

**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
PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALITOS DE INTERESSE
FARMACÊUTICO**

Geiser Gabriel de Oliveira*

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

* bolsista CNPq

**São Carlos - SP
2013**

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

O48de

Oliveira, Geiser Gabriel de.

Desenvolvimento de eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono para a determinação de analitos de interesse farmacêutico / Geiser Gabriel de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
106 f.

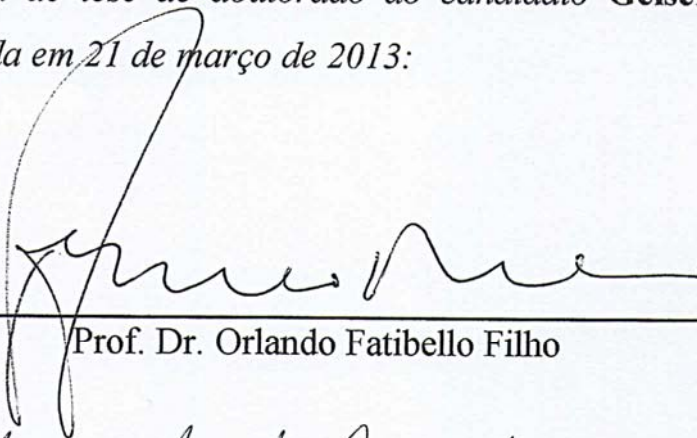
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química analítica. 2. Nanotubos de carbono. 3. DHP. 4. PAH. 5. Voltametria adsortiva. 6. Efeito eletrocatalítico. I. Título.

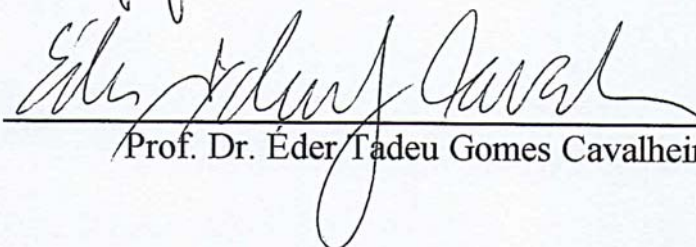
CDD: 543 (20^a)

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

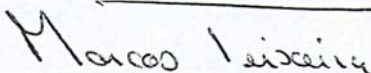
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato Geiser Gabriel de Oliveira, realizada em 21 de março de 2013:



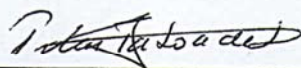
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



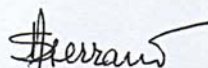
Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro



Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira



Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor



Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano

Dedico este trabalho aos meus pais, Rogério e Inês.

Aos meus irmãos, Apolo e Heber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

- *A Deus por me dar força e sabedoria nos momentos difíceis;*
- Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela força, orientação e discussão profissional;
- À minha mãe Inês, meu pai Rogério, meus irmãos Apolo e o Heber, pelo apoio, amor e carinho;
- À minha amiga-irmã que vive me atormentando com os problemas básicos de computador, Bruna C. Lourenção, mas que está sempre disposta a ajudar;
- Ao Bruno C. Janegitz pela força e companheirismo, mas tem um defeito enorme, é corinthiano;
- Aos meus amigos Avaré, Dileiny, Garça, Kallyni Irikura, Marcão, Roberta e ao meu primeiro melhor amigo, Prof. Dr. Humberto e o meu terceiro melhor amigo o Cyber, agradeço a todos vocês pela amizade e companheirismo;
- Ao Professor Dr. Ronaldo Censi Faria;
- À Professora Dra Élen pela discussão dos trabalhos e pela amizade;
- Ao pessoal do LABBES: Lilo, Livinha, Luzia, Amanda, Osmundo, Elson, Vagner e Thiago, pela convivência e animação nas horas do café e do trabalho, além dos conselhos e discussões científicas que me ajudaram no aprendizado.
- E as recentes amigadas que tive o privilégio de fazer, Mariele, Cássia, Jorge, Jussara, Fred, Loriz e Patricia.
- Aos amigos que já partiram de São Carlos, Prof. Dr. Oldair Donizetti Leite, Prof. Dr Herberth Vieira, Fernanda Salami e Dra. Larissa Canaes.
- Aos funcionários do Departamento de Química, em especial, às secretárias da Pós-Graduação: Ariane, Lu e Cristina pela atenção e colaboração.
- À todos aqueles, que tive o privilégio de conhecer e conviver durante estes anos de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Muitíssimo Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

CNTs	Nanotubos de Carbono – Carbon Nanotubes
CV	Voltametria Cíclica – Cyclic Voltammetry
DHP	Dihexadecil Hidrogenofosfato
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial - Differential Pulse Voltammetry
DPAAdSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução (“Catódica ou Anódica”) por Pulso Diferencial - Differential Pulse Adsorptive (Cathodic (DPAAdCSV) or Anodic (DPAAdASV)) Stripping Voltammetry
GC	Carbono vítreo - Glassy Carbon
LD	Limite de Detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTX	Metotrexato
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas – Multi-Walled Carbon Nanotubes
PAH	Hidrocloreto de Poli(alilamina)
PROP	Propranolol
PTU	Propiltiouracil
RSD	Desvio padrão relativo
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Parede Simples - Single-Walled Carbon Nanotubes
SWV	Voltametria de Onda Quadrada - Square Wave Voltammetry
SWAdSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução (“Catódica ou Anódica”) por Onda Quadrada - Square Wave Adsorptive (Cathodic (SWAdCSV) or Anodic (SWAdASV)) Stripping Voltammetry
VPM	Verapamil

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Parâmetros investigados na voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV) e os valores selecionados para a determinação de MTX	43
TABELA 4.2 – Parâmetros investigados na voltametria de pulso diferencial (DPAdASV) e os valores selecionados para a determinação de MTX	43
TABELA 4.3 – Resultados obtidos para diferentes técnicas voltamétricas para a quantificação do MTX.....	45
TABELA 4.4 – Comparação do desempenho analítico obtido neste trabalho com aquele obtido em diversos métodos propostos na literatura	46
TABELA 4.5 – Desvio padrão relativo para as medidas de repetibilidade inter e intra dias na determinação de MTX nas concentrações de $2,5 \times 10^{-7}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹	47
TABELA 4.6 - Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de MTX.....	47
TABELA 4.7 - Resultados obtidos na determinação de MTX em amostras comerciais para o método proposto e método comparativo	48
TABELA 4.8 – Estudo do potencial e tempo de acumulação	57
TABELA 4.9 – Comparação de diferentes eletrodos e/ou técnicas voltamétricas utilizadas na determinação do PTU.....	63
TABELA 4.10 – Determinação de PTU em formulações farmacêuticas utilizando-se o método voltamétrico proposto com o eletrodo MWCNTs-PAH/GC, e método preconizado pela Farmacopéia Britânica ⁶⁸	64
TABELA 4.11 – Porcentagens obtidas no estudo de adição e recuperação para soluções de PTU $7,50 \times 10^{-6}$ e $30,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	65

TABELA 4.12 – Parâmetros investigados da técnica SWAdASV e os valores selecionados para a determinação de PROP	72
TABELA 4.13 – Parâmetros investigados da técnica DPAdASV e os valores selecionados para a determinação de PROP	72
TABELA 4.14 – Resultados obtidos para diferentes técnicas voltamétricas para a quantificação do PROP	73
TABELA 4.15 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos com diferentes eletrodos e/ou técnicas voltamétricas para a determinação de PROP	74
TABELA 4.16 - Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de PROP	75
TABELA 4.17 - Resultados obtidos na determinação de PROP em amostras comerciais para o método proposto e método da Farmacopéia Brasileira ⁸⁴	76
TABELA 4.18 – Parâmetros otimizados para a técnica de SWAdASV	82
TABELA 4.19 – Parâmetros otimizados para DPAdASV.	83
TABELA 4.20 – Comparação do desempenho analítico obtido neste trabalho com aquele obtido em diversos métodos propostos na literatura	84
TABELA 4.21 – Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de VPM.....	86
TABELA 4.22 – Determinação de VPM em formulações farmacêuticas pelo método proposto usando MWCNTs-PAH/GC, e pelo método preconizado pela Farmacopéia Brasileira ⁸⁴	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Diagrama ilustrando a formação do nanotubo de carbono a partir da folha de grafeno.	2
FIGURA 1.2 – Representação esquemática das principais formas de nanotubos de carbono: (A) MWCNTs e (B) SWCNTs.	3
FIGURA 1.3 – Esquema da representação dos vetores unitários (a_1) e (a_2), vetor quiral (Ch) e vetor de translação (T) sobre uma folha de grafeno.	4
FIGURA 1.4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de quiralidade dos nanotubos. (A) <i>armchair</i> (B) <i>zigzag</i> (C) quiral ⁷	4
FIGURA 1.5 – Esquema do método de produção de CNTs por arco de descarga elétrica. Uma voltagem de 30 V é aplicada entre dois eletrodos de grafite produzindo uma descarga elétrica em uma atmosfera inerte de hélio ou argônio sob pressão reduzida.....	6
FIGURA 1.6 – Esquema para obtenção de CNTs por ablação a laser. O feixe de laser vaporiza o material (mistura de grafite e catalisador) num tubo horizontal em atmosfera de gás inerte, sob uma pressão controlada e a temperatura em 1200 °C. Os nanotubos são depositados sobre um tubo refrigerado do lado de fora do forno ..	6
FIGURA 1.7 – Esquema para reator de deposição química (CVD).....	7
FIGURA 1.8 – Representação da incorporação dos grupos funcionais nos CNTs, pelo tratamento químico com ácidos ¹⁹	8
FIGURA 1.9 – (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível forma polimerizada do DHP após evaporação do solvente.	9
FIGURA 1.10 – Estrutura monomérica do polietrólito PAH.	9
FIGURA 1.11 – Estrutura molecular do Metotrexato (MTX).	11
FIGURA 1.12 – Mecanismo proposto por GAO <i>et al.</i> ⁵⁵ , para a oxidação do MTX. ...	12

FIGURA 1.13 – Estrutura molecular PTU.....	14
FIGURA 1.14 – Fórmula estrutural do propranolol.....	16
FIGURA 1.15 – Fórmula estrutural do Verapamil.....	19
FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de: (a) 10; (b) 20; (c) 30; (d) 40; (e) 50; (f) 75 e (g) 100 mV s^{-1} , utilizando os eletrodos de GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C). Inserções: relação da corrente de pico com a velocidade de varredura elevado a raiz quadrada, empregada para calcular a área ativa dos eletrodos GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C).....	30
FIGURA 4.2 – Voltamogramas obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de: (a) 10; (b) 20; (c) 30; (d) 40; (e) 50; (f) 75 e (g) 100 mV s^{-1} , utilizando os eletrodos de GC (A) PAH/GC (B) e MWCNTs-PAH/GC (C). Inserções: relação da corrente de pico com a velocidade de varredura de potenciais elevado a meio, empregada para calcular a área ativa dos eletrodos GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C).....	33
FIGURA 4.3 – Imagens de MEV dos filmes: DHP (A) e MWCNTs-DHP (B), imagens obtidas da tese de doutorado do Bruno C. Janegitz ¹¹⁰	35
FIGURA 4.4 – Imagens de MEV dos filmes: PAH (A) e MWCNTs-PAH (B).....	36
FIGURA 4.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir da oxidação de MTX $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 com velocidade de varredura 50 mV s^{-1} com o eletrodo de MWCNTs-DHP/GC, 1º(—) e 2º (—) ciclo.....	37
FIGURA 4.6 – Comparação entre os eletrodos GC (—), DHP/G-C (—) e MWCNTs-DHP/GC (—), em eletrólito suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0); tempo de agitação de 180 s, no processo de oxidação do MTX ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	39

- FIGURA 4.7 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o MTX ($f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) em diferentes eletrólitos suporte, e (B) diferentes concentrações de H_2SO_4 para uma concentração de MTX de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$40
- FIGURA 4.8 - (A) Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) para a oxidação de MTX em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação do pico de corrente com o tempo de pré-concentração.....41
- FIGURA 4.9 – Voltamogramas obtidos para diferentes proporções de DHP com os MWCNTs na formação do filme de MWCNTs-DHP/GC.....42
- FIGURA 4.10 – (A) Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada para o MTX ($f = 20 \text{ s}^{-1}$; $a = 35 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, branco (A); e nas concentrações de $0,1$ (B); $0,5$ (C); $1,0$ (D); $2,5$ (E); $5,0$ (F); $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX (G). (B) Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o MTX ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 70 \text{ mV}$; $t = 20 \text{ mV}$) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, branco (A); e nas concentrações de $0,05$ (B); $0,075$ (C); $0,10$ (D); $0,25$ (E); $0,5$ (F); $0,75$ (G); $1,0$ (H); $2,5$ (I); $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX(J).44
- FIGURA 4.11 – Curvas analíticas obtidas para o MTX em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (A) por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e (B) voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.....44
- FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos nas velocidades de varredura de potencial de (A) $0,01$; (B) $0,03$; (C) $0,03$; (D) $0,04$; (E) $0,05$; (F) $0,07$; (G) $0,10$; (H) $0,15$ e (I) $0,20$, (J) $0,25$, (L) $0,30 \text{ V s}^{-1}$ em eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e concentração de MTX na cela de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$49
- FIGURA 4.13 – (A) Dependência linear da corrente com a velocidade de varredura utilizando a MWCNTs-DHP/GC para MTX $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades, (B) Relação de $\log I$ por $\log \nu$50
- FIGURA 4.14 – Dependência E vs. $\ln \nu$ para MTX $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$51

- FIGURA 4.15 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma concentração de PTU $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em solução tampão BR (pH 2,0) para os eletrodos de carbono vítreo recobertos com 20 μL das dispersões contendo MWCNTs:PAH: 1:0,5 m/m; 1:1 m/m e 1:2 m/m em 1 mL de água deionizada.....53
- FIGURA 4.16 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de PTU de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte tampão BR pH 2,0 a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , para os eletrodos (a,-) GC, (b,-) PAH/GC e (c,-) MWCNTs-PAH/GC.54
- FIGURA 4.17 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em uma solução tampão BR (pH 2,0) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , empregando-se o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC: 1° ao 4° ciclo.55
- FIGURA 4.18 – Voltamogramas cíclicos da redução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em tampão BR (pH 2,0) velocidade de varredura 50 mV s^{-1} : (a,—) Branco, (b,—) sem pré concentração, (c,—) com pré concentração em potencial de 0,90 V por 30 s.....56
- FIGURA 4.19 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a redução do produto formado na oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em uma solução tampão BR pH 2,0, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} :(A) estudo do potencial de acumulação e (B) estudo do tempo de acumulação.57
- FIGURA 4.20 – Voltamogramas cíclicos em diferentes eletrólitos suporte: (a) tampão BR pH 2,0; (b) ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (c) de tampão fosfato pH 7,0; tampão acetato pH 4,0, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} $E_{pc} = 1,0 \text{ V}$ e $t_{pc} = 60 \text{ s}$58
- FIGURA 4.21 – Voltamogramas obtidos para a redução do produto gerado na oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU, aplicando-se um potencial de pré-concentração de 1,0 V durante 60 s, utilizando as técnicas de redissolução catódica: voltametria de onda quadrada (A), voltametria de pulso diferencial (B) e linear (C). 59
- FIGURA 4.22 – Voltamogramas Adsorptivos de Redissolução Catódica (Ad CSV) para o produto formado na oxidação do PTU em tampão BR (pH 2,0 L^{-1}) nas velocidades de varredura de potencial de (a) 0,020, (b) 0,040, (c) 0,060, (d) 0,080, (e) 0,100, (f)

0,150, (g) 0,200, (h) 250, (i) 0,300, (j) 0,350 e (l) 0,400 $V s^{-1}$. Inserido: relação da corrente de pico catódica com a variação da velocidade de varredura.....60

FIGURA 4.23 – (A) Dependência linear de I com v , e (B) dependência linear de $\log I$ com o $\log v$ utilizando o MWCNTs-PAH/GC para PTU $1,0 \times 10^{-3} L^{-1}$ em solução tampão BR (pH 2,0).61

FIGURA 4.24 – Voltamogramas Adsorptivos de Redissolução Catódica (Ad CSV) obtidos usando o eletrodo MWCNTs-PAH/GC para: (1) 5,0, (2) 6,0, (3) 6,9 (4); 7,9; (5) 8,9 (6); 9,9 (7); 14,8; (8) 19,6; (9) 29,0; (10) 38,0; (11) 48,0 (12); $58,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ de PTU em solução tampão BR (pH 2,0), velocidade de varredura de $200 mV s^{-1}$. Inserido: curva analítica.62

FIGURA 4.25 – Relação do potencial de oxidação em função de $\ln v$, para uma concentração de $1,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ de PTU em tampão BR (pH 2,0).....67

FIGURA 4.26 – Mecanismo de reação para a oxidação e redução do PTU.68

FIGURA 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de PROP $1,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 mol L^{-1}$, $v = 50 mV s^{-1}$ empregando-se os eletrodos com e sem modificação da superfície: GC(—), PAH/GC (—) e MWCNTs-PAH/GC (—) modificado.69

Figura 4.28 – (A) Voltamogramas cíclicos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ PROP em ácido sulfúrico $0,1 mol L^{-1}$ com velocidade de varredura de $50 mV s^{-1}$ em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação da magnitude do sinal analítico com o tempo de pré-concentração.....70

FIGURA 4.29 – (A) Voltamogramas obtidos para o PROP $1,0 \times 10^{-4} mol L^{-1}$, $v = 50 mV s^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, (B) diferentes concentrações de solução de H_2SO_471

FIGURA 4.30 – (A) Voltamogramas obtidos para a técnica SWAdASV para o PROP em $H_2SO_4 0,25 mol L^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,10; (c) 0,25; (d) 0,50; (e) 0,75; (f) 1,00; (g) $1,50 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ de PROP. (B) Voltamogramas obtidos para a técnica de DPAdASV para o PROP em $H_2SO_4 0,25 mol L^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,075; (c) 0,100; (d) 0,175; (e) 0,250; (f) 0,380; (g) 0,500; (h)

0,630, (i) 0,750 e (j) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de PROP. Inseridos nos gráficos a relação da concentração com a corrente de pico.73

FIGURA 4.31 – (A) Voltamogramas cíclicos nas velocidades de (a) 10, (b) 50, (c) 100, (d) 150; (e) 175; (f) 200; (g) 250 e (h) 300 mV s^{-1} em ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e concentração de PROP de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (B) a relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura.....77

