidopa $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) com cada eletrodo em 3 dias consecutivos, obtendo-se um desvio padrão de 0,01 % para repetibilidade e 1,0 % para reprodutibilidade. Foi possível a realização de aproximadamente 57 determinações com um GCE-MWCNTs/PAH.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, verificou-se um bom desempenho do novo sistema sensor GCE modificado com um filme de MWCNTs/PAH para a determinação dos fármacos ciprofibrato, DA, L-dopa e carbidopa utilizando técnicas amperométrica e voltamétricas.

Inicialmente foi avaliada por medidas de potencial ζ a estabilidade da nova dispersão de MWCNTs/PAH utilizada para a modificação do GCE, a qual apresentou uma boa estabilidade nos níveis de concentrações utilizadas. Tal estabilidade pode ser explicada em função das atrações eletrostáticas entre os MWCNTs e o PAH. Já a técnica de casting para a formação de filmes de MWCNTs/PAH, apresentou-se como uma técnica adequada para a modificação de superfícies de eletrodos. Desta maneira os filmes formados foram caracterizados por voltametria cíclica utilizando o hexacianoferrato (III) de potássio como indicador redox. Nesta parte do estudo constatou-se que o filme de PAH não apresenta eletroatividade, sendo assim, um material adequado para a formação de filmes contendo nanotubos de carbono imobilizados e o GCE modificado com filme de MWCNTs apresentou um aumento considerável nos picos de correntes catódica e anódica e também da corrente capacitiva, o que é característico de eletrodos modificados com MWCNTs.

Em seqüência avaliou-se o desempenho deste novo sistema sensor com medidas amperométricas e voltamétricas para a determinação de ciprofibrato, DA, L-dopa e carbidopa. Com os resultados obtidos nas determinações destes fármacos foi observado um bom desempenho do eletrodo durante as medidas, promovendo um efeito eletrocatalítico e um incremento no pico de corrente anódica considerável quando comparado com aquele obtido empregando-se o GCE sem modificação. Comparando os resultados obtidos com os da literatura, pode-se constatar que este novo sistema sensor e as técnicas eletroquímicas utilizadas apresentaram-se adequadas para a determinação destes fármacos e podem ser facilmente empregadas em análises de rotina.

CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram observados possíveis processos redox diferente dos encontrados na literatura para a DA, carbidopa e L-dopa. Desta maneira pretende-se investigar os processos redox de alguns analitos sobre os eletrodos modificados com CNTs e PAH. O primeiro analito que deverá ser estudado é o ciprofibrato, uma vez que não há nenhum estudo relatado na literatura. Outra proposta de trabalho é a utilização deste eletrodo modificado para a determinação voltamétrica simultânea de DA, ácido ascórbico e ácido úrico e de carbidopa e L-dopa.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KOROLKOVAS, A., *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1998.
2. STOYANOVA, A. & TSAKOVA, V., "Copper-modified poly(3-4-ethylenedioxythiophene) layers for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid: I. Role of the polymer layer thickness". *J. Solid State Electr.*, **14**: 1947, 2010.
3. SAFAVI, A.; MALEKI, N.; MORADLOU, O. & TAJABADI, F., "Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid carbon ionic liquid electrode". *Anal. Biochem.*, **359**: 224, 2006.
4. LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **78**: 748, 2009
5. FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O. & VIEIRA, I. C., "Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor". *Talanta*, **55**: 685, 2001.
6. SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need previous alkaline hydrolysis step". *J. Brazil Chem. Soc.*, **20** (2): 360, 2009.
7. ZHANG, W. D.; XU, B.; HONG, Y. X.; YU, Y. X.; YE, J. S. & ZHANG J. Q., "Electrochemical oxidation of salicylic acid at well-aligned multiwalled carbon nanotube electrode and its detection". *J. Solid State Electr.* **14** (9): 1713, 2010.
8. OZKAN, S. A.; USLU, B. & ZUMAN P., "Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrode". *Anal. Chim. Acta*, **501** (2): 227, 2004.
9. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.
10. ZHAO, Q.; GAN, Z. H. & ZHUANG, Q. K., "Electrochemical sensors based on carbon nanotubes". *Electroanal.*, **14** (23): 1609, 2002.
11. LI, J.; KOEHNE, J. E.; CASSEL, A. M.; CHEN, H.; NG, H. T.; YE, Q.; FAN, W. ; HAN, J. & MEYYAPPAN, M., "Inlaid multi-walled carbon nanotube nanoelectrode arrays for electroanalysis". *Electroanal.*, **17** (1): 15, 2005.
12. MOSES, P. R.; WIER, L. & MURRAY, R. W., "Chemically modified tin oxide electrode". *Anal. Chem.*, **47** (12): 1882, 1975.