FIGURA 4.32 – Dependência linear de E com o $\ln v$, utilizando a o eletrodo MWCNTs-PAH/GC para uma concentração de PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$78

FIGURA 4.33 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} com tempo de agitação inicial de 120 s, para os eletrodos GC (—), PAH/GC (—) e MWCNTs-PAH/GC (—). os diferentes eletrodos80

FIGURA 4.34 – Voltamogramas de cíclicos para o VPM $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} em diferentes eletrólitos suporte, (B) voltamogramas obtido em diferentes concentrações de ácido sulfúrico.81

FIGURA 4.35 – (A) Voltamogramas obtidos para a oxidação de VPM em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação do pico de corrente com o tempo de pré-concentração82

FIGURA 4.36 – A) Voltamogramas obtidos para a técnica de SWAdASV para o VPM em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,005; (c) 0,010; (d) 0,030; (e) 0,050; (f) 0,075; (g) $0,100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM. (B) Voltamogramas obtidos para a técnica de DPAdASV para o VPM em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,025; (c) 0,050; (d) 0,075; (e) 0,10; (f) $0,12 \times 10^{-6}$ (g) $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM.....83

FIGURA 4.37 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial de (A) 0,01; (B) 0,03; (C) 0,05; (D) 0,07; (E) 0,10; (F) 0,15 e (G) $0,20 \text{ V s}^{-1}$ para uma solução de VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$88

FIGURA 4.38 – (A) Dependência linear da corrente com a velocidade de varredura utilizando a MWCNTs-PAH/GC para VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades, (B) Relação de $\log I$ por $\log \nu$.
.....88

FIGURA 4.39 – Dependência de E vs $\ln \nu$ para VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$89

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE CARBONO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALITOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de metotrexato (MTX), propiltiouracil (PTU), propranolol (PROP) e verapamil (VPM) em formulações farmacêuticas. Nestes métodos foi empregado um eletrodo de carbono vítreo (GC) modificado com filme dihexadecil hidrogênofosfato (DHP) ou hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH), contendo, imobilizados, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) tratados quimicamente. Inicialmente verificou-se o comportamento eletroquímico desses eletrodos modificados empregando-se voltametria cíclica, em diferentes velocidades de varredura, para uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Aplicando-se a equação de Randles-Sevcik, observa-se um aumento da área ativa para os eletrodos MWCNTs-DHP/GC e MWCNTs-PAH/GC de 1,5 e 3,1 vezes respectivamente quando comparado com o eletrodo de GC. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e voltametria linear foram estudados e otimizados para cada analito e selecionada a melhor técnica para o desenvolvimento do método analítico. No método desenvolvido para a determinação de MTX em formulações farmacêuticas, utilizou-se o eletrodo de GC modificado com MWCNTs e DHP (MWCNTs-DHP/GC), empregando-se a Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Pulso Diferencial (DPAdASV), após a otimização das condições experimentais. A curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentração de MTX de $5,0 \times 10^{-8}$ a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção (LD) igual a $1,2 \times 10^{-8}$. O MTX foi quantificado em amostras comerciais e os resultados comparados com um método de HPLC, sendo que os erros relativos variaram de -4,0 e 4,0 %. O segundo método analítico desenvolvido foi para a determinação de PTU em formulações farmacêuticas, utilizando como eletrodo o GC modificado com MWCNTs e PAH (MWCNTs-PAH/GC). A técnica eletroanalítica selecionada foi a Voltametria Linear Adsorptiva de Redissolução (LSAdCSV), após a otimização das condições experimentais. A curva analítica obtida foi linear para o PTU nas concentrações de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com LD igual a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O PTU foi

quantificado em amostras comerciais, os resultados comparados com método preconizado pela Farmacopéia Britânica e os erros relativos obtidos ficaram entre -1,0 e 2,0 %. O terceiro método analítico desenvolvido foi para a determinação de PROP em formulações farmacêuticas, utilizando como eletrodo o MWCNTs-PAH/GC, sendo a técnica selecionada a DPAdASV. A curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentração do PROP de $7,5 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LD igual a $6,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O PROP foi quantificado em amostras comerciais e os resultados comparados com o método proposto pela Farmacopéia Brasileira. Os erros relativos obtidos ficaram entre -2,5 e 1,2 %. Na sequência, o quarto método desenvolvido foi para a determinação de VPM em formulações farmacêuticas, utilizando como eletrodo o MWCNTs-PAH/GC, sendo a técnica selecionada a voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV). A curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentrações de VPM de $5,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com um LD igual a $3,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O VPM foi quantificado em amostras farmacêuticas e os resultados comparados com os resultados obtidos empregando o método espectrofotométrico preconizado pela Farmacopéia Brasileira.

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF MODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODES WITH CARBON NANOTUBES FOR DETERMINATION OF ANALYTES OF PHARMACEUTICAL INTEREST**

In this work, the development of electroanalytical methods for the determination of methotrexate (MTX), propylthiouracil (PTU), propranolol (PROP) and verapamil (VPM) in pharmaceutical formulations is described. In these methods it was employed a glassy carbon electrode (GC) modified with dihexadecyl hydrogenphosphate (DHP) or polyallylamine hydrochloride (PAH) film containing immobilized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Initially, the electrochemical behavior of each modified electrode was studied by cyclic voltammetry at different scan rates for a 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ potassium hexacyanoferrate (III) in 0.1 mol L⁻¹ potassium chloride solution. Applying the Randles-Sevcik equation, it was observed an increase of the active area of MWCNTs-DHP/GC and MWCNTs-PAH/GC electrodes of 1.5 and 3.1 times respectively in comparison with the GC electrode. The square wave voltammetry, differential pulse voltammetry and linear sweep voltammetry parameters were studied and optimized for each analyte and then it was selected the best technique for the development of the analytical method. In the developed method for MTX determination in pharmaceutical formulations, it was used the GC electrode modified with MWCNTs and DHP (MWCNTs-DHP/GC), employing differential pulse adsorptive anodic stripping voltammetry (DPAdASV) technique after the optimization of experimental conditions. The analytical curve obtained was linear in the MTX concentration range from 5.0×10^{-8} to 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, with a limit of detection (LOD) of 1.2×10^{-8} . The MTX was quantified in commercial samples and the results compared with an HPLC method, and the relative errors ranged from -4.0 to 4.0%. An analytical method for determination of PTU in pharmaceutical formulations was also developed using a modified GC electrode with MWCNTs within a PAH film (MWCNTs-PAH/GC) and linear sweep adsorptive cathodic stripping voltammetry (LSAdCSV). After the optimization of experimental conditions, the analytical curve was linear in the PTU concentration range from 5.0×10^{-6} to 5.8×10^{-5} mol L⁻¹, with a LOD equal to 1.0×10^{-6} mol L⁻¹. The PTU was quantified in commercial samples and the results were compared with those results obtained using the British Pharmacopoeia method. The relative errors obtained were between -1.0 and 2.0%.

Using DPAdASV technique and a MWCNTs-PAH/GC electrode, PROP was determined in pharmaceutical formulations. The analytical curve was linear in the concentrations range from 7.5×10^{-8} to 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ PROP, with LOD equal to 6.3×10^{-8} mol L⁻¹ and the results were in close agreement with those obtained using the Brazilian Pharmacopoeia method at a confidence level of 95 %. The relative standard deviation ranged from 2.5 and 1.2%.

Finally, as a fourth electroanalytical method, a square wave adsorptive anodic stripping voltammetry (SWAdASV) was proposed for determination of VPM in pharmaceutical formulations using a MWCNTs-PAH/GC electrode. The analytical curve was linear over the VPM concentration range 5.0×10^{-9} - 1.0×10^{-7} mol L⁻¹, with an LOD of 3.6×10^{-9} mol L⁻¹. The VPM was quantified in pharmaceutical samples and the results compared with results obtained using the method of the Brazilian Pharmacopoeia.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Nanotubos de Carbono	2
1.2	Síntese de Nanotubos de Carbono	5
1.3	Funcionalização dos CNTS	7
1.4	Dihexadecil Hidrogenofosfato (DHP)	8
1.5	Hidrocloroeto de Polialilamina (PAH)	9
1.6	Analitos Estudados Nesta Tese	10
1.6.1	Metotrexato (MTX)	10
1.6.2	Propiltiouracil (PTU)	14
1.6.3	Propranolol (PROP) e Verapamil (VPM)	16
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	22
3	PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1	Instrumentação	24
3.2	Reagentes	24
3.3	Soluções Estoque	25
3.4	Tratamento dos MWCNTs	25
3.5	Limpeza dos Eletrodos de Carbono Vítreo (GC)	26
3.6	Preparação do Filme MWCNTs-DHP/GC	26
3.7	Preparação do Filme MWCNTs-PAH/GC	26
3.8	Célula Eletroquímica	26
3.9	Amostras	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Estudo da área eletroativa do eletrodo de GC, DHP/GC e MWCNTs-DHP/GC	29
4.2	Estudo da área eletroativa do eletrodo de GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC	32
4.2.1	Caracterização dos filmes por MEV	34
4.3	Determinação de Metotrexato (MTX)	37
4.3.1	Estudo do comportamento voltamétrico do MTX	37
4.3.2	Estudo do Eletrólito Suporte	39
4.3.3	Tempo de Pré-Concentração	40
4.3.4	Estudo da proporção de DHP no filme	41
4.3.5	Otimização dos Parâmetros Voltamétricos para a Determinação de MTX	42
4.3.6	Curvas Analíticas	43
4.3.7	Estudo da Repetibilidade	47

4.3.8	Estudo de Adição e Recuperação	47
4.3.9	Análises das amostras	48
4.3.10	Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos do MTX	49
4.4	Determinação de Propiltiouracil (PTU).....	52
4.4.1	Efeito da Concentração de PAH.....	52
4.4.2	Estudo do Comportamento Voltamétrico do PTU.....	53
4.4.3	Efeito do Potencial e Tempo de Pré-Concentração.....	56
4.4.4	Eletrólito Suporte e Efeito do pH	57
4.4.5	Escolha da Técnica Voltamétrica	58
4.4.6	Estudo da Influência da Velocidade de Varredura de Potencial	60
4.4.7	Curva Analítica	62
4.4.8	Aplicação do Método Proposto na Determinação de PTU em Formulações Farmacêuticas	64
4.4.9	Estudo de Adição e recuperação e interferentes.....	64
4.4.10	Estudo da Repetibilidade.....	65
4.4.11	Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos para o PTU	66
4.5	Determinação de Propranolol (PROP).....	68
4.5.1	Estudo do Comportamento Voltamétrico do PROP	68
4.5.2	Tempo de Pré-Concentração	69
4.5.3	Estudo do Eletrólito Suporte.....	70
4.5.4	Otimização dos Parâmetros Voltamétricos para a Determinação de PROP. 71	
4.5.5	Curvas Analíticas.....	72
4.5.6	Estudo da Repetibilidade.....	75
4.5.7	Estudo de Adição e Recuperação	75
4.5.8	Análises das amostras	76
4.5.9	Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos do PROP	77
4.6	Determinação de VERAPAMIL (VPM).....	79
4.6.1	Estudo do Comportamento Voltamétrico do VPM	79
4.6.2	Estudo do Eletrólito Suporte.....	80
4.6.3	Tempo de Pré-Concentração	81
4.6.4	Estudo dos Parâmetros Voltamétricos para Determinação do VPM	82
4.6.5	Curvas Analíticas.....	83
4.6.6	Estudo da Repetibilidade.....	85
4.6.7	Estudo de Adição e Recuperação	85

4.6.8	Aplicação do Método Proposto na Determinação de VPM em Formulações Farmacêuticas	86
4.6.9	Estudo Eletroquímico para VPM.....	87
5	CONCLUSÃO	92
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotubos de Carbono

A primeira concepção sobre nanotubos de carbono (do inglês Carbon Nanotubes, CNTs) surgiu em 1991 com o trabalho de Iijima¹, porém a primeira citação das fibras de carbono com 4 nm de diâmetro aparece no trabalho de Peter Wiles e John Abrahamson da Universidade de Canterbury em Christchurch, Nova Zelândia em 1978². Em 1993, em trabalhos independentes de Iijima e colaboradores³, no Japão e, Bethune e colaboradores⁴, nos EUA, publicaram simultaneamente a síntese dos nanotubos de carbono de paredes simples.

Uma forma simples de se imaginar como os nanotubos de carbono são formados, seria como se uma ou várias folhas de grafeno fossem enroladas em forma cilíndrica formando uma cavidade interna oca, como ilustrado na FIGURA 1.1.

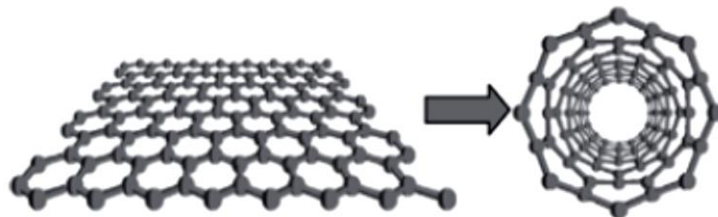


FIGURA 1.1 – Diagrama ilustrando a formação do nanotubo de carbono a partir da folha de grafeno.

Como se sabe, os nanotubos de carbono já são sintetizados como tal e, o contrário seria verdadeiro, uma folha de grafeno seria formada se o CNT pudesse ser cortado. Os nanotubos de carbono são classificados em relação ao número de camadas. A FIGURA 1.2 apresenta as duas principais formas de nanotubos de carbono, a saber: nanotubos de carbono de paredes múltiplas (“Multi-Walled Carbon Nanotubes - MWCNTs”) (A) que são vários nanotubos de carbono concêntricos separados entre si por uma distância de alguns ou frações de nanômetros (nm) e com diâmetros que variam entre 2 e 100 nm^{1,5}, e os nanotubos de carbono de paredes simples (“Single-Walled Carbon Nanotubes - SWCNTs”) (B) que consistem em uma única folha de grafeno enrolada entre si (um nanotubo) e possui diâmetros de 1 a 2 nm^{3,4}.

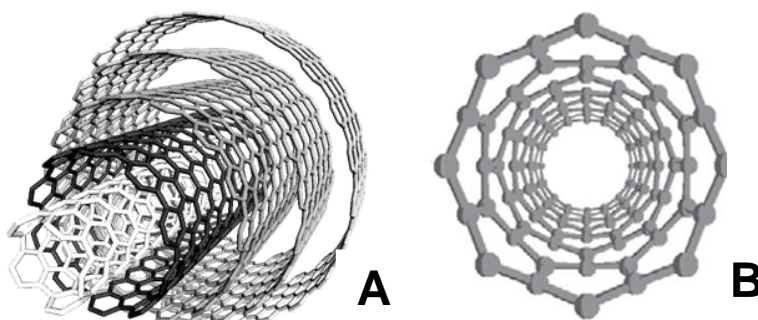


FIGURA 1.2 – Representação esquemática das principais formas de nanotubos de carbono: (A) MWCNTs e (B) SWCNTs.

A pequena dimensão dos CNTs lhe confere propriedades únicas e vantagens importantes para seu uso em eletroanálises. Propriedades como, aumento da sua área superficial, resistência mecânica, alta condutividade térmica e elétrica, além de apresentar comportamento eletrônico de semicondutor ou condutor com facilidade para promover a transferência de elétrons diminuindo o sobrepotencial de trabalho possibilitando assim a sua aplicação em eletroanalítica⁶.

Os CNTs podem apresentar propriedades metálicas ou de semicondutores, dependendo da sua estrutura. Para explicar a estrutura de um nanotubo de carbono, faz-se uma analogia com uma folha de grafeno, FIGURA 1.3, enrolada na forma de um cilindro, mais não de forma aleatória. Define-se então um vetor quiral (\vec{C}_h), e é este vetor que caracteriza nanotubo de carbono. O vetor quiral pode ser definido em função de duas componentes, chamados de vetores unitários da rede hexagonal \vec{a}_1 e \vec{a}_2 e n , m são números inteiros, como são apresentados na FIGURA 1.3. Sendo assim, pode-se definir o vetor quiral da seguinte maneira:

$$\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2.$$

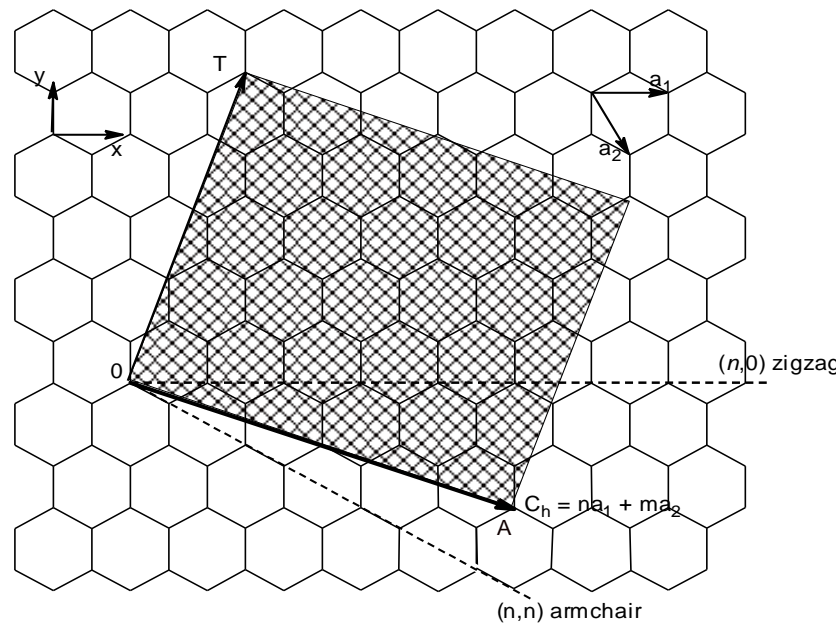


FIGURA 1.3 – Esquema da representação dos vetores unitários (\vec{a}_1) e (\vec{a}_2), vetor quiral (\vec{C}_h) e vetor de translação (\vec{T}) sobre uma folha de grafeno.

Os CNTs podem ser classificados com relação à quiralidade, e para isto basta conhecer os números inteiros n e m . Os CNTs podem apresentar três arranjos distintos, cujos nomes são, *armchair* ($m = 0$), *zig zag* ($n = m$) e *quiral* ($n \neq m$), a FIGURA 1.4. As três formas apresentam propriedades diferentes de condução elétrica. Em função destes índices, os CNTs apresentam propriedades metálicas quando n e m são múltiplos de três, caso contrário, ele será considerado um semicondutor.

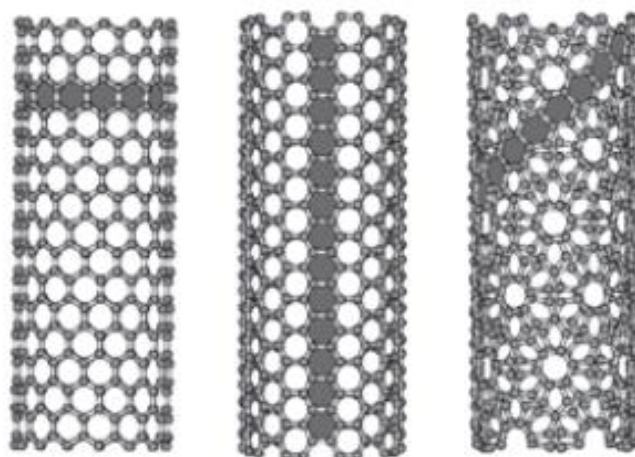


FIGURA 1.4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de quiralidade dos nanotubos. (A) *armchair* (B) *zigzag* (C) *quiral*⁷.

Destes três tipos de CNTs, o que apresenta o comportamento metálico é o *armchair* (cadeira), todos os demais apresentam caráter de semicondutor o que faz com que a condutividade elétrica nos CNTs seja do tipo balístico, ou seja, os elétrons não se chocam com os átomos da rede, como ocorre com outros tipos de condutores eletrônicos⁷⁻⁹.

1.2 Síntese de Nanotubos de Carbono

Os métodos que são mais empregados para a síntese de nanotubos de carbono são: arco de descarga elétrica, ablação a laser (vaporização a laser) e deposição química em fase vapor (CVD)^{1,10-14}.

Um dos primeiros métodos utilizados para a produção de nanotubos de carbono foi a descarga por arco elétrico, sendo esse método utilizado por Iijima¹ em 1991 para a produção de nanotubos de carbono. Esta técnica pode sintetizar tanto MWCNTs quanto SWCNTs separadamente. Atualmente esse método, FIGURA 1.5, consiste na geração de um arco elétrico entre dois eletrodos de grafite (cátodo cerca de 8-12 mm e um ânodo de 6-8 mm), separados cerca de 1 mm sob uma atmosfera inerte de hélio ou argônio e sob pressão reduzida. Ocorre a passagem de corrente entre 50 e 120 A sobre um potencial de aproximadamente 30 V gerando um plasma de alta temperatura (> 3000°C) entre os eletrodos. Nestas condições experimentais o carbono sublima e condensa rapidamente na forma de CNTs.

Trabalhos na literatura^{10,11} relatam que para a produção de SWCNTs é utilizada uma mistura de grafite com metais ou a combinação entre eles como cobalto (Co), níquel (Ni), ferro (Fe) e ítrio (Y) e a combinação mais eficiente para a produção de SWCNTs é a mistura de metais de Co/Y e Ni/Y.

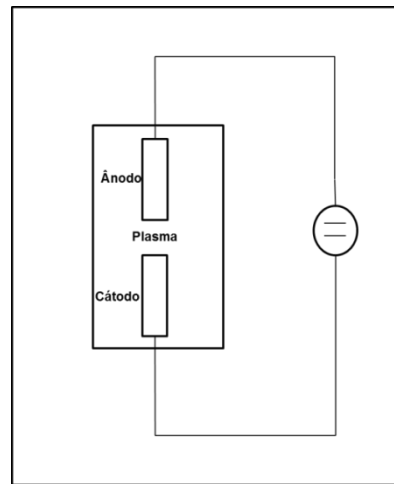


FIGURA 1.5 – Esquema do método de produção de CNTs por arco de descarga elétrica. Uma voltagem de 30 V é aplicada entre dois eletrodos de grafite produzindo uma descarga elétrica em uma atmosfera inerte de hélio ou argônio sob pressão reduzida.

Outro método para obtenção de CNTs é por ablação a laser, FIGURA 1.6, que consiste na vaporização do material de grafite, que está localizado em um tubo de quartzo a elevadas temperaturas. Após a vaporização este material é resfriado por um gás inerte, como hélio ou argônio, e recolhido no interior do equipamento. Para se obter os SWCNTs, o material de carbono é dopado com metais de transição como o Fe e Co.^{12,13}

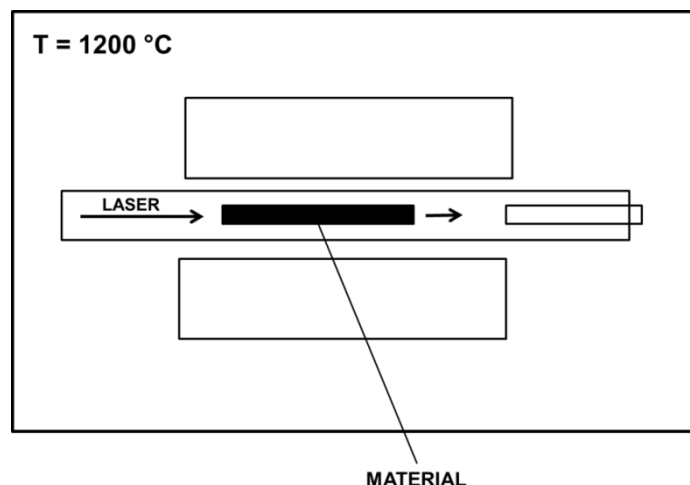


FIGURA 1.6 – Esquema para obtenção de CNTs por ablação a laser. O feixe de laser vaporiza o material (mistura de grafite e catalisador) num tubo horizontal em atmosfera de gás inerte, sob uma pressão controlada e a temperatura em 1200 °C. Os nanotubos são depositados sobre um tubo refrigerado do lado de fora do forno

A síntese de nanotubos de carbono pelo método de deposição química por vapor (CVD), FIGURA 1.7, envolve a reação de decomposição de um vapor ou gás precursor contendo átomos de carbono, na presença de um substrato metálico em atmosfera inerte, utiliza-se como substrato preparado uma camada de partículas metálicas catalíticas (Ni, Co, Fe ou mistura de metais), e esse substrato sofre um aquecimento entre 500 e 1100 °C. Dentro do reator dois gases são misturados: hidrogênio, nitrogênio ou amônia e um gás precursor (metano, etileno ou acetileno). Nestas condições, os gases precursores reagem, rompendo as ligações covalentes e os átomos liberados seguem para as bordas das partículas metálicas, onde os nanotubos são crescidos¹⁴.

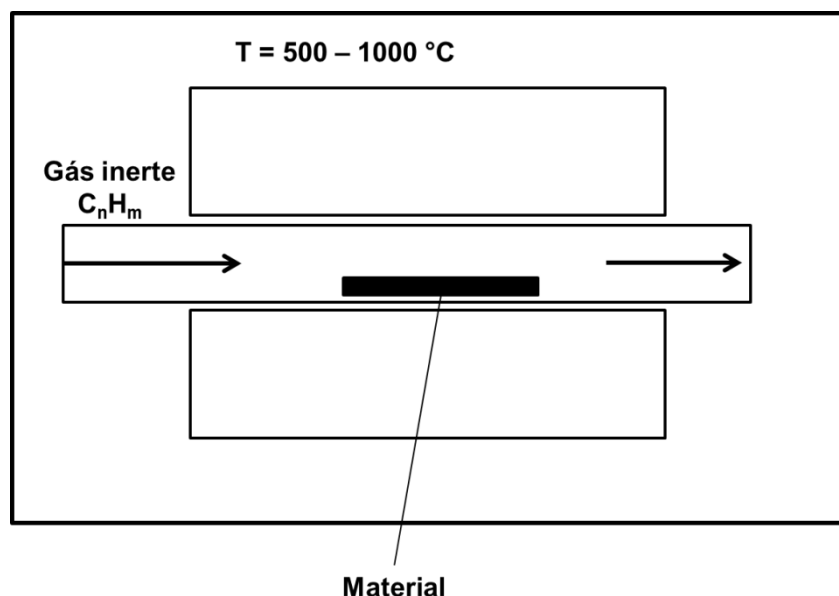


FIGURA 1.7 – Esquema para reator de deposição química (CVD)

1.3 Funcionalização dos CNTS

A funcionalização de CNTs por ácidos oxidantes concentrados é amplamente utilizada para modificar a superfície dos CNTs. Os principais procedimentos empregados utilizam ácidos como ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico ou suas misturas, que provocam modificações na estrutura dos CNTs. Estas modificações tem como finalidade a abertura das extremidades dos CNTs, aumento dos defeitos na estrutura e a incorporação de grupos funcionais oxigenados como ácido carboxílico, álcool, hidroxila, nitro e cetona¹⁵⁻¹⁸, FIGURA 1.8, na estrutura dos CNTs, além de eliminar impurezas de metais remanescentes

dos processos de síntese dos CNTs. Este tipo de funcionalização é conhecido como modificação covalente.

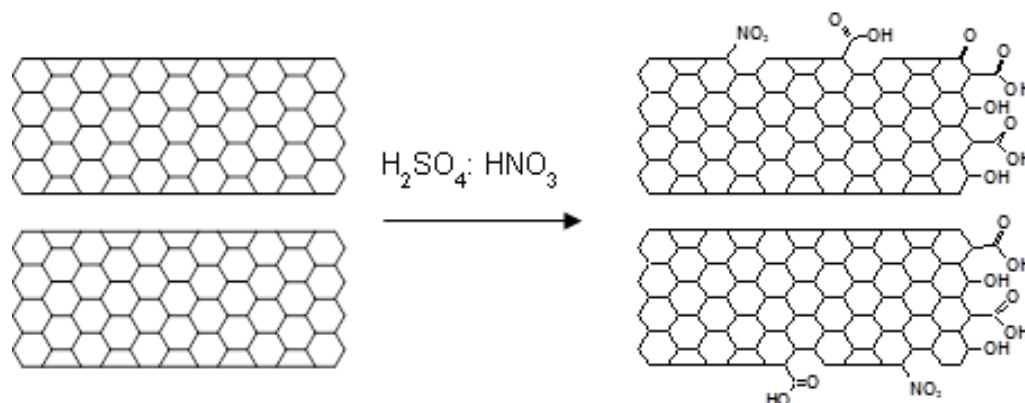


FIGURA 1.8 – Representação da incorporação dos grupos funcionais nos CNTs, pelo tratamento químico com ácidos¹⁹.

1.4 Dihexadecil Hidrogenofosfato (DHP)

O dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) é um surfactante^{20,21} que apresenta em sua estrutura grupos fosfatados, FIGURA 1.9 (A), o que lhe confere a característica aniônica^{22,23}. Quando disperso em água, em uma concentração adequada, formam estruturas automontadas²⁴ e sobre a superfície do eletrodo, formam uma película estável após a evaporação da água, provavelmente, pela polimerização deste composto por meio da formação de ligações de hidrogênio dos grupos fosfato, como é apresentado na FIGURA 1.9 (B)²⁵

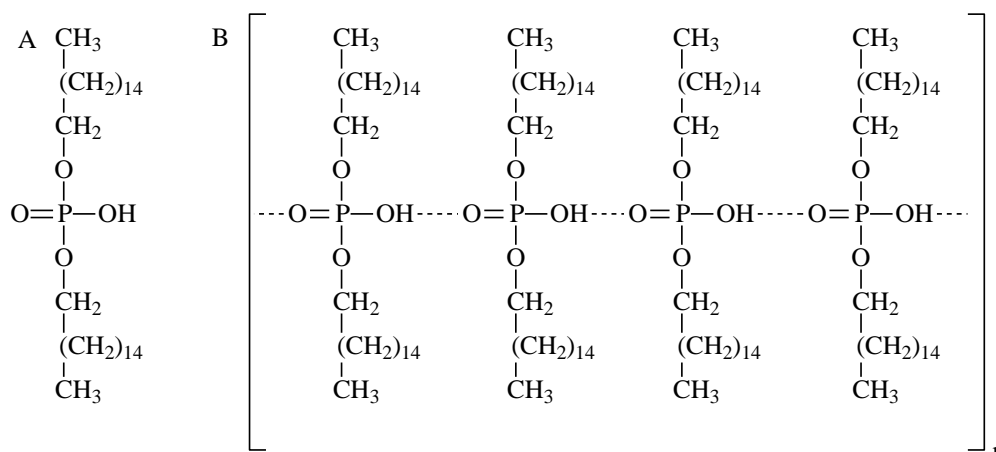


FIGURA 1.9 – (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível forma polimerizada do DHP após evaporação do solvente.

1.5 Hidrocloreto de Polialilamina (PAH)

Hidrocloreto de polialilamina (PAH), FIGURA 1.10, é um polieletrólito preparado pela polimerização da alilamina formando macromoléculas de cadeia longa, quando dissolvido em solventes polares e apresenta em sua estrutura partes hidrofílicas (grupos amino (-NH₂)) e partes hidrofóbicas (cadeia carbônica). O PAH possui um pKa no intervalo 8 a 9,^{26,27} em elevados valores de pH uma pequena fração dos grupos -NH₂ estão protonados e em valores baixo de pH há uma aumento da densidade de carga positiva em consequência do aumento da protonação dos grupos aminos (-NH₃⁺).

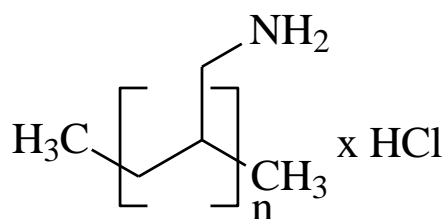


FIGURA 1.10 – Estrutura monomérica do polieletrólito PAH.

PAH pode ser utilizado em combinação com outros polieletrólitos, no caso aniônicos, para se obter diferentes tipos de sensores por meio da técnica de montagem de camada por camada²⁸⁻³⁰. Este polieletrólito forma dispersões estáveis em soluções aquosas com nanotubos de carbono,^{31,32} o que permite a modificação das superfícies de eletrodos para diferentes interesses³³⁻³⁵.

1.6 Analitos Estudados Nesta Tese

Neste trabalho foram estudados diferentes tipos de princípio ativos encontrados em fármacos como: metotrexato utilizado no tratamento de cancer, propiltiouracil para o tratamento de hipertiroidismo, propranolol e verapamil para o tratamento da hipertensão, sendo muito importante o controle rápido e seguro da qualidade desses fármacos, uma vez que adulterações de suas composições ou mesmo falta do princípio ativo, podem trazer grandes riscos à saúde dos pacientes.

1.6.1 Metotrexato (MTX)

A neoplasia, definição atual de câncer, refere-se a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos³⁶. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, gerando tumores malignos que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.

As drogas quimioterápicas ou antineoplásicas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química e em relação à sua função em nível celular.

A classificação em relação à estrutura química se divide em seis grupos, são eles ³⁶⁻³⁸:

- Alquilantes, que causam alterações nas cadeias do DNA impedindo sua replicação.
- Antimetabólitos são estruturalmente semelhantes aos metabólitos naturais e esse tipo de droga é capaz de “enganar a célula”, incorporando-se a ela, impedindo a produção das enzimas necessárias.
- Antibióticos antitumorais que atuam interferindo na síntese dos ácidos nucleicos impedindo a duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA.
- Nitrosuréis possuem características parecidas com os agentes alquilantes, porém, são lipossolúveis o que facilita a passagem pela barreira hematoliquórica (mecanismo fisiológico regulador que impede ou dificulta a passagem de substâncias do sangue para o liquor) sendo indicadas para o tratamento de tumores primários.
- Derivados vegetais (alcalóides da vinca, taxanos, campotecinas) ou inibidores mitóticos, são drogas do ciclo celular específicas e a maioria afeta

especificamente a atuação sobre as células em fase de mitose, é uma classe de droga pouco compreendida.

A quimioterapia antineoplásica faz uso de agentes químicos isolados ou em combinação no tratamento de tumores malignos com objetivo de impedir o crescimento desordenado destas células .

O metotrexato (ácido 4-amino-10-metilfolico (MTX)), é um agente antimetabólito antineoplásico, FIGURA 1.11, utilizado especialmente no tratamento de câncer, mas também pode ser usado para o tratamento de outras doenças como artrite reumatóide, leucemia infantil aguda e psoríase. Essa droga é semelhante a um metabólito natural, o ácido fólico, que age no organismo inibindo a conversão do ácido fólico em ácido tetra-hidrofólico, este ácido é indispensável à síntese de timinas e purinas, que são essenciais à síntese do DNA, possuindo também ação imunossupressora.

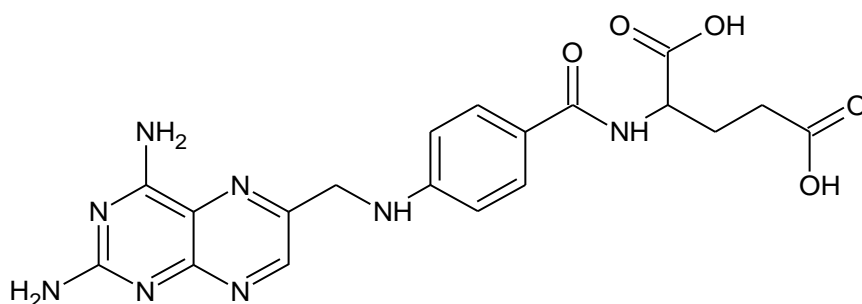


FIGURA 1.11 – Estrutura molecular do Metotrexato (MTX).

O MTX atua de forma não específica no organismo, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo, maior susceptibilidade às infecções. Outros efeitos colaterais mais graves também são constatados como, anemia, cefaléia, convulsão, hepatotoxicidade, insuficiência renal, toxicidade pulmonar, e até morte.

Diferentes métodos para a detecção e quantificação de MTX são descritos na literatura, tais como, espectrofotometria³⁹⁻⁴¹, fluorometria^{42,43}, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)⁴⁴⁻⁵⁰, métodos polarográficos⁵¹⁻⁵⁴ e voltamétricos⁵⁵⁻⁵⁸. Porém, algumas dessas técnicas apresentam algumas desvantagens como, não apresentam boa sensibilidade em baixas concentrações do analito, possuem complicados e ou demorados métodos de pré-concentração das

amostras, apresentam consumo elevado de reagentes e ou baixa frequência de amostragem.