13. TANIGUCHI, N., On the Basic concept of Nanotechnology, 1974, Proc. ICPB Tokyo.
14. MERKOÇI, A., in: *Biosensing Using Nanomaterials*, Wiley Series in Nanosciences and Nanotechnology, 2009.
15. WILES, P. G. & ABRAHAMSON, J., "Carbon fibre layers on arc electrodes: Their properties and cool-down behaviour". *Carbon*, **16** (5): 341, 1978.
16. KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN; S. C.; CURL, R. F. & SMALLEY, R. E., "C₆₀: Buckminsterfullerene". *Nature*, **318**: 162, 1985.
17. IJIMA, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*, **354**: 56, 1991.
18. de SOUZA-FILHO, A. G. & FAGAN, S. B., "FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO", *Quim. Nova*, **30** (7): 1695, 2007.
19. ODOM, T. W.; HUANG, J. L.; KIM, P. & LIEBER, C. M., "Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes". *Nature*, **391**: 62, 1998.
20. WILDOEW, J. G. W.; VENEMA, L. C.; RINZLER, A. G.; SMALLEY, R. E. & DEKKER, C., " *Nature*, **391**: 59, 1998.
21. RO, A.; RICHTER, E.; BANDOW, S.; CHASE, B.; EKLUND, P. C.; WILLIAMS, K. W.; FANG, S.; SUBBASWAMY, K. R.; MENON, M.; THESS, A.; SMALLEY, R. E.; DRESSELHAUS, G. & DRESSELHAUS, M. S., "Diameter – selective raman scattering from vibrational modes in carbon nanotubes". *Science*, **275** (5297): 187, 1997.
22. SAITO, R.; FUJITA, M.; DRESSELHAUS, G. & DRESSELHAUS, M. S., "Electronic structure of chiral graphene tubules". *Appl. Phys. Lett.*, **60**: 2204, 1992.
23. MINTMIRE, J. W.; DUNLAP, B. I. & WHITE, C. T., "Are fullerene tubules metallic?". *Phys. Rev. Lett.*, **68**: 631, 1992.
24. FU, F.; HUANG, W.; LIN, Y.; ZHANG, D.; HANKS, T. W.; RAO, A. M. & SUN, Y. P., "Functionalization of Carbon Nanotubes with Bovine Serum Albumin in Homogeneous Aqueous Solution". *Nanosci. Nanotechnol.*, **2** (5): 457, 2002.
25. SINNOTT, S. B., "Chemical functionalization of carbon nanotubes". *Nanosci. Nanotechnol.*, **2** (2): 113, 2002.
26. da SILVA, L. B.; FAGAN, S. B. & MOTA, R., "Ab initio study of deformed carbon nanotube sensors for carbon monoxide molecules" *Nano. Lett.*, **4** (1): 65, 2004.
27. LI, J.; LU, Y.; YE, Q.; CINKE, M.; HAN, J. & MEYYAPPAN, M., "Carbon nanotubes sensors for gas and organic vapor detection", *Nano. Lett.*, **3** (7): 929, 2003.