SELESOVSK *et al.*⁵⁴ modificaram a superfície do eletrodo sólido de prata com mercúrio formando uma amálgama (AgSAE). A preparação deste eletrodo se dá pela imersão do eletrodo de prata em mercúrio líquido durante 15 s. Após o preparo do eletrodo, foram estudados os parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial (“Differential Pulse Voltammetry - DPV”) e a curva obtida foi linear de $5,5 \times 10^{-8}$ a $5,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $1,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

GAO *et al.*⁵⁵ estudaram o mecanismo de oxidação do MTX sobre o eletrodo de carbono vítreo (GC) e quantificaram esse analito em formulações farmacêuticas empregando a técnica de voltametria de onda quadrada (“Square Wave Voltammetry – SWV”). A curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentrações desse princípio ativo de $8,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e com limite de detecção de $3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Os autores propuseram um mecanismo para a oxidação do MTX. Nesse mecanismo, a oxidação do MTX ocorre no grupo imina do anel

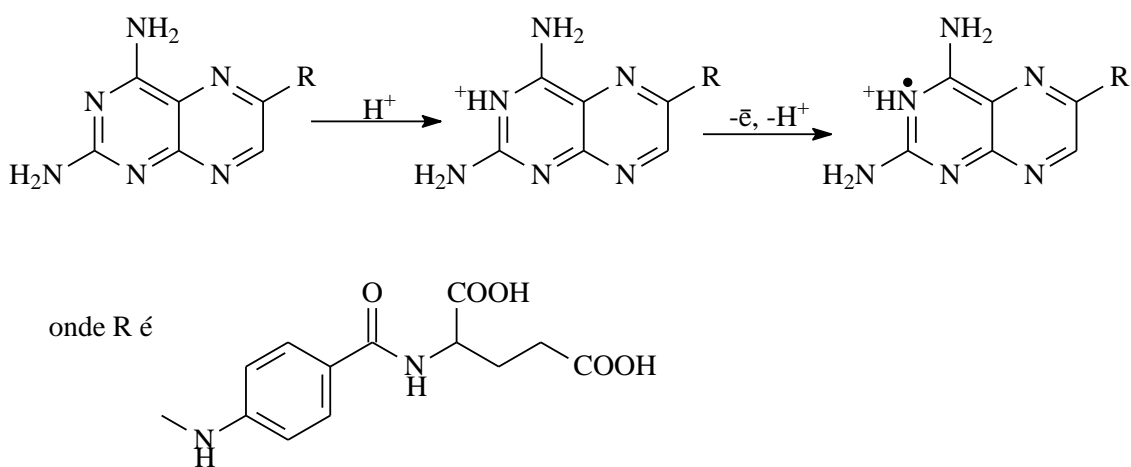


FIGURA 1.12.

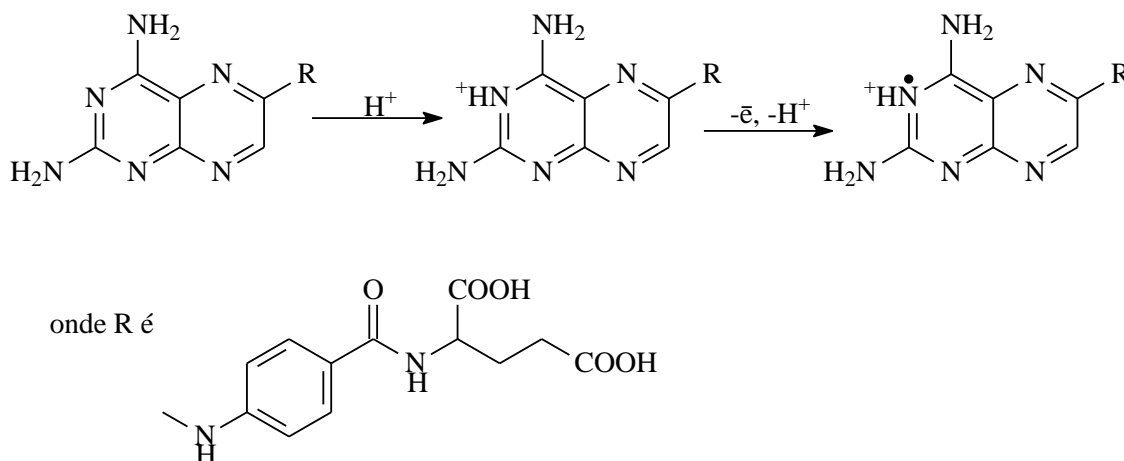


FIGURA 1.12 – Mecanismo proposto por GAO *et al.*⁵⁵, para a oxidação do MTX.

Um sensor com L-cisteína e nanopartículas de ouro sobre o eletrodo de carbono vítreo foi desenvolvido por WANG *et al.*⁵⁶ para a determinação de MTX em formulações farmacêuticas e soro humano. O eletrodo de carbono vítreo foi ciclado em uma faixa de potencial de 1,5 a 2,4 V, em uma solução de L-cisteína de concentração de 0,1 mol L⁻¹, modificando assim a superfície do eletrodo de carbono vítreo com L-cisteína (LC/GC). Em seguida, este foi então enxaguado com água deionizada e imerso por 6 horas sob uma temperatura de 4 ° C em uma solução coloidal de nanopartículas de ouro formando um novo eletrodo chamado de nano-Au/LC/GC. O eletrodo modificado foi utilizado para determinação de MTX utilizando a técnica de SWV em eletrólito suporte (tampão BR pH 2,0) com um tempo de acumulação de 210 s. A curva analítica obtida apresentou uma faixa linear de concentração para esse analito de 4,0 × 10⁻⁸ a 2,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹, com o limite de detecção de 1,0 × 10⁻⁸ mol L⁻¹.

WANG *et al.*⁵⁷ desenvolveram um biossensor com DNA para determinação de MTX em formulações farmacêuticas. Os autores inicialmente fizeram um tratamento no eletrodo de GC aplicando um potencial de +1,75 V por 300 s em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH 5,0. Em seguida, o potencial do eletrodo foi ciclado em uma janela de potencial de 0,30 a 1,125 V a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. As moléculas de DNA foram imobilizadas na superfície deste eletrodo utilizando solventes orgânicos como octadecilamina (ODA) e clorofórmio. A técnica utilizada para a determinação de MTX foi a SWV com um tempo de pré-concentração de 300 s em um potencial de acumulação de 0,65 V, sendo obtida uma faixa linear de concentração de 2,0 × 10⁻⁸ a 4,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹, com um limite de detecção de 5,0 × 10⁻⁹ mol L⁻¹.

Há também na literatura a utilização de eletrodos impressos com MWCNTs para quantificação de MTX. WANG *et al.*⁵⁸ desenvolveram um eletrodo impresso contendo MWCNTs. O eletrodo de trabalho foi confeccionado misturando-se 9,5 g de tinta de grafite com 0,5 g de uma dispersão de MWCNTs-CTAB (1 mg/mL) e em seguida colocado em um dessecador durante 1 h até a evaporação da água, formado então, uma tinta de grafite modificada com MWCNTs-CTAB. A área do eletrodo de trabalho obtida foi delimitada em 0,0314 cm². Para quantificação de MTX foi utilizada a técnica de SWV e obtiveram uma curva analítica no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, sendo que a recuperação de MTX $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ variou de 96,0 a 116,6%.

1.6.2 Propiltiouracil (PTU)

O propiltiouracil (PTU) é um fármaco utilizado para o tratamento do hipertireoidismo, uma doença que está relacionada com a anormalidade da glândula da tireóide, sendo que essa glândula é essencial para muitos processos fisiológicos, pois é responsável pela produção de três hormônios de extrema importância para o controle do funcionamento do corpo humano, a saber: tiroxina e triiodotironina, hormônios responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento e, a calcitonina, um hormônio de importância para o metabolismo do cálcio. Porém, essa glândula pode sofrer anormalidades como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo^{59,60}.

O excesso de hormônio tireoidiano é chamado de hipertireoidismo, acelerando o metabolismo, causando sintomas como, sudorese, palpitações, perda de peso e ansiedade. A produção de pouco hormônio tireoidiano é chamado de hipotireoidismo e pode causar fadiga física, ganho de peso e lentidão, bem como depressão, incapacidade de concentração e problemas de memória.

O hipotireoidismo é tratado com a reposição hormonal e não há fármacos para o tratamento dessa doença. Para o hipertireoidismo podem ser tratados farmacologicamente com iodo radioativo, fármacos da classe dos tioureileno e com iodo/iodeto³⁸.

O Propiltiouracil (PTU, 6-propil-2-tiouracil), FIGURA 1.13, pertencente à classe dos tiourelenos, fármaco amplamente utilizado no tratamento de hipertireoidismo. A ação desta droga ocorre por meio da inibição da atividade da tireoperoxidase da glândula tireóide, e age na conversão de tiroxina a triiodotironina³⁷.

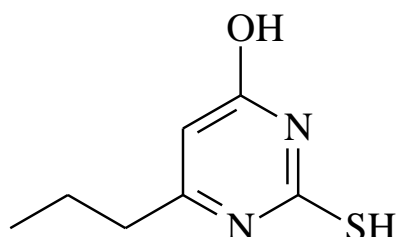


FIGURA 1.13 – Estrutura molecular PTU.

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação de PTU em amostras farmacêuticas e biológicas. Esses métodos incluem HPLC com detecção espectrofotométrica⁶¹ e quimiluminescência⁶², titulação espectrofotométrica⁶³ e coulométrica⁶⁴ e métodos voltamétricos⁶⁵⁻⁶⁷. O método preconizado pela Farmacopeia Britânica para determinação de PTU em formulações farmacêuticas é titulação potenciométrica⁶⁸. A seguir, descreve-se uma breve revisão de alguns procedimentos eletroanalíticos para a determinação de PTU.

SARNA e FIJALEK⁶⁵ estudaram o comportamento eletroquímico de fármacos utilizados para o tratamento do hipertireoidismo, como metimazol (MTZ), carbimazol (CM), metiltiouracil (MTU) e propiltiouracil (PTU) com diferentes eletrodos como mercúrio, ouro e carbono vítreo. A técnica de voltametria cíclica (“Cyclic Voltammetry – CV”) apresentou uma curva analítica no intervalo de concentração para o PTU de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, e para a técnica de SWV a curva analítica apresentou uma faixa linear de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para ambas as técnicas foi utilizado o eletrodo de ouro. Com o auxílio de uma microbalança de quartzo os autores estudaram o comportamento dos produtos formados na oxidação do MTZ e PTU e concluíram que estes são adsorvidos na superfície do eletrodo de ouro em eletrólito suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹.

Foi desenvolvido por SHAHROKHIAN *et al.*⁶⁶ um eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo de cobalto ((CoClSal), 4 – clorosalofeno de cobalto (II)) para a determinação do PTU em amostras farmacêuticas, utilizando a técnica de DPV em eletrólito suporte tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4. A curva

analítica foi linear para as concentrações de PTU de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e as recuperações em soro biológico para o método proposto foi de 98,2 a 111,8 %.

Em outro trabalho, SHAHROKHIAN e SABERI⁶⁷ desenvolveram um método voltamétrico indireto para a determinação de PTU e MTU em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos, utilizando o eletrodo de carbono vítreo. O método indireto descrito pelos autores se baseia no aumento do sinal analítico do catecol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com a adição de soluções de PTU e MTU. A proposta do mecanismo da resposta analítica está relacionada com a reação do produto da oxidação eletroquímica do catecol (*o*-quinona) que é rapidamente consumido na reação de espécies que contém os grupos tióis (PTU e MTU). O aumento da corrente anódica do catecol mostrou uma relação linear com as concentrações PTU e MTU, para o PTU essa relação foi de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

1.6.3 Propranolol (PROP) e Verapamil (VPM)

PROP e VPM são fármacos utilizados para o tratamento da hipertensão arterial. Esta doença é caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea nas artérias, o que faz com que o coração trabalhe mais para fazer circular o sangue através dos vasos sanguíneos, ocorrendo danos às artérias em diversas partes do organismo, podendo ocasionar as seguintes patologias³⁷:

- coração - o infarto, miocardiopatia e a insuficiência cardíaca.
- cérebro - o acidente vascular cerebral (AVC).
- rins - insuficiência renal.

A hipertensão é considerada uma doença silenciosa e por apresentar riscos à sociedade faz-se uso de fármacos chamados de agentes anti-hipertensivos, estes podem ser classificados de acordo com o local de ação, como:

- Diuréticos, são fármacos que atuam no rim;
- Simpaticolíticos, são fármacos que reduzem a pressão arterial pela redução da resistência vascular periférica;
- Vasodilatadores, que reduzem a pressão relaxando o músculo liso vascular;

- Bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , bloqueiam a produção, o que reduz a resistência vascular periférica e o volume de sangue;
- Inibidores da enzima conversora de angiotensina;
- Antagonistas dos receptores de angiotensina II.

O Propranolol (PROP), 1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propranolol, FIGURA 1.14, é uma droga classificada como antagonista β -bloqueador adrenérgico não seletivo amplamente utilizado para tratar a hipertensão e arritmias cardíacas.

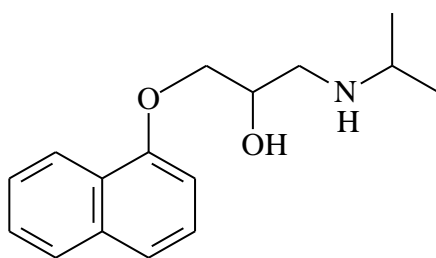


FIGURA 1.14 – Fórmula estrutural do propranolol

São descritos na literatura vários métodos para a determinação de PROP em formulações farmacêuticas como espectrofotométrico⁶⁹⁻⁷², espectrofluorimétrico⁷³⁻⁷⁵, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)⁷⁶⁻⁷⁹ e quimiluminescência combinada com análise por injeção em fluxo⁸⁰⁻⁸³. No entanto, alguns destes métodos apresentam desvantagens, tais como custo elevado, tempo de análise e pré-tratamento da amostra prolongado. As técnicas voltamétricas apresentam algumas vantagens em relação às citadas anteriormente como, rapidez e baixo custo e, geralmente não é preciso um pré-tratamento prolongado da amostra. O método recomendado pela Farmacopéia Brasileira⁸⁴ é o método espectrofotométrico com absorção no comprimento de onda em 290 nm.

A seguir, descreve-se uma breve revisão de alguns métodos eletroanalíticos com diferentes eletrodos para a determinação de PROP em formulações farmacêuticas⁸⁵⁻⁸⁸.

AMBROSI *et al.*⁸⁵ determinaram PROP em amostras farmacêuticas utilizando a técnica de voltametria de pulso normal (“Normal Pulse Voltammetry - NPV”) utilizando o eletrodo de ouro. Nesse trabalho os autores obtiveram uma faixa

linear de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

BARANOWSKA⁸⁶ e colaboradores estudaram o comportamento eletroquímico de PROP e de seus metabólitos em tampão BR (pH 3), utilizando o eletrodo de carbono vítreo. A curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentração de PROP de $4,0 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado para amostras de urina de três pacientes diferentes, sendo obtidas recuperações em torno de 92%.

Após a modificação da superfície do eletrodo GC com Nafion, NIGOVIC *et al.*⁸⁷ desenvolveram um método para a determinação de fármacos β -bloqueadores, tais como o propranolol e bisopropolol em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹, utilizando a técnica voltamétrica de redissolução anódica de onda quadrada, a curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentração para o PROP de $8,0 \times 10^{-8}$ a $6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

É descrito na literatura o desenvolvimento de um eletrodo compósito à base de MWCNTs-borracha de silicone (BS), para determinação de PROP. Neste trabalho, DOS SANTOS e colaboradores⁸⁸ estudaram as proporções de MWCNTs e de BS, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, a proporção que apresentou melhor resposta analítica para o compósito foi de 70% e 30% (m/m) de MWCNTs e BS, respectivamente. Neste trabalho foram estudadas as técnicas de SWV e DPV para a determinação de PROP. Para a técnica de DPV, foi obtida uma curva analítica no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, e para a técnica de SWV, obteve-se uma curva analítica com uma faixa linear de concentração de $3,0 \times 10^{-7}$ a $5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $7,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Os autores aplicaram as duas técnicas voltamétricas para a determinação de PROP em formulações farmacêuticas, ambas mostraram bons resultados quando comparados com o método oficial da Farmacopéia Brasileira⁸⁴.

SARTORI *et al.*⁸⁹ utilizaram o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para a determinação de PROP e Atenolol (ATN) em formulações farmacêuticas. Neste trabalho também foram avaliadas as técnicas voltamétricas de DPV e SWV, e a que apresentou melhor resposta para PROP e ATN foi a técnica SWV. A curva analítica apresentou uma faixa linear de concentração, para PROP e

ATN de $2,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e de $2,0 \times 10^{-6}$ a $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limites de detecção de $1,8$ e $9,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ respectivamente. As recuperações obtidas para o ATN foram de 93,9% a 105,0% e para PROP de 92,5% a 106,0%

O verapamil (VPM), 5-[N-(3,4-dimetoxifeniletil)metilamino]-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilvaleronitrilohidrocloro, FIGURA 1.15, é um fármaco pertencente a classe dos bloqueadores de canal de cálcio, sua ação é sobre o sistema cardiovascular, proporcionando dilatação das artérias e como consequência a redução da pressão arterial. Esse fármaco pode ser usado no tratamento de pacientes com dor no peito e certos tipos de arritmias cardíacas. Os principais efeitos colaterais são tonturas, redução do ritmo cardíaco, enjôo, dores de cabeça.

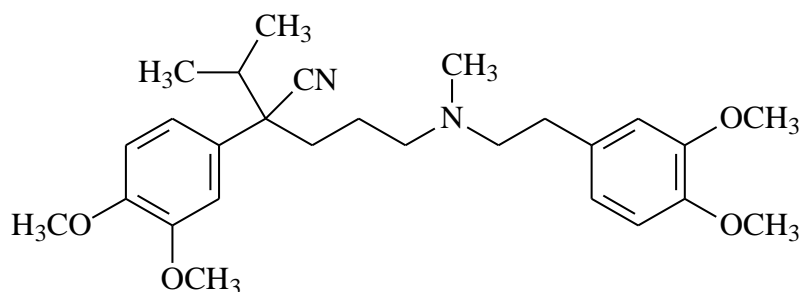


FIGURA 1.15 – Fórmula estrutural do Verapamil.

São descritos na literatura métodos para determinação de VPM em formulações farmacêuticas, tais como: espectrofotométricos⁹⁰⁻⁹³, potenciométricos⁹⁴⁻⁹⁶, condutométrico⁹⁶, HPLC⁹⁷⁻¹⁰¹ e voltamétricos.¹⁰²⁻¹⁰⁴. O método recomendado pela Farmacopeia Brasileira⁸⁴ para determinação de VPM em comprimidos é o método espectrofotométrico com absorção no ultravioleta no comprimento de onda em 278 nm.

SEMAAN *et al.*¹⁰² desenvolveram um eletrodo compósito à base de grafite-poliuretana para a determinação de VPM. Os autores avaliaram três técnicas voltamétricas, como voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada para determinação de VPM em formulações farmacêuticas. Empregando-se voltametria

cíclica, a curva analítica foi linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Quando a técnica DPV foi empregada a curva analítica variou de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, e finalmente, para a técnica de SWV, ela foi linear de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, sendo que a técnica que apresentou melhor sensibilidade foi a SWV, apesar de possuir uma linearidade menor que a aquela obtida empregando-se a técnica de DPV.

Há na literatura trabalho que se utiliza a técnica de redissolução anódica com o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HDME) para determinação de VPM. KASIM *et al.*¹⁰³ utilizaram esse método com o eletrodo descrito, e determinaram VPM em formulações farmacêuticas. Os autores obtiveram uma curva analítica com uma faixa linear de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

DEMIRCAN *et al.*¹⁰⁴ estudaram o comportamento eletroquímico do VPM utilizando o eletrodo GC e verificaram que o VPM apresenta um comportamento irreversível para intervalo de pH de 2,0-12. Os autores avaliaram duas técnicas voltamétricas, a de DPV e SWV, ambas apresentaram a mesma faixa linear de concentração de $8,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e limites de detecção de $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,3 \times 10^{-7}$, respectivamente para DPV e SWV. As recuperações média ficaram em torno de 90%.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

No presente trabalho de doutorado tem-se como proposta a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com filme de dihexadecil hidrogênofosfato (DHP) ou hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH) contendo incorporados nanotubos de carbono para a determinação de Metotrexato (MTX), Propiltioracil (PTU), Propranolol (PROP) e Verapamil (VPM) em formulações farmacêuticas. O emprego dos nanotubos de carbono tem como objetivo aumentar a eficiência dos processos de transferência de elétrons e as propriedades electrocatalíticas dos eletrodos e, com isto, espera-se obter eletrodos com maior seletividade e menor limite de detecção (maior detectabilidade) para os analitos estudados.

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

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

3.1 Instrumentação

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

As medias de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pH-metro Orion modelo EA 940 acoplado a um eletrodo combinado de vidro, com um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl, contendo uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹.

As massas foram aferidas com o auxílio de uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de $\pm 0,1$ mg e uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de $\pm 0,01$ mg.

Para a homogeneização das dispersões formadas com os CNTs, foi usado um banho ultrassônico UNIQUE, modelo ultraclean 1400 A.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-vis modelo SPD-M10AVP com uma coluna C₁₈ Shim-Pack CLC-ODS (4,6 × 150 mm, 5 μ m) e um injetor manual com alça de amostragem de 50 μ L.

As determinações espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 usando uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.2 Reagentes

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (20-30 nm de diâmetro, 1-2 nm de espessura de parede e 0,5 - 2,0 μ m de comprimento, com pureza mínima de 95 %) foram adquiridos da Aldrich.

Os reagentes MTX, PTU, PROP e VPM, DHP e PAH foram obtidos da Sigma. Todos os demais reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q Gradient.

3.3 Soluções Estoque

As soluções estoque de MTX $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 22,72 mg de MTX em 5,0 mL de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções estoque de PTU $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 8,51 mg de PTU em 5,0 mL de tampão BR $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0).

As soluções estoque de PROP $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 14,79 mg de PROP em 5,0 mL de ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções estoque de VPM $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente dissolvendo-se uma massa de 24,55 mg de VPM em 5,0 mL de ácido sulfúrico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$. A solução estoque de ácido sulfúrico, utilizado como eletrólito suporte, foi preparada pela diluição do ácido concentrado para se obter uma concentração final de $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções de tampão acetato, utilizadas como eletrólito suporte, foram preparadas adicionando-se soluções de acetato de sódio $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ nas devidas proporções de acordo com o pH desejado

Soluções de fosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido fosfórico $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ foram misturadas nas devidas proporções, de acordo com o pH desejado, para o preparo das soluções de tampão fosfato, utilizado como eletrólito suporte.

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

3.4 Tratamento dos MWCNTs

Foram misturados 50 mg de MWCNTs em 100,0 mL de uma solução de ácidos sulfúrico e nítrico concentrados, na proporção 3:1 v/v, respectivamente. Essa mistura foi mantida sobre agitação durante 12 h à temperatura ambiente. Após esse tempo, os CNTs foram lavados com água ultrapura até atingir um pH entre 6,5 - 7,0. Para a separação dos CNTs da água empregou-se uma centrífuga de bancada, sendo a água sobrenadante retirada com o auxílio de uma bomba peristáltica. Finalmente, os nanotubos funcionalizados remanescentes no tubo foram secos por 12 h em uma estufa a $105 \text{ }^{\circ}\text{C}^{18}$.

3.5 Limpeza dos Eletrodos de Carbono Vítreo (GC)

Os eletrodos de carbono vítreo (GC) de 5,0 milímetros de diâmetro usados neste trabalho, antes da modificação da superfície, foram polidos sequencialmente com pano para polimento e suspensões de alumina 0,1 e 0,05 μm , para a obtenção de uma superfície espelhada. Em seguida, lavou-se com água destilada em abundância, e posteriormente estes foram sonicados com água ultrapura, por 3 minutos.

3.6 Preparação do Filme MWCNTs-DHP/GC

Em um microtubo de centrifugação de volume de 1,5 mL foi preparada a dispersão de MWCNTs-DHP da seguinte maneira; 1,0 mg de DHP com 1,0 mg de MWCNTs tratados quimicamente com 1,0 mL de água ultrapura, essa mistura foi deixada em banho ultrassônico por 1h 30 min para formação de uma dispersão homogênea de MWCNTs-DHP. Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados um volume de 20 μL da dispersão de MWCNTs-DHP sobre a superfície polida do GC (5 mm de diâmetro) e deixou-se secar por 5 horas à temperatura ambiente.

3.7 Preparação do Filme MWCNTs-PAH/GC

A dispersão MWCNTs-PAH foi preparada em um microtubo de centrifugação (volume de 1,5 mL), adicionando-se 1,0 mg de PAH com 1,0 mg de MWCNTs tratados quimicamente em 1,0 mL de água ultrapura. Essa mistura foi então deixada em banho ultrassônico por 20 min para formação de uma dispersão homogênea de MWCNTs-PAH. Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados volumes de 20 μL da dispersão de MWCNTs-PAH sobre a superfície polida do GC e deixou-se secar por 2 horas à temperatura ambiente.

3.8 Célula Eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de vidro de compartimento único com volume de 15,0 mL, confeccionada em vidro Pyrex, contendo uma alíquota de 10,0 mL de eletrólito suporte e um sistema constituído de três eletrodos:

- eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹);
- contra eletrodo, uma placa de platina;
- eletrodo de trabalho, eletrodo de GC com os filmes de MWCNTs-DHP ou MWCNTs-PAH.

3.9 Amostras

As amostras farmacêuticas foram adquiridas no comércio local na forma de comprimidos e analisadas empregando-se os métodos propostos e métodos de referência.

Para a determinação das amostras, vinte comprimidos foram devidamente macerados com a ajuda de um almofariz e pistilo e, então, pesadas as devidas massas. As massas correspondentes às concentrações desejadas para cada princípio ativo foram transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL e as soluções resultantes foram deixadas em banho ultrassônico. Alíquotas de 200 µL de cada solução foram diluídas em 5,0 mL nos devidos eletrólitos suporte. Para as medidas voltamétricas, volumes das soluções diluídas dos analitos de interesse foram adicionados na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito suporte com sistema de três eletrodos.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados os estudos da área ativas e morfológicas dos eletrodos de carbono vítreo (GC), de carbono vítreo modificado com filme de DHP (DHP/GC) e PAH (PAH/GC) e dos eletrodos de carbono vítreo modificado com filme de MWCNTs-DHP (MWCNTs-DHP/GC) e com MWCNTs-PAH (MWCNTs-PAH/GC), sendo apresentados em seguida os resultados do desenvolvimento dos métodos voltamétricos propostos para a determinação dos analitos de interesse.

4.1 Estudo da área eletroativa do eletrodo de GC, DHP/GC e MWCNTs-DHP/GC

Empregando-se a equação de Randles-Sevcik¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, Equação 1, foi possível calcular a área ativa dos eletrodos de GC, DHP/GC e MWCNTs-DHP/GC empregando-se a técnica de voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura e solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, como apresentado a seguir:

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

sendo I a corrente de pico, A a área eletroativa (cm²), D o coeficiente de difusão ($6,2 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹)¹⁰⁸, n o número de elétrons envolvidos na reação, ν a velocidade de varredura (V s⁻¹), e C a concentração da espécie em solução (mol cm⁻³).

São apresentados na FIGURA 4.1, os voltamogramas obtidos para uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, para os eletrodos de GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C) respectivamente, em diversas velocidades de varredura. A dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura foram inseridos nas respectivas figuras (A, B e C).

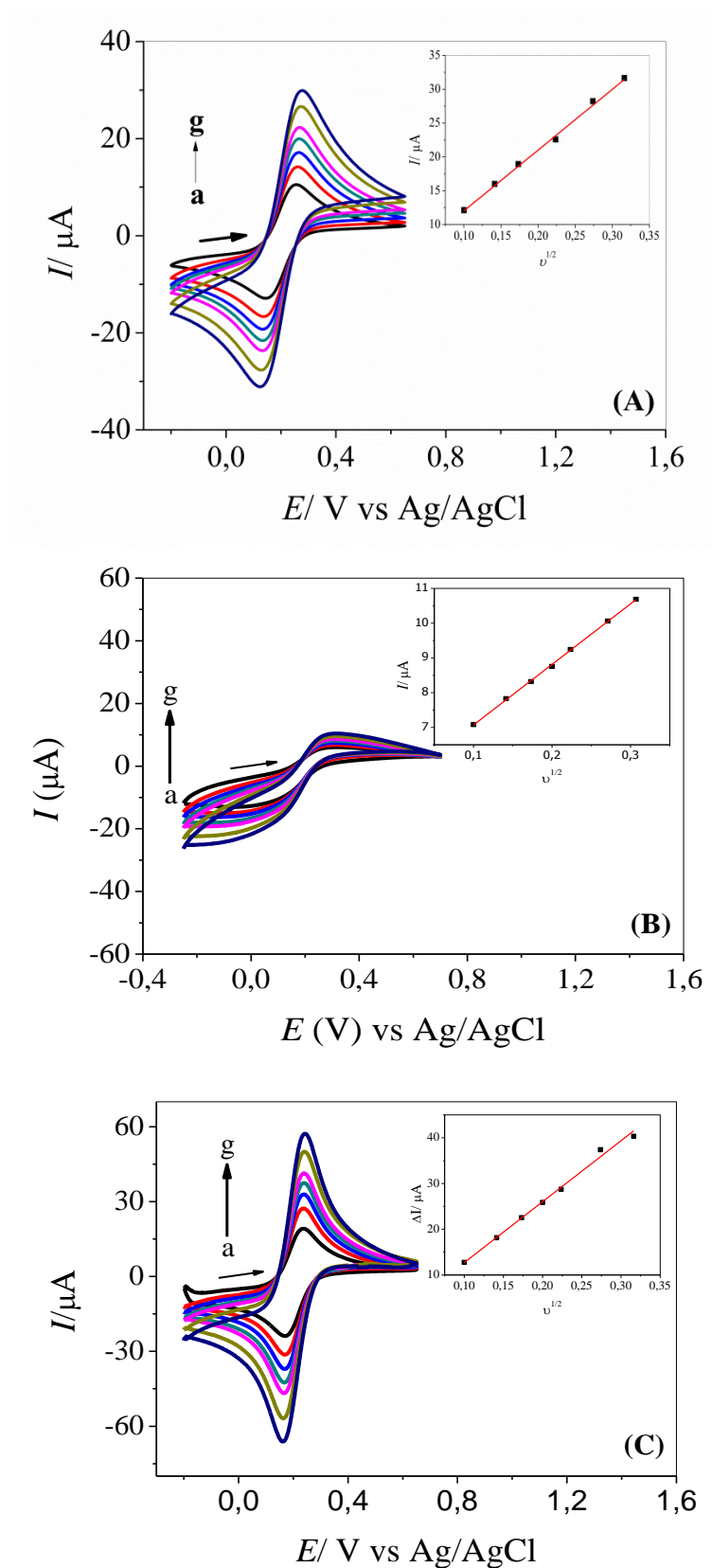


FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de hexacianoferrato (III) de potássio em KCl 0,1 mol L⁻¹, nas velocidades de

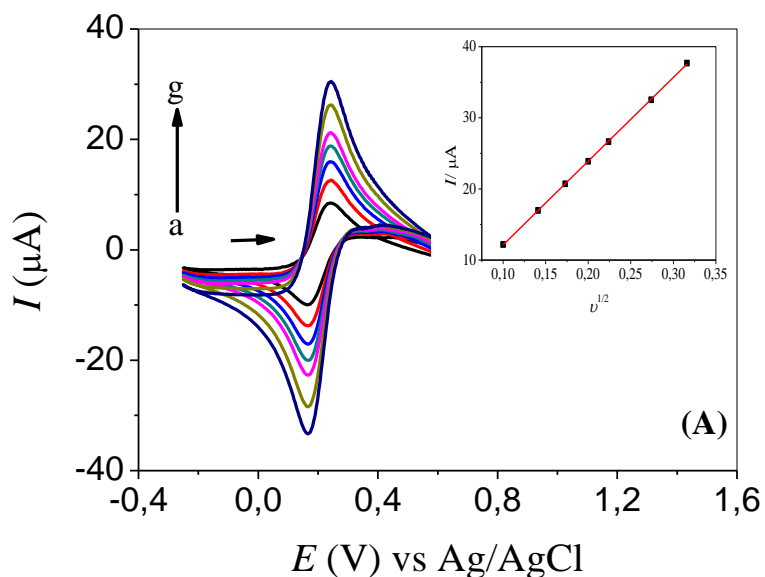
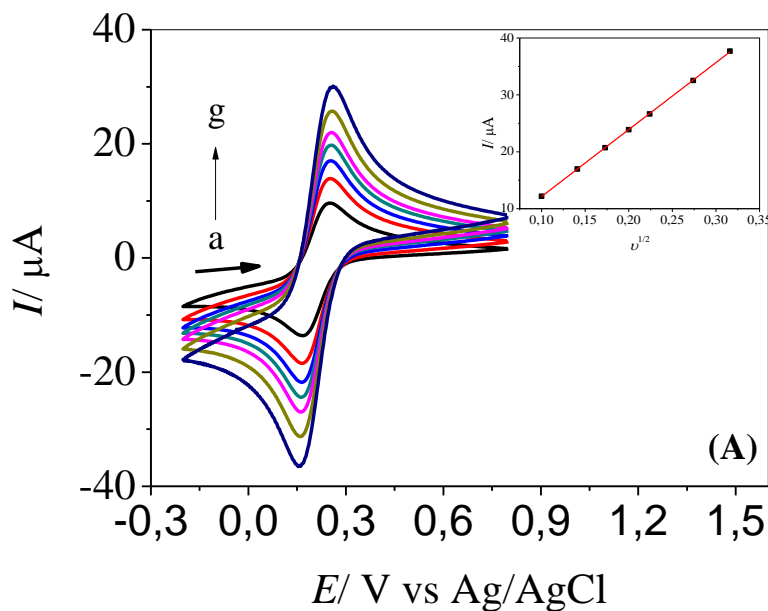
varredura de: (a) 10; (b) 20; (c) 30; (d) 40; (e) 50; (f) 75 e (g) 100 mV s^{-1} , utilizando os eletrodos de GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C). Inserções: relação da corrente de pico com a velocidade de varredura elevado a raiz quadrada, empregada para calcular a área ativa dos eletrodos GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C).

Como pode ser observado nestas figuras, há uma relação linear entre intensidade de sinal analítico com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais. Assim, os coeficientes angulares obtidos para cada equação da reta foram iguais a $1,35 \times 10^{-4}$ para o GC, $1,74 \times 10^{-5}$ para DHP/GC, e $2,04 \times 10^{-4}$ para o MWCNTs-DHP/GC.

Empregando-se a Equação 1 e os coeficientes angulares obtidos, foi possível então, estimar as áreas ativas dos eletrodos estudados. Os valores encontrados foram de 0,100, 0,050 e 0,155 cm^2 para GC, DHP/GC e MWCNTs-DHP/GC, respectivamente. O eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de DHP e nanotubos de carbono apresentou um valor de área ativa de 1,5 vezes maior quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo e três vezes maior em relação ao eletrodo modificado apenas com filme de DHP (DHP/GC), demonstrando assim, que o DHP não é o responsável pelo aumento da intensidade de corrente, e que o mesmo, dificulta a transferência de elétrons e/ou difusão das espécies eletroativas até a superfície do eletrodo base, diminuindo desta maneira a intensidade de sinal analítico. Esses resultados já foram encontrados em outros trabalhos do grupo^{25,109} quando empregou-se esse polímero que forma filmes de baixa condutividade elétrica. No entanto, quando os CNTs são incorporados no filme polimérico há um aumento significativo da área ativa de eletrodo e também do sinal analítico, como poderá ser observado na sequência destes estudos. Outra vantagem do emprego deste polímero é a boa estabilidade do filme polimérico contendo os CNTs imobilizados, estando estes resultados em boa consonância com aqueles apresentados na literatura^{25,109}. Sendo assim, empregou-se o eletrodo MWCNTs-DHP/GC no procedimento eletroanalítico para a determinação de MTX em produtos farmacêuticos.