28. KONG, J.; FRANKLIN, N. R.; ZHOU, C.; CHAPLINE, M. G.; PENG, S.; CHO, K. & DAI, H., "Nanotube molecular wire as chemical sensors". *Science*, **287**: 622, 2000.
29. JUNIOR-JAFELICCI, M. & VARANDA, L. C., "O mundo dos colóides". *Quim. Nova na Escola*, **9**: 9, 1999.
30. SUN, Z.; NICOLOSI, V.; RICKARD, D.; BERGIN, S. D.; AHERNE, D. & COLEMAN, J. N., "Quantitative evaluation of surfactant-stabilized single walled carbon nanotubes: Dispersion quality and its correlation with zeta potential". *J. Phys. Chem.*, **112**: 10692, 2008.
31. THESS, A.; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C. ; LEE, Y. H.; KIM, S. G.; RINZLER, A. G.; COLBERT, D. T.; SCUSERIA, G. E.; TOMANEK, D.; FISCHER, J. E. & SMALLEY, R. E., "Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes". *Science*, **273**: 483, 1996.
32. KONG, H.; LUO, P.; GAO C. & YAN, D., "Polyelectrolyte-functionalized multiwalled carbon nanotubes. Preparation, characterization and layer-by-layer self assembly". *Polymer*, **46** (8): 2472, 2005.
33. RAMA, G. V.; KONISHI, T. & ISE, N., "Ordering in poly(allylaminehydrochloride) gels". *Macromolecules*, **32**: 7582, 1999.
34. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S & PARKER, K. L., Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 11^a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006.
35. MASNATTA, L. D.; CUNIBERTI, L. A.; REY, R. H. & WERBA, J. P., "Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr B*, **687**: 437, 1996.
36. HUTTEMANN, H. & BLASCHKE, G., "Achiral and chiral determination of ciprofibrate and its glucoronide in human urine by capillary electrophoresis". *J. Chromatogr B*, **729** (1-2): 33, 1999.
37. ENSAFI, A. A.; TAEI, M. & KHAYAMIAN, T., "A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and acid uric using poly(3-(5-chloro-2-hydroxyphenylazo)-4,5-dihydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **633**: 212, 2009.
38. ZHANG, R.; JIN, G. D.; CHEN D. & HU, X. Y., "Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K)modified glassy carbon electrode". *Sensor and Actuat. B: Chem.*, **138**: 174, 2009.
39. ARDAKANI, M. M.; TALEBI, A.; NAEIMI, H.; BARZOKY, M. N. & TAGHAVINIA, N., "Fabrication of modified TiO₂ nanoparticle carbon paste electrode for simultaneous determination of dopamine, uric acid and L-cysteine". *J. Solid State Electrochem.*, **13**: 1433, 2009.