4.2 Estudo da área eletroativa do eletrodo de GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC

Na FIGURA 4.2 são apresentados os voltamogramas obtidos para os eletrodos GC (A) (não é o mesmo que foi usado no estudo anterior com o DHP), GC com o filme de PAH (PAH/GC) (B) e com nanotubos de carbono (MWCNTs-PAH/GC) (C), empregando-se a técnica de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (de 10 a 100 mV s^{-1}), em eletrólito suporte KCl 0,1 mol L^{-1} na presença de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,0 $\times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Nas inserções, em cada uma das figuras, encontram os gráficos de corrente de pico em função da velocidade de varredura de potencial elevado a meio.



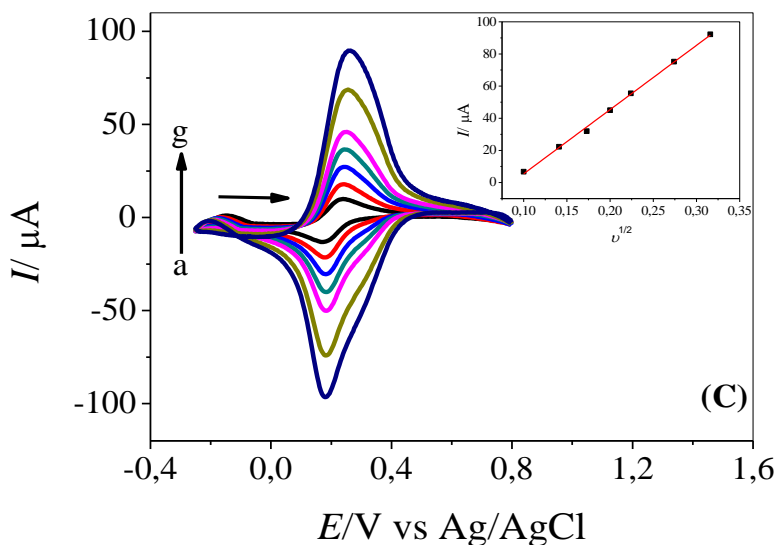


FIGURA 4.2 – Voltamogramas obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas velocidades de varredura de: (a) 10; (b) 20; (c) 30; (d) 40; (e) 50; (f) 75 e (g) 100 mV s^{-1} , utilizando os eletrodos de GC (A) PAH/GC (B) e MWCNTs-PAH/GC (C). Inserções: relação da corrente de pico com a velocidade de varredura de potenciais elevado a meio, empregada para calcular a área ativa dos eletrodos GC (A), DHP/GC (B) e MWCNTs-DHP/GC (C).

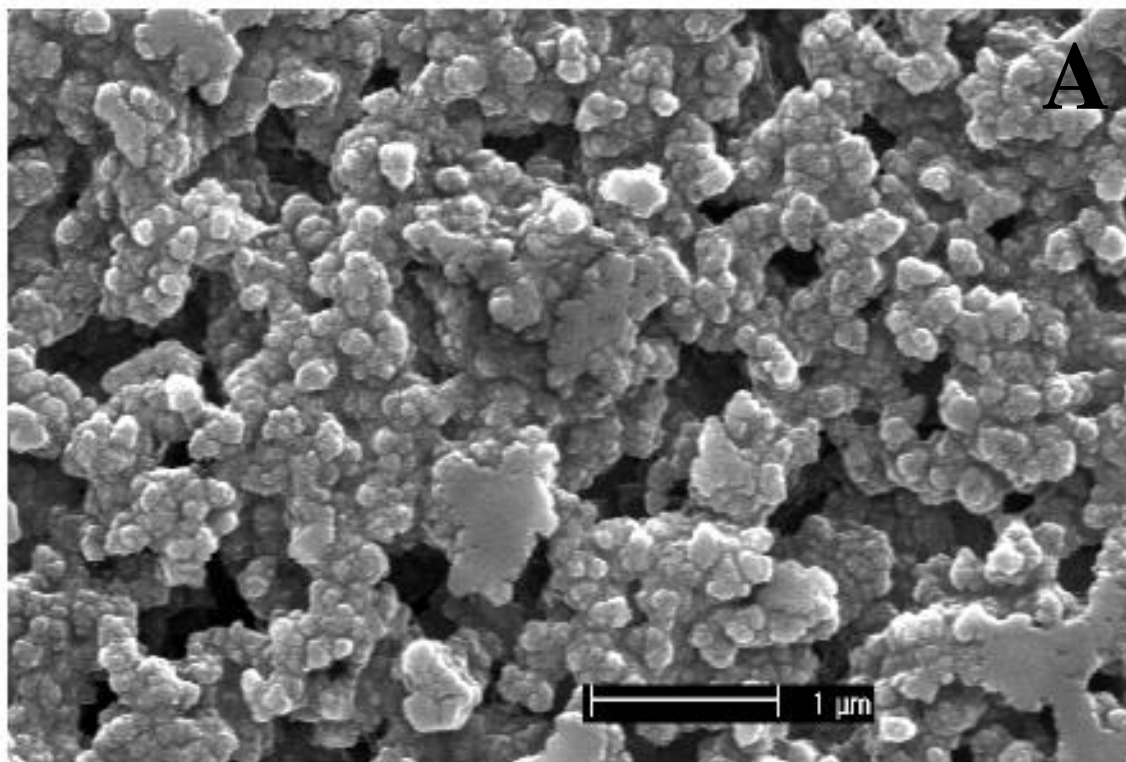
Observa-se em cada um destes estudos, uma relação linear entre a intensidade do sinal analítico (I_{pa}) pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial, apresentando coeficientes angulares iguais a, $9,03 \times 10^{-5}$; $1,74 \times 10^{-5}$ e de $4,00 \times 10^{-4}$ para os eletrodos GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC, respectivamente. Empregando-se a relação de $I_{pa} \text{ vs } v^{1/2}$ e a Equação 1, foi possível estimar as áreas ativas para estes eletrodos que foram iguais a $0,190$, $0,179$ e $0,597 \text{ cm}^2$ para GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC, respectivamente. O eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de PAH e nanotubos de carbono (MWCNTs-PAH/GC) apresentou um valor de área ativa de 3,14 e 3,39 vezes maior quando comparado aos eletrodos de GC e PAH/GC. Observa-se também que não há grandes diferenças das áreas ativas para os eletrodos de GC e PAH/GC, indicando que o PAH não dificulta a difusão das espécies eletroativas pelo filme polimérico ou dificulta a transferência de elétrons. O eletrodo MWCNTs-PAH/GC foi o que apresentou

maior área ativa, sendo este o eletrodo selecionado nos procedimentos eletroanalíticos para as determinações de PTU, PROP e VPM, analitos estudados posteriormente ao estudo do MTX.

4.2.1 Caracterização dos filmes por MEV

Para a caracterização dos diferentes filmes estudados, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as imagens obtidas são apresentadas a seguir.

Na Figura 4.3 é apresentado MEV obtido para os filmes de DHP (A) e MWCNTs-DHP (B).



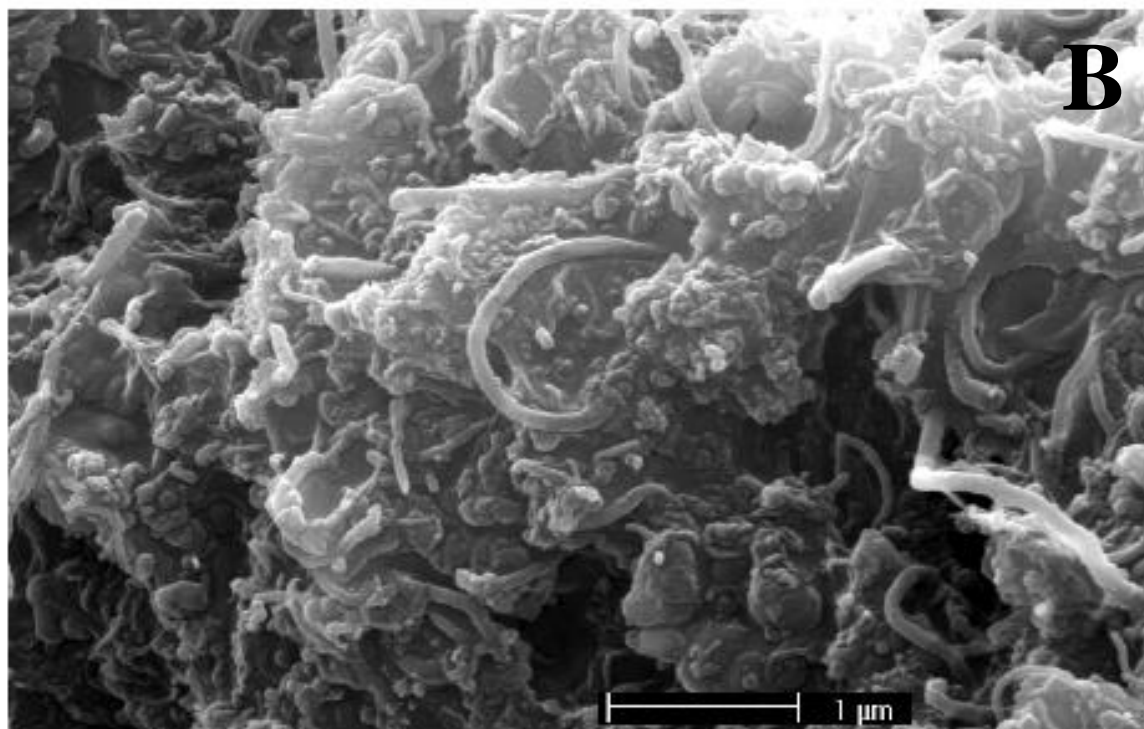


FIGURA 4.3 – Imagens de MEV dos filmes: DHP (A) e MWCNTs-DHP (B), imagens obtidas da tese de doutorado do Bruno C. Janegitz¹¹⁰

Observa-se na FIGURA 4.3 (B) que os nanotubos estão recobertos pelo DHP e há uma distribuição uniforme, tanto do DHP (A) quanto do MWCNTs-DHP (B) sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Na FIGURA 4.4 são apresentados as imagens obtidas para os filmes de PAH (A) e MWCNTs-PAH (B). Observa-se uma boa homogeneidade para ambos os filmes sobre a superfície do carbono vítreo. Nota-se que na FIGURA 4.4 (B) os MWCNTs estão mais expostos nesse filme que os MWCNTs no DHP, provavelmente é por esta razão que eletrodo MWCNTs-PAH/GC apresentou uma área ativa maior quando comparado com o eletrodo MWCNTs-DHP/GC.

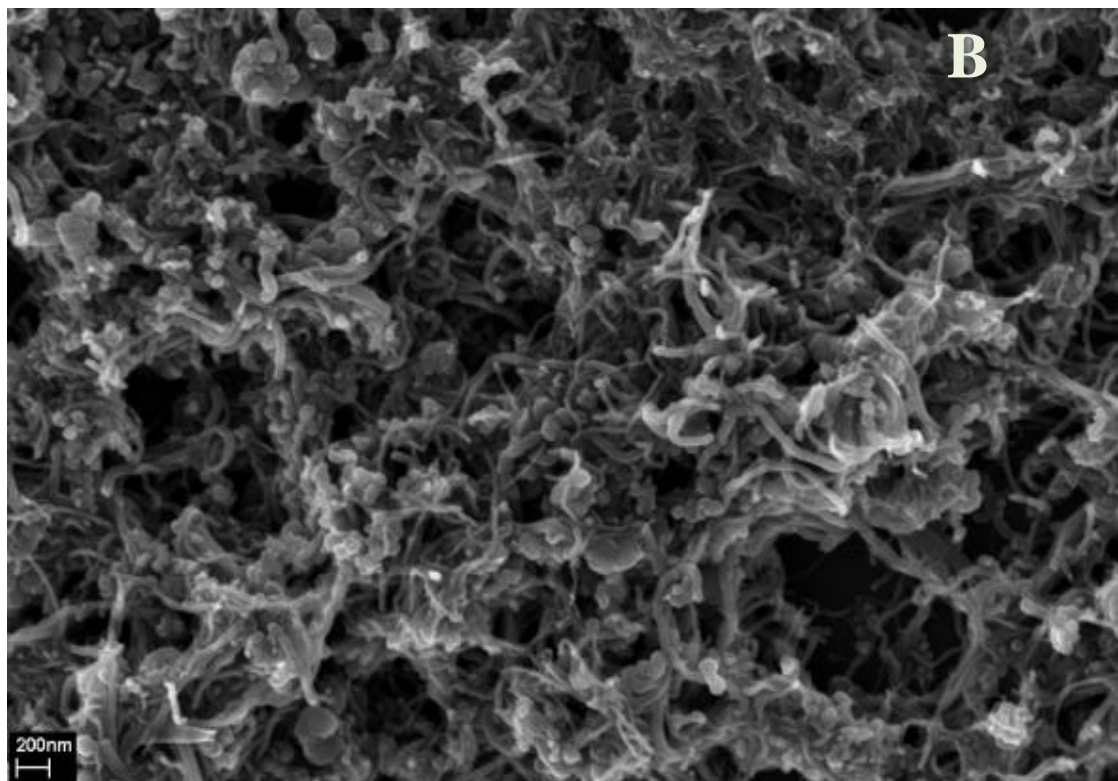


FIGURA 4.4 – Imagens de MEV dos filmes: PAH (A) e MWCNTs-PAH (B).

4.3 Determinação de Metotrexato (MTX)

Nesta parte do trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs-DHP.

4.3.1 Estudo do comportamento voltamétrico do MTX

Inicialmente foi realizado um experimento utilizando a técnica de voltametria cíclica para verificar o comportamento eletroquímico do MTX. As condições experimentais iniciais foram: eletrólito suporte tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) com a concentração de MTX 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, tempo de agitação inicial de 180 s com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Na FIGURA 4.5 são apresentados os voltamogramas cíclicos para o MTX 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) empregando-se o eletrodo MWCNTs-DHP/GC. Como pode ser observado nesta figura, há um pico de oxidação do MTX em torno de 0,75 V, sendo que a intensidade deste pico anódico diminui acentuadamente no segundo ciclo, indicando assim um processo de adsorção do MTX e/ou do produto de oxidação do MTX na superfície do eletrodo MWCNTs-DHP/GC. Na mesma figura também pode ser observado que o processo de oxidação do MTX não é acompanhado do pico de redução, o que indica que a reação de oxidação do MTX é um processo irreversível, estando em consonância com os resultados apresentados na literatura^{55,57}.

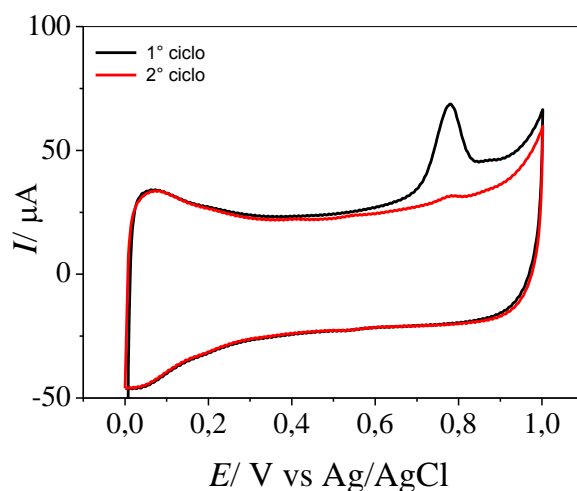


FIGURA 4.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir da oxidação de MTX 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0 com velocidade de

varredura 50 mV s^{-1} com o eletrodo de MWCNTs-DHP/GC, 1°(—) e 2° (—) ciclo.

Posteriormente, avaliou-se o comportamento eletroquímico do MTX em relação aos eletrodos de carbono vítreo (GC), carbono vítreo com o filme de DHP (DHP/GC) e carbono vítreo com DHP e nanotubos de carbono (MWCNTs-DHP/GC) utilizando a técnica de voltametria cíclica. Na FIGURA 4.6 são mostrados os estudos realizados nas seguintes condições: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 como eletrólito suporte e concentração de MTX $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de agitação de 180 s, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Como pode ser observado na FIGURA 4.6, há um ligeiro aumento das correntes anódicas de oxidação do analito em potencial de 0,93 V empregando-se os eletrodos GC e DHP/GC. Por outro lado, empregando-se o eletrodo MWCNTs-DHP/GC, pode ser observado um deslocamento do potencial para 0,74 V e um aumento na corrente de pico anódico para a oxidação do MTX, mostrando assim o efeito eletrocatalítico¹¹¹⁻¹¹⁴ proporcionado pelo emprego dos nanotubos de carbono imobilizados no eletrodo de carbono vítreo. No eletrodo DHP/GC, observa-se uma diminuição da intensidade de corrente em comparação ao eletrodo GC, devido à diminuição da difusão do analito no filme polimérico e também devido à dificuldade da transferência elétrons neste eletrodo, por tratar-se de um filme não condutor. No entanto, a presença do CNTs imobilizados no polímero, o processo eletroquímico é facilitado, obtendo-se um potencial de oxidação menor e sinal analítico muito maior.

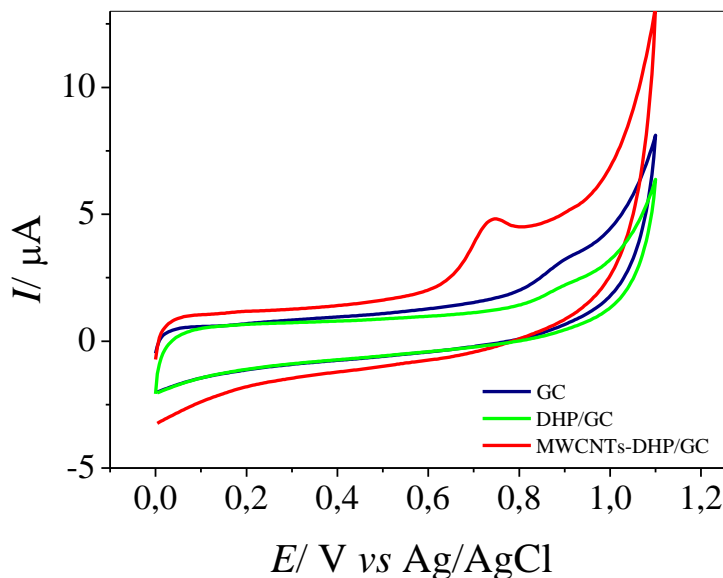


FIGURA 4.6 – Comparação entre os eletrodos GC (—), DHP/G-C (—) e MWCNTs-DHP/GC (—), em eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0); tempo de agitação de 180 s, no processo de oxidação do MTX (1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹).

Considerando-se que há adsorção do analito na superfície do eletrodo modificado com CNTs, desenvolveu-se um método de redissolução com pré-concentração do MTX.

4.3.2 Estudo do Eletrólito Suporte

Utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV, do inglês: “Square Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry”) foram estudados os diferentes eletrólitos suportes, a saber: tampão fosfato, tampão Britton-Robinson (BR), tampão acetato, cloreto de sódio e ácido sulfúrico, os voltamogramas obtidos são apresentados na FIGURA 4.7 (A). O eletrólito que proporcionou a melhor resposta em termos de intensidade do sinal analítico foi o ácido sulfúrico, apesar do potencial de oxidação do MTX ter se deslocado para potencias mais positivos, nesse eletrólito foi aquele que proporcionou uma melhor definição do pico de oxidação, bem como um aumento significativo do sinal analítico em relação aos

proporcionados pelos outros eletrólitos. Portanto, o meio eletrolítico selecionado para a realização das medidas voltamétricas foi o ácido sulfúrico.

Após selecionar o ácido sulfúrico como eletrólito suporte, estudou-se a influência da concentração desse eletrólito suporte sobre o sinal analítico. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 4.7 (B). Observa-se que o potencial de oxidação é pouco influenciado pela variação da concentração do ácido sulfúrico. Nota-se, no entanto, um aumento significativo da intensidade da corrente de pico com o aumento da concentração do eletrólito até a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante o sinal analítico em concentrações superiores. Portanto, o eletrólito e a concentração selecionados para a determinação de MTX foi o H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

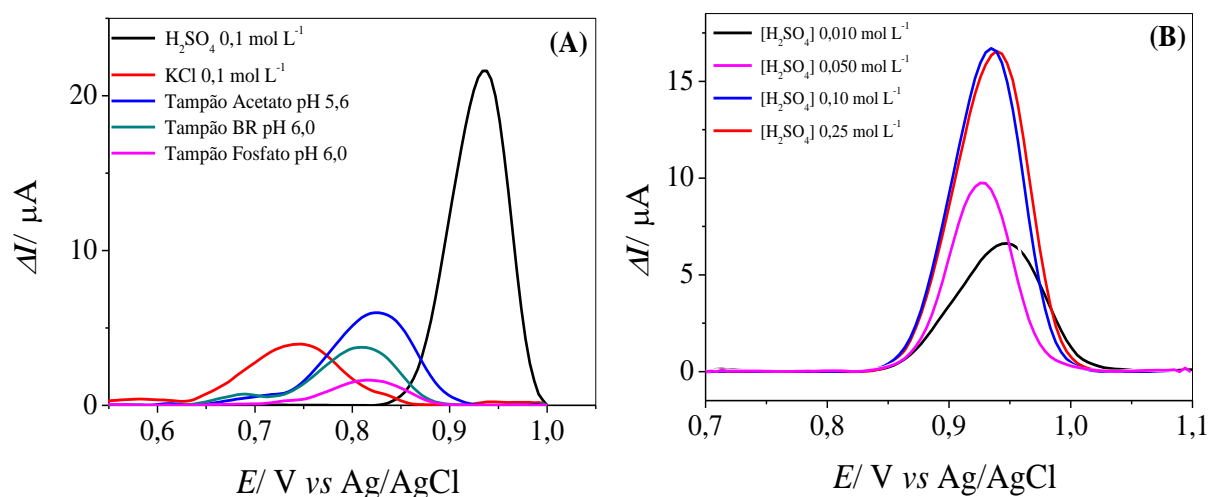


FIGURA 4.7 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o MTX ($f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) em diferentes eletrólitos suporte, e (B) diferentes concentrações de H_2SO_4 para uma concentração de MTX de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3 Tempo de Pré-Concentração

No estudo do tempo de pré-concentração do MTX sobre a superfície do eletrodo MWCNTs-DHP/GC, as pré-concentrações foram feitas sem aplicação de potencial (em circuito aberto), uma vez que não foi observado variação do sinal analítico maior do que 5 %, no intervalo de potencial estudado de 0,8 a 1,0 V. No estudo da pré-concentração, empregou-se uma solução de MTX $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os parâmetros da técnica

SWAdASV foram: $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$ e $\Delta E = 5 \text{ mV}$. A FIGURA 4.8 (A) apresenta os voltamogramas obtidos para a técnica de SWV nos tempos de pré-concentração variando de 60 a 360 s. Como pode ser observado na FIGURA 4.8 (B), o tempo de pré-concentração que proporcionou a melhor resposta quanto a intensidade de sinal e boa repetibilidade foi o tempo de 300 s. Em tempos superiores houve um decréscimo da intensidade da corrente de pico de oxidação do MTX, devido a saturação da superfície do eletrodo de trabalho com o analito, dificultando a difusão do mesmo através do filme polimérico.

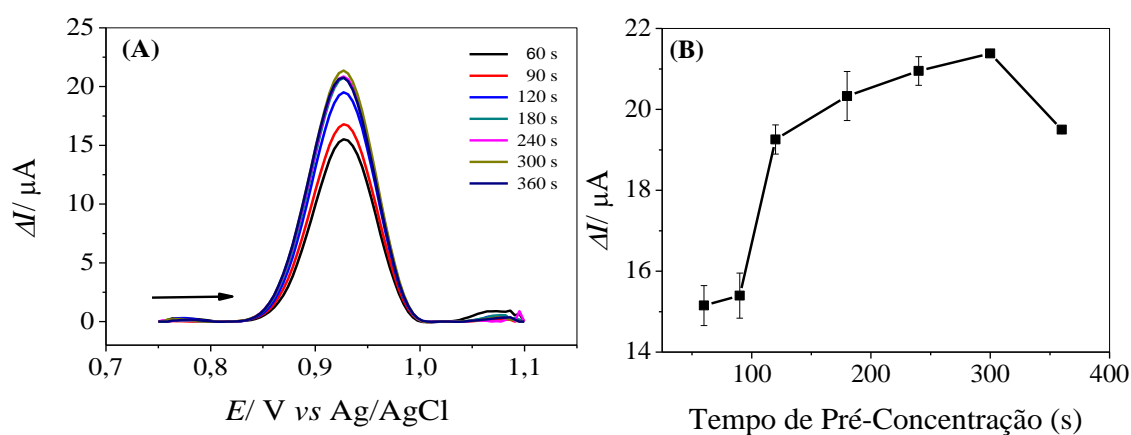


FIGURA 4.8 - (A) Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) para a oxidação de MTX em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação do pico de corrente com o tempo de pré-concentração.

Portanto, a determinação do MTX foi realizada com tempo de pré-concentração de 300 s.

4.3.4 Estudo da proporção de DHP no filme

Foi avaliado o efeito da concentração de DHP na formação da dispersão e do filme polimérico contendo os MWCNTs imobilizados sobre a superfície do eletrodo de GC, utilizando a técnica SWAdASV ($f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 4 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo da dispersão MWCNTs-DHP, a massa de MWCNTs foi mantida constante em 1,0 mg variando-se a massa de DHP para volume final de 1 mL de água deionizada (solução). Investigaram-se neste estudos massas de DHP de 0,5, 1 e 2 mg. Os

voltamogramas obtidos são apresentados FIGURA 4.9 e, é possível observar que o eletrodo modificado contendo as proporções 1:0,5 e 1:1 m/m MWCNTs-DHP foi o que apresentou o maior sinal analítico de oxidação do MTX, e em proporção igual/maior 2:1 observa-se a queda do sinal analítico. Assim, a proporção escolhida foi de 1:1 m/m para os próximos estudos.

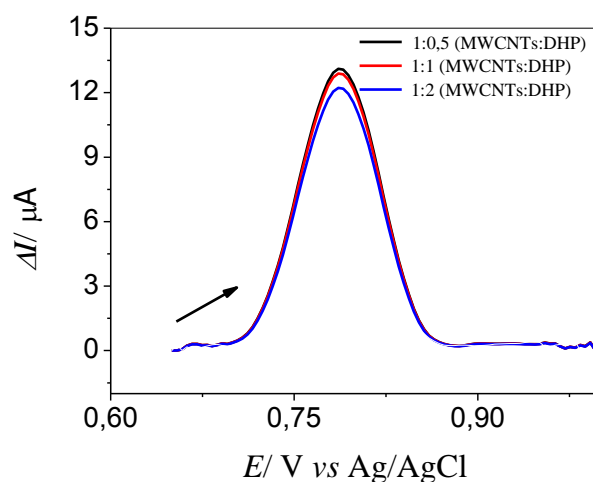


FIGURA 4.9 – Voltamogramas obtidos para diferentes proporções de DHP com os MWCNTs na formação do filme de MWCNTs-DHP/GC.

4.3.5 Otimização dos Parâmetros Voltamétricos para a Determinação de MTX

Após os estudos do tempo de pré-concentração e do eletrólito suporte para o MTX, foram estudadas as técnicas de voltametria de redissolução de onda quadrada (SWAdASV) e de pulso diferencial (DPAdASV) com o propósito de se obter melhores sensibilidade e linearidade e maior detectibilidade (menor limite de detecção) na determinação de MTX. Os parâmetros estudados e os selecionados para a SWAdASV e DPAdASV são apresentados nas TABELAS 4.1 e 4.2.

TABELA 4.1 – Parâmetros investigados na voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV) e os valores selecionados para a determinação de MTX

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência (s ⁻¹)	10 – 50	20
Amplitude (mV)	5 – 60	35
Incremento de Varredura (mV)	1 – 7	5

TABELA 4.2 – Parâmetros investigados na voltametria de pulso diferencial (DPAdASV) e os valores selecionados para a determinação de MTX

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	5 – 60	50
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	70
Tempo de modulação (ms)	5 – 30	20

4.3.6 Curvas Analíticas

Após a otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas de redissolução anódica, construíram-se as curvas analíticas adicionando-se alíquotas da solução padrão de MTX $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de eletrólito suporte H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A FIGURA 4.10 apresenta os voltamogramas para as técnicas de onda quadrada (A) e de pulso diferencial (B) para diferentes concentrações de MTX. As curvas analíticas obtidas para as técnicas supramencionadas podem ser observadas na FIGURA 4.11 (A) e (B).

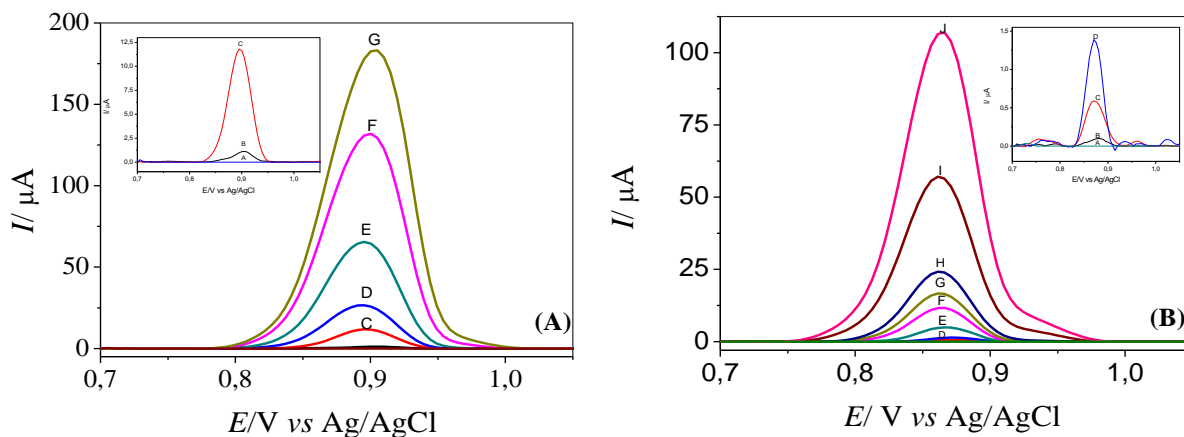


FIGURA 4.10 – (A) Voltamogramas de redissolução anódica de onda quadrada para o MTX ($f = 20 \text{ s}^{-1}$; $a = 35 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, branco (A); e nas concentrações de $0,1$ (B); $0,5$ (C); $1,0$ (D); $2,5$ (E); $5,0$ (F); $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX (G). (B) Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o MTX ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 70 \text{ mV}$; $t = 20 \text{ mV}$) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, branco (A); e nas concentrações de $0,05$ (B); $0,075$ (C); $0,10$ (D); $0,25$ (E); $0,5$ (F); $0,75$ (G); $1,0$ (H); $2,5$ (I); $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX (J).

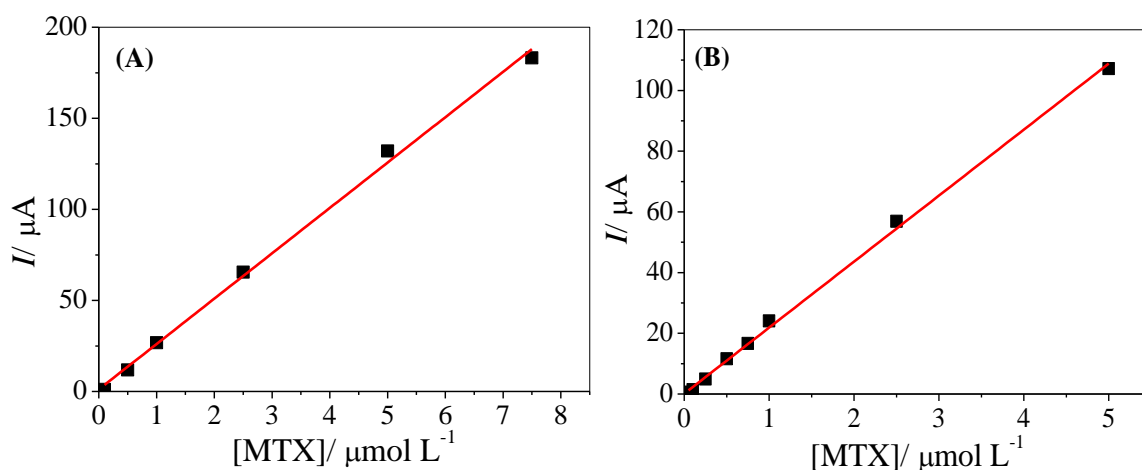


FIGURA 4.11 – Curvas analíticas obtidas para o MTX em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (A) por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e (B) voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.

Na TABELA 4.3 são apresentados os resultados obtidos para as técnicas de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada e de pulso diferencial, tais como equação da reta, linearidade de concentração de MTX, coeficiente de correlação (r) e limite de detecção (LD). O limite de detecção foi calculado pelo desvio padrão de dez voltamogramas do branco multiplicado por três, dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

TABELA 4.3 – Resultados obtidos para diferentes técnicas voltamétricas para a quantificação do MTX

Resultados	SWAdASV	DPAdASV
Equação da Reta	$1,1 + 4,3 \times 10^7 [C/ \text{mol L}^{-1}]$	$0,35 + 4,2 \times 10^7 [C/ \text{mol L}^{-1}]$
Linearidade/ mol L ⁻¹	$1,0 \times 10^{-7}$ a $7,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-8}$ a $5,0 \times 10^{-6}$
R	0,996	0,998
LD (mol L ⁻¹)	$7,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$

Ambas as técnicas voltamétricas apresentaram boas linearidades e sensibilidades, com bons limites de detecção, porém a técnica de DPAdASV apresentou uma faixa linear com concentrações menores para o MTX em relação a técnica de SWAdASV e um menor limite de detecção. Sendo assim, a DPAdASV foi selecionada para a determinação de MTX em amostras farmacêuticas.

Os resultados obtidos utilizando o método proposto (desempenho analítico) foram comparados com outros trabalhos encontrados na literatura que utilizam métodos eletroanalíticos para determinação de MTX. A TABELA 4.4 apresenta esta comparação

TABELA 4.4 – Comparação do desempenho analítico obtido neste trabalho com aquele obtido em diversos métodos propostos na literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Referências
GC ^a	SWV	$8,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-7}$	Gao <i>et al.</i> ⁵⁵ .
MWCNTs-SP ^b	SWV	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$	Wang <i>et al.</i> ⁵⁸
m-AgSAE ^c	DPV	$5,5 \times 10^{-8} - 5,5 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-9}$	Selesovska <i>et al.</i> ⁵⁴
nano-Au/LC/GC ^d	SWV	$4,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-8}$	Wang <i>et al.</i> ⁵⁶
DNA/GC ^e	SWV	$2,0 \times 10^{-8} - 4,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-9}$	Wang <i>et al.</i> ⁵⁷
CNTs-DHP/GC ^f	DPAdASV	$5,0 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-8}$	Método proposto

^aGC = carbono vítreo

^bMWCNTs-SPE= eletrodo impresso com MWCNTs

^cm-AgSAE = Eletrodo Sólido de Amalgama de Prata

^dnano-Au/LC/GC = nano-Au / L-cisteína/ Carbono Vítreo

^eDNA/GC =DNA /GC

Pode-se observar na TABELA 4.4 que o método proposto apresentou melhor resposta em termos de linearidade de concentração da curva analítica e LD em comparação aos métodos que utilizam os eletrodos de GC, MWCNTs-SPE e m-Ag/SAE, porém este último, a superfície do eletrodo de prata é modificada com mercúrio, um metal tóxico que necessita de cuidados ao manuseá-lo e por este motivo ele vem sendo substituído. Em relação aos eletrodos de nano-Au/LC/GC e de DNA/GC apresentaram ligeiro aumento da faixa linear de concentração do analito quando comparado a curva analítica obtida no método proposto. No entanto, esses eletrodos apresentam algumas desvantagens como o tempo elevado de confecção. No caso do biossensor (nano-Au/LC/GC), o tempo de preparo foi 6h e do eletrodo contendo DNA, utiliza-se solvente orgânico de alta toxicidade como o clorofórmio. Desta maneira, pode se concluir que o método proposto para a determinação MTX em formulação farmacêutica utilizando o eletrodo MWCNTs-DHP/GC apresentou boa linearidade e baixo LD, com maior simplicidade de confecção em relação aqueles descritos na literatura.