40. MO, J. W. & OGOREVC, B., "Simultaneous measurement of dopamine and ascorbate at their physiological levels using voltammetric microprobe based on overoxidized poly(1,2-phenylenediamine)-coated carbon fiber", *Anal. Chem.*, **73** (6): 1196, 2001
41. ZHENG, D.; YE, J.; ZHOU, L.; ZHANG, Y. & YU, C., "Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid on ordered mesoporous carbon/Nafion composite film". *J. Electroanal. Chem.*, **625**: 82, 2009.
42. ATTA, N. F.; EL-KADY, F. M & GALAL, A., "Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using Poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensor". *Anal. Biochem.*, **400**: 78, 2010.
43. OTHAMAN, A. M.; RIZKA, N. M. H. & EL-SHAHAWI, M. S., "Potentiometric determination of dopamine in pharmaceutical preparations by crown ether-pvc membrane sensors". *Anal. Sciences*, **20**: 651, 2004.
44. LIU, J.; WANG, Z. H.; LUO, G. A.; LI, Q. W. & SUN H. W., "The interaction of dna with dopamine by spectroscopic and electrochemical methods". *Anal. Sciences*, **18**: 751, 2002.
45. LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S., de OLIVEIRA, A. B.; BECK, J. & KUBOTA, L. T., "Development of a sensor on tetracyanoethylene (LiTCNE)/poly-L-lysine for dopamine determination". *Electrochim. Acta*, **50** (13): 2675, 2005.
46. NAGARAJA, P.; MURTHY, K. C.; RANGAPPA, K. S. & GOWDA, N. M. M., "Spectrophotometric methods for the determination of certain catecholamine derivatives in pharmaceutical preparations". *Talanta*, **46**: 39, 1998.
47. GUAN, C. L.; OUYANG, J.; LI, Q. L., LIU, B. H. & BAEYENS, W. R. G., "Simultaneous determination of catecholamines by ion chromatography with direct conductivity detection". *Talanta*. **50**: 1197, 2000.
48. LI, B.; ZHANG, Z. & JIN, Y., "Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling". *Biosens. Bioelectron.*, **17**: 585, 2002.
49. HOWS, M. E. P.; LECROIX, L.; HEIDBREDE, C. & ORGAN, A. J., "High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological sample". *J. Neurosci. Meth.*, **138** (1-2): 123, 2004.
50. SABBIONI, C.; SARACINO, M. A.; MANDRIOLI, R.; PINZAUTI, S.; FURLANETO, S.; GERRA, G. & RAGGI, M. A., "Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma: Comparison of amperometric and coulometric detection". *J. Chromatogr. A*, **1032**: 65, 2004.

51. KUMARATHASAN, P. & VICENT, R., "New approach to the simultaneous analysis of catecholamines and tyrosines in biological fluids". *J. Chromatogr. A*, **987** (1-2), 349, 2003.
52. ZHANG, S.; XU, Q.; ZHANG, W.; JIN, L. & JIN, J. Y., "In vivo monitoring of the monoamine neurotransmitters in rat brain using microdialysis sampling with liquid chromatography electrochemical detection". *Anal. Chim. Acta*, **427** (1): 45, 2001.
53. PETERSON, Z. D., COLLINS, D. C.; BOWERBANK, C. R., LEE, M. L. & GRAVES, S. W., "Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time-offlight mass spectrometry". *J. Chromatogr. B*, **776** (2): 221, 2002.
54. SALEN, F. B., "Spectrophotometric and titrimetric determination of catecholamines". *Talanta*, **34** (9): 810, 1987.
55. IMAI, K., "Fluorimetric assay of dopamine, norepinephrine and their 3-o-methyl metabolites by using fluorecamine". *J. Chromatogr. A*, **105** (1): 135, 1975.
56. RICEBERG, L. J.; VAN VUNAKIS, H. & LEVINE L., "Radioimmunoassays of 3,4,5-trimethoxyphenethylamine (mescaline) and 2,5-dimethoxy-4-methylphenyl-isopropylamine (DOM)". *Anal. Biochem.*, **60** (2): 551, 1974.
57. ERLANGER, B. F., "Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies". *Pharmacol. Rev.*, **25** (2): 271, 1973.
58. SEKI, T. & WADA, H., "Chromatographic separation of catecholamines on weakly acidic ion-exchange resin". *J. Chromatogr. A.*, **114** (1): 227, 1975.
59. ANJO, D. M.; KAHR, M.; KHODABAKHSH, M. M.; NOWINSKI, S. & WAGNER, M., "Electrochemical activation of carbon electrodes in base: Minimization of dopamine adsorption and electrode capacitance". *Anal. Chem.*, **61**: 2603, 1989
60. ZHANG, Y.; LI, B. & CHEN, X., "Simple and sensitive detection of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using gold nanoparticles as colorimetric probes". *Microchim. Acta*, **168**: 107, 2010.
61. SILVA, L. I. B.; FERREIRA, F. D. P.; FREITAS, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. & DUARTE, A. C., "Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human and plasma". *Talanta*, **80**: 853, 2009.
62. ZHAO, X. E. & SUO, Y. R., "Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification". *Talanta*, **76**: 690, 2008.
63. MUZZI, C.; BERTOCCI, E.; TERZUOLI, L.; PORCELLI, B.; CIARI, I.; PAGANI, R. & GUERRANTI, R., "Simultaneous determination of serum concentrations of

- levodopa, dopamine, 3-O-metildopa and α -methyldopa by HPLC*". *Biomed Pharmacother*, **62**, 253, 2008.
64. LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*)". *Quim. Nova*, **26** (2): 197, 2003.
65. CARUSO, C. S.; VIEIRA, I. C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Determination of Epinephrine and Dopamine in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Carbon Paste Modified with Crude Extract of Cara Root (*Dioscorea bulbifera*)". *Anal. Lett.*, **32** (1): 39, 1999.
66. VIEIRA, I. & FILHO-FATIBELLO, O., "Spectrophotometric determination of methyldopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source". *Talanta*, **46**: 559, 1998.
67. CANNAZZA, G.; DI STEFANO, A.; MOSCIATTI, B.; BRAGHIROLI, D.; BARALDI, M.; PINNEN, F.; SOZIO, P.; BENATTI, C. & PARENTI, C., "Detecion of levodopa, dopamine and its metaboites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-DOPA produrugs by mean of hplc-ec". *J. Pharmaceut. Biomed.*, **36** (5): 1079, 2005.
68. COELHO, J.; MASPOCH, S & VILEGAS, N., "Simultaneous kinetic spectrophotometric determinaton of levodopa and benserazide by bi- and thre-way partial least square calibration". *Talanta*, **53** (3): 627, 2000.
69. NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A. & SUNITHA, K. R., "A new sensitive and selective spectrophotometric method for determination of catechol derivates and its pharmaceutical preparations". *J. Pharmaceut. Biomed.*, **25** (3-4): 417, 2001.
70. DOSHI, P. S. & EDWARDS, D. J., "Effects of L-dopa on dopamine norepinephrine concentrations ion rat brain assessed y gas chromatography". *J. Chromatogr A.*, **210** (3): 505, 1981.
71. DEFTEREOS, N. T.; CALOKERINOS, A. C. & EFSTATHIOU, C. E., "Flow-injection chemiluminometric determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and L-dopa". *Analyst*, **118** (6): 627, 1993.
72. FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I., "Flow injection spectrophotmetric determination of L-dopa and carbidopa in pharmaceutizal formulations using a crude extract of sweet potato root [*Ipomoea batatas* (L) Lam] as enzymatic source. *Analyst*, **122** (4): 345, 2997.
73. MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; TEIXEIRA, M. F. S.; PEREIRA, A. V. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow injection determiantion of levodopa in tablets using a solid-phase reactor containing lead(IV) dioxide immobilized". *J. Pharmaceut. Biomed.*, **25** (3-4): 393, 2001.

74. YAN, X. X.; PANG, D. W.; LU, Z. X.; LÜ, J. Q. & TONG, H., "Electrochemical behavior of L-dopa at single wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **569**: 47, 2004.
75. WU, G., "The determination of levodopa in plasma by hplc: a Cautionary note". *Chromatographia*, **52**: 371, 2000.
76. KIM, W. H.; KARIM, M. M. & LEE, S. K., "Simultaneous determination of levodopa and carbidopa by synchronous fluorescence spectrometry using double scans". *Anal. Chim. Acta*, **619**: 2, 2008.
77. KHANMOHAMMADI, M.; MOBEDI, E.; GARMARUDI, A. B.; MOBEDI, H. & KARGOSHA, K., "Simultaneous determination of levodopa and carbidopa in levodopa-carbidopa tablets by ATR-FTIR Spectrometry". *Pharm. Dev. Technol.*, **62**: 253, 2008.
78. MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A. & MOHAMMADNEJAD, M., "Simultaneous spectrofluorimetric determination of levodopa and propranolol in urine using feed-forward neural networks assisted by principal component analysis". *Talanta*, **78**: 1051, 2009.
79. ZHAO, S.; BAI, W.; WANG, B. & HE, M., "Determination of levodopa by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection". *Talanta*, **73**: 142, 2007.
80. MELO, H. C.; SELEGHIM, A. P. D.; POLITO, W. L.; FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I. C., "Simultaneous differential pulse voltammetric determination of L-dopa and carbidopa in pharmaceutical using a carbon paste electrode modified with lead dioxide immobilized in a polyester resin". *J. Braz. Chem. Soc.*, **18** (4): 797, 2007.
81. SAGAR, K. A. & SMYTH, M. R., "Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC". *J. Pharmaceut. Biomed.*, **22**: 613, 2000.
82. MOFFAT, A. C., *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, Pharmaceutical Press, London, 1986.
83. TALEBPOUR, Z.; HAGHGOO, S. & SHAMSIPUR, M., "¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methyl-dopa in human serum and pharmaceutical formulations". *Anal. Chim. Acta*, **506**: 97, 2004.
84. ZHANG, L.; CHEN, G.; HU, Q. & FANG, Y., "Separation and determination of levodopa and carbidopa in composite tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **43**: 287, 2001.
85. LI, J.; HE, W. D.; YANG, L. P.; SUN, X. L., HUA, Q. "Preparation of multi-walled carbon nanotubes grafted with synthetic poly(L-lysine) through surface-initiated ring-opening polymerization". *Polymer*, **48** (15): 4352, 2007.

86. KIM, B. & SIGMUND, W. M., "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir*, **20**: 8239, 2004.
87. KIM, Y. S.; CHO, J. H.; ANSARI, S. G.; KIM, H. I.; DAR, M. A.; SEO, H. K.; KIM, G. S.; LEE, D. S.; KHANG, G. & SHIN, H. S., "Immobilization of avidin on the functionalized carbon nanotubes". *Synthetic Met.*, **156** (14-15): 938.
88. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A., "Laser-probe-based investigation of the evolutions of particle size distributions of calcium oxalates particles formed in artificial urines". *J.Cryst. Growth*, **233**: 367, 2001.
89. *Farmacopéia Brasileira*, 3^a ed., Organização Andrei Editora: São Paulo, 1977, 656.
90. *European Pharmacopeia*, 3rd ed., Strasbourg, 1997.
91. JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; CAMPANA-FILHO, S. P.; FARIA, R. C. & FATIBELLO FILHO, O. "Anodic Stripping Voltammetric Determination of Copper(II) using a Functionalized Carbon Nanotubes Paste Electrode modified with crosslinked chitosan". *Sensors and Actuat. B-Cheml.*, **142**: 260, 2009.
92. BHATIA, S. R., KHATTAK, S. F., ROBERTS, S. C., "Polyelectrolites for cell encapsulation". *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **10**: 45, 2005.
93. IAMSAMAI, C. HANNONGBUA, S.; RUKTANONCHAI, U.; SOOTTITANTAWAT, S. & DUBAS, S. T., "The effect of degree of deacetylation of chitosan on its dispersion of carbon nanotubes". *Carbon*, **48**: 25, 2003.
94. ZHENG, I. & SONG, J. F., "Nickel(II)-baicalein complex modified multiwall carbon nanotube paste electrode and its electrocatalytic oxidation toward glycine" *Anal. Biochem.*, **391** (1): 56, 2009.
95. PRODROMIDS, M. I., VELTSISTAS, P. G. AND KARAYANNIS, M. I., "Electrochemical study of chmeally modified and screen-printed graphite electrodes with [Sb^VO(CHL)₂]HEX. Application for the selective determination of sulfide". *Anal. Chem.*, **72** (17); 3995, 2000.
96. SCHRÖPER, S.; BRUGGEMANN, D.; MOURZINA, Y.; WOLFRUM, B.; OFFENHASSER, A. & MAYER, D., *Electrochim. Acta*. "Analyzing the electroactive surface of gold nanopillars by electrochemical methods for electrodes miniaturization", **53**: 6265, 2008.
97. GHICA, M. E.; PAULIUKAITE, R.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C. M. A., "Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors". *Sensor Actuat B-Chem*, **142**: 308, 2009.
98. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C. M. A., "Comparative study of different cross-linking agents for immobilization of functionalised carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode". *Anal. Chem.*, **81** (13): 5364, 2009.

99. CHRISTIAN, G. D., *Analytical Chemistry*. 5th ed. New York, John Wiley & Sons, 1994.
100. ALOTHMAN, Z. A.; BUKHARI, N.; WABAIDUR, S. M. & HAIDER, S., "Simultaneous electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode". *Sensor Actuat B-Chem*, **146**: 314, 2010.
101. RAZEI, B.; MEGHDADI, S. & REZAZADEH, M., "Electrocatalytic determination of dopamine in pharmaceutical and human serum samples by using [N,N'-bis(2-pyridine carboxamido)-1,2-benzene] nickel (II) carbon paste electrode". *J. Anal. Chem.*, **64** (5): 513, 2009.
102. FORZANI, E. S.; RIVAS, G. A. & SOLÍS, V.M., "Amperometric determination of dopamine on vegetal-tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity". *J. Electroanal. Chem.*, **435**: 77, 1997.
103. FORZANI, E.S; RIVAS, G. A. & SOLIS, V. M., "Amperometric determination of dopamine on an enzymatically modified carbon paste electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **382**: 33, 1995.
104. ZHU, S.; LI, H.; NIU, W. & XU, G., "Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode". *Biosens. Bioelectron.*, **25**: 940, 25.
105. DA SILVA, R. P.; LIMA, A. W. O. & SERRANO, S. H. P., "Simultaneous voltametric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution". *Ana.l Chim. Acta*, **612**: 89, 2008.
106. HUANG, J.; LIU, Y.; HOU, H. & YOU, T., "Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode". *Biosens. Bioelectron.*, **24**: 632, 2008.
107. LI, F.; CHAI, J.; YANG, H.; HAN, D & NIU, L., "Synthesis of Pt/ionic liquid/graphene nanocomposite and its simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine". *Talanta*, **81**: 1063, 2010.
108. BEZERRA, V. S.; LIMA-FILHO, J. L.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; ARAÚJO, A. N. & DA SILVA, V. L., "Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp". *J. Pharmaceut. Biomed.*, **33**: 1025, 2003.
109. LIU, X.; ZHANG, A.; CHENG, G. & DONG, S., "Spectroelectrochemical and voltammetric studies of L-dopa". *Electroanal.*, **15** (2): 103, 2003.
110. SHAHROKHIAN, S. & ASADIAN, E., "Electrochemical determination of L-dopa in the presence of ascorbic acid on the surface of glassy carbon electrode

modified by a bilayer of multi-walled carbon nanotube and poly-pyrrole doped with tiron". *J. Electroanal. Chem.*, **636**: 40, 2009.

111. TEIXEIRA, M. F. S.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O.; DOCKAL, E. R. & BERGAMINI, M. F., "An electrochemical sensor for L-dopa based on oxovanadium-selen thin film electrode applied flow injection system". *Sensor Actuat B-Chem*, **122**: 549, 2007.
112. HU, G.; CHEN, L.; GUO, Y.; WANG, X. & SHAO, S., "Selective determination of L-dopa in the presence of uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticle self-assembled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode". *Electrochim. Acta*, **55**: 4711, 2010.
113. TEIXEIRA, M. F. S.; BERGAMINI, M. F.; MARQUES, C. M. P & BOCCHI, N., "Voltammetric determination of L-dopa using na electrode modified with trinuclear ruthenium ammine complex (Ru-red) supported on Y-type zeolite". *Talanta*, **63**: 1083, 2004.
114. QUINTINO, M. S. M.; MIYUKI, Y. & ANGNES, L., "Voltammetric studies and determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical products". *Electroanal.*, **18** (7): 655, 2006.