4.3.7 Estudo da Repetibilidade

A repetibilidade intra-dias e a repetibilidade inter-dias para o método proposto foram avaliados em dois níveis de concentração $2,5 \times 10^{-7}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de MTX. Para o estudo da repetibilidade intra-dias, um conjunto de 10 medidas (n=10) foram realizadas nas mesmas condições experimentais e com o mesmo eletrodo, sendo calculados os respectivos desvios padrões relativos (RSD) apresentados na TABELA 4.5. A repetibilidade inter-dias foi avaliada por medidas durante cinco diferentes dias (n=5), e para cada dia o filme foi renovado com a mesma dispersão de MWCNTs-DHP e os RSD calculados são apresentados na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – Desvio padrão relativo para as medidas de repetibilidade inter e intra dias na determinação de MTX nas concentrações de $2,5 \times 10^{-7}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹

Repetibilidade	[MTX] (10^{-7} mol L ⁻¹)	RSD (%)
Intra-dias ^a	2,5	2,4
	7,5	3,8
Inter-dias ^{ab}	2,5	2,9
	7,5	3,1

^an=10 ^bn=5

4.3.8 Estudo de Adição e Recuperação

Os efeitos de interferência da matriz das amostras para a determinação do MTX usando o método proposto foram estudados com o cálculo da porcentagem de recuperação para adições de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de MTX em eletrólito suporte contendo 100 µL de amostra. As porcentagens de recuperação variaram entre 95,0 % e 103% como é apresentado na TABELA 4.6.

TABELA 4.6 - Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de MTX

Amostras	[MTX] × 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹		%
	Adicionado	Recuperado	
A	1,00	0,95	95
	5,00	5,12	102
B	1,00	1,01	101
	5,00	5,14	103
C	1,00	0,97	97
	5,00	4,98	99,5

Estes valores indicam que não há interferência significativa da matriz das amostras na determinação de MTX empregando o método voltamétrico proposto.

4.3.9 Análises das amostras

O método de voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial foi aplicado para determinação de MTX em formulações farmacêuticas, e os resultados obtidos foram comparados com aqueles empregando-se o método comparativo¹¹⁵. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 4.7.

TABELA 4.7 - Resultados obtidos na determinação de MTX em amostras comerciais para o método proposto e método comparativo

Amostras	MTX (mg/comprimido)		Erro relativo ^b (%)
	HPLC ^a	Voltamétrico ^a	
A	2,5±0,5	2,6±0,8	+4,0
B	2,6±0,3	2,5±0,5	-3,8
C	2,5±0,3	2,4±0,5	-4,0

^a n = 3 medidas; ^b [100 × (método Voltamétrico – método HPLC)] / método HPLC

Para avaliar os níveis de confiança entre os resultados obtidos empregando-se os dois procedimentos, aplicou-se o teste *t-pareado*. Foi

calculado um $t_{\text{exp}} = 0,101$, valor menor que o $t_{\text{crítico}} (3,18, \alpha = 0,05)$. Sendo assim, os resultados da determinação de MTX obtidos empregando-se o método voltamétrico e o método cromatográfico não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95 % e, estão dentro de um erro relativo aceitável variando de -4,0 a 4,0%.

4.3.10 Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos do MTX

Empregando-se voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura, foi possível obter a constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) e a área de recobrimento (Γ_0) do eletrodo de MWCNTs-DHP/GC em eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 4.12 pode-se observar os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial para a técnica de voltametria cíclica com concentração de MTX na cela eletroquímica de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

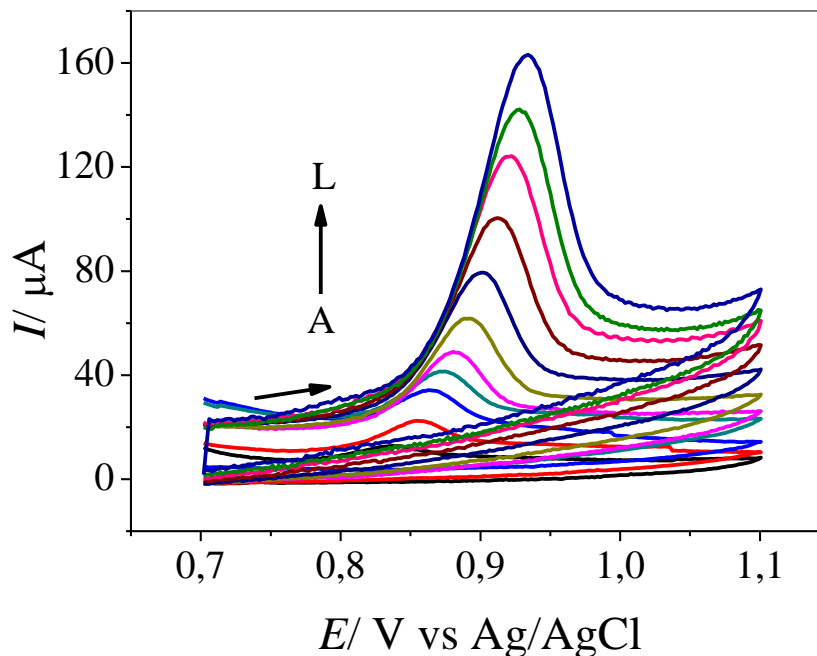


FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos nas velocidades de varredura de potencial de (A) 0,01; (B) 0,03; (C) 0,03; (D) 0,04; (E) 0,05; (F) 0,07; (G) 0,10; (H) 0,15 e (I) 0,20, (J) 0,25, (L) 0,30 V s^{-1} em eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e concentração de MTX na cela de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A FIGURA 4.13 (A) apresenta a relação da corrente de pico (I) com a velocidade de varredura (ν) para uma concentração de MTX de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se uma relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura, característica de processos adsorptivos. Essa característica também pode ser observada na FIGURA 4.13 (B), sendo o valor encontrado para a inclinação da reta (coeficiente angular) é de 0,9, valor próximo de 1,0, indicando que o processo é controlado por adsorção¹⁰⁷.

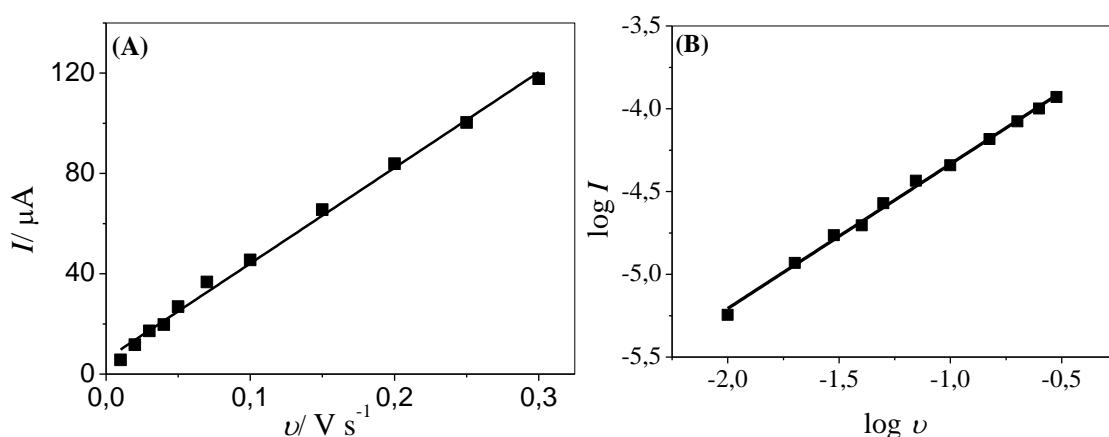


FIGURA 4.13 – (A) Dependência linear da com corrente com o a velocidade de varredura utilizando a MWCNTs-DHP/GC para MTX $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades, (B) Relação de $\log I$ por $\log \nu$.

Empregando-se a relação de corrente de pico com a velocidade de varredura é possível determinar a área de recobrimento (Γ_o) para o MTX adsorvido sobre a superfície do eletrodo MWCNTs-DHP/GC de acordo com a Equação 2^{106,116}.

$$I = \frac{n^2 F^2 \Gamma_o A}{4RT} \nu \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo: A a área ativa, n o número de elétrons, ν a velocidade de varredura, F a constante de Faraday. O valor calculado para área de recobrimento (Γ_o) foi de $2,07 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, sabendo-se que para essa quantidade de matéria há $1,24 \times 10^{15}$ moléculas por cm^2 , assumindo-se que a adsorção foi em uma única

camada, pode-se calcular a área que uma molécula de MTX ocupa na superfície do eletrodo, e a área calculada foi de cerca de $8,06 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$.

Outra informação que se pode obter foi o valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) empregando-se a equação de Laviron¹⁰⁶. Na FIGURA 4.14 é apresentado o gráfico que relaciona o potencial de oxidação (E) em função de $\ln \nu$.

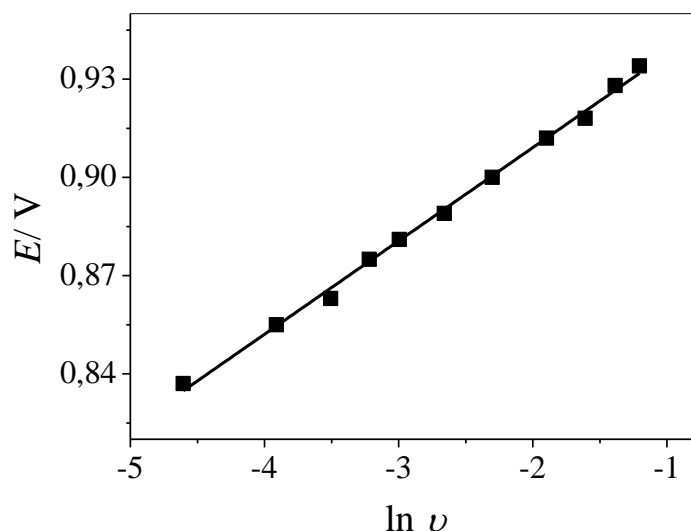


FIGURA 4.14 – Dependência E vs. $\ln \nu$ para MTX $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Utilizando-se a equação da reta do gráfico, $E/V = 0,996 + 0,029 \ln \nu$; $r = 0,995$, dos potenciais de pico anódico vs. $\ln \nu$, FIGURA 4.14, pode-se substituir os valores na Eq. 3 para processos irreversíveis¹⁰⁶, e calcular a constante de transferência de elétrons (k_s) para o eletrodo MWCNTs-DHP/GC.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \ln \frac{RT k^0}{\alpha n F} + \frac{RT}{\alpha n F} \ln \nu \quad (Eq. 3)$$

Assim, com o valor obtido para o coeficiente angular (0,029) e utilizando $T = 298 \text{ K}$, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, e $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$ o valor calculado para αn foi de 0,89. O valor de E^0 é o coeficiente linear, sendo obtido por extrapolação de ν para 0. Esse valor obtido foi igual a 0,843 V. Sabendo que na oxidação do MTX há a participação de 1 elétron^{55,57} pode-se estimar o valor de α , que foi igual a 0,89, e o valor calculado para constante heterogênea

de transferência de elétrons (k_s) foi de $0,46 \text{ s}^{-1}$. Os valores encontrados para k_s , nos trabalhos citados anteriormente foram de $1,48 \times 10^{-3}$ (GC), 1,62 (nano-Au/LC/GC) e $1,47 \text{ s}^{-1}$ (DNA/GC). Observa-se assim uma concordância com os valores encontrados neste trabalho, uma vez que o eletrodo proposto apresentou uma melhor transferência de elétrons em relação ao GC e, nos dois últimos trabalhos (artigos) apresentaram melhor faixa linear da curva analítica e menor LD que aqueles encontrados no trabalho proposto.

4.4 Determinação de Propiltiouracil (PTU)

Como discutido anteriormente, para os próximos fármacos estudados, o eletrodo utilizado foi o MWCNTs-PAH/GC.

4.4.1 Efeito da Concentração de PAH

Inicialmente, estudou-se o efeito da concentração de PAH na formação do filme contendo imobilizados os MWCNTs sobre a resposta analítica de PTU, utilizando a técnica de voltametria cíclica em tampão BR (pH 2,0), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Neste estudo, a massa MWCNTs foi mantida constante em 1,0 mg e a massa de PAH foi variada de 0,5; 1,0 e 2,0 mg sendo adicionado 1,0 mL de água deionizada em cada uma destas suspensões. Assim, foram investigadas as seguintes proporções em massa/massa de MWCNTs:PAH: 1:0,5 m/m; 1:1 m/m e 1:2 m/m em 1 mL de água deionizada. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 4.15, e observa-se que para o eletrodo modificado contendo 1:1 m/m MWCNTs:PAH apresentou o valor máximo da corrente de pico de oxidação para uma concentração de PTU $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão BR, pH 2,0. Assim esta razão em massa de 1:1 de MWCNTs-PAH foi selecionada para os estudos futuros.

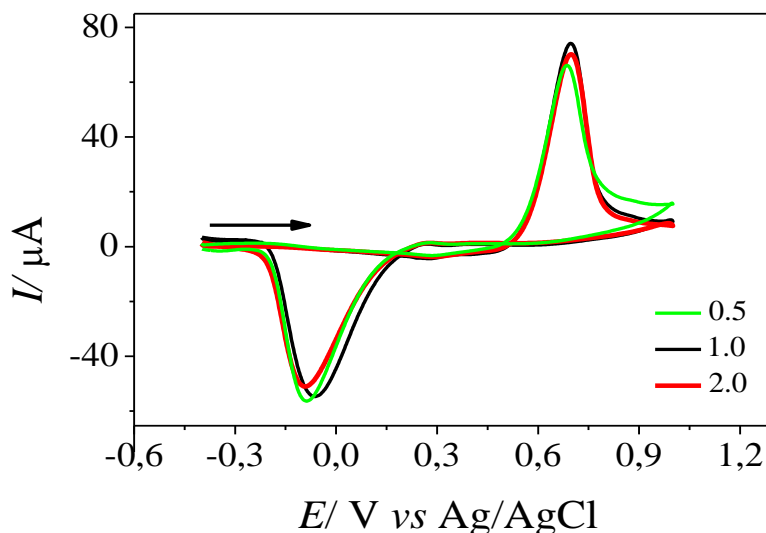


FIGURA 4.15 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma concentração de PTU $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em solução tampão BR (pH 2,0) para os eletrodos de carbono vítreo recobertos com $20 \mu\text{L}$ das dispersões contendo MWCNTs:PAH: 1:0,5 m/m; 1:1 m/m e 1:2 m/m em 1 mL de água deionizada.

Utilizando a proporção de 1:1 m/m de MWCNTs:PAH, foi observado a formação de filme com boa homogeneidade sobre a superfície do eletrodo GC, em consonância com os eletrodos confeccionados no nosso grupo de pesquisa^{34,35}. A homogeneidade do filme obtido é atribuído aos amino grupos protonados da cadeia do PAH que interagem eletrostaticamente com os grupos carboxílicos dos MWCNTs tratados, formando desta maneira um filme com boa estabilidade^{31,34,35,117}.

4.4.2 Estudo do Comportamento Voltamétrico do PTU

O comportamento eletroquímico do PTU foi investigado utilizando-se a técnica de voltametria cíclica com os eletrodos de GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC, nas seguintes condições experimentais: eletrólito suporte tampão BR (pH 2,0), concentração de PTU de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos obtidos para o PTU em diferentes eletrodos são apresentados na FIGURA 4.16.

Como pode ser observado na FIGURA 4.16, para eletrodo GC, voltamograma (a), o PTU apresenta uma pequena corrente de oxidação em um

potencial de 0,84 V e uma corrente catódica em um potencial de -0,10 V. A variação dos potenciais (ΔE) foi de cerca de 0,95 V, indicando que PTU exibe um comportamento eletroquímico irreversível para o eletrodo GC. Para o eletrodo modificado com PAH/GC, (FIGURA 4.16, voltamograma (b)), observa-se uma pequena corrente de oxidação do PTU em um potencial de 0,95 V, porém não se nota a redução do fármaco para esse eletrodo, apresentando assim um processo irreversível. Para o eletrodo MWCNTs-PAH/GC (FIGURA 4.16, voltamograma (c)), observa-se o deslocamento do potencial de oxidação de PTU para 0,65 V e do potencial de redução para -0,09 V, diminuindo assim a diferença de potenciais (ΔE) para 0,74 V. O comportamento apresentado é irreversível, porém houve uma diminuição de 0,21 V na variação dos potenciais com a utilização dos MWCNTs quando comparado ao eletrodo GC. Além do deslocamento dos potenciais, ao se utilizar o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC, houve também um aumento das intensidades de correntes de pico para a oxidação e para a redução, mostrando assim a atividade electrocatalítica do eletrodo contendo os nanotubos de carbono imobilizados¹¹¹⁻¹¹⁴.

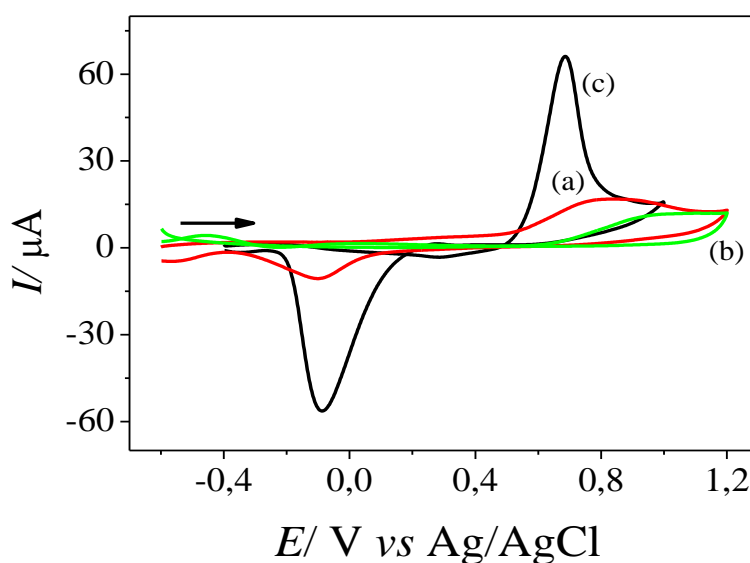


FIGURA 4.16 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de PTU de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte tampão BR pH 2,0 a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , para os eletrodos (a,-) GC, (b,-) PAH/GC e (c,-) MWCNTs-PAH/GC.

Na FIGURA 4.17 são apresentados os voltamogramas cíclicos (1º, 2º, 3º e 4º ciclos) para a oxidação do PTU empregando-se o eletrodo de

MWCNTs-PAH/GC em solução tampão BR, pH 2,0, para a janela de potencial de trabalho de 0,4 a 1,0 V. Durante as seguidas varreduras de potencial, a intensidade de corrente anódica diminuiu com os sucessivos ciclos, como pode ser observado na FIGURA 4.17, indicando que o produto da oxidação provavelmente está sendo adsorvido na superfície do eletrodo.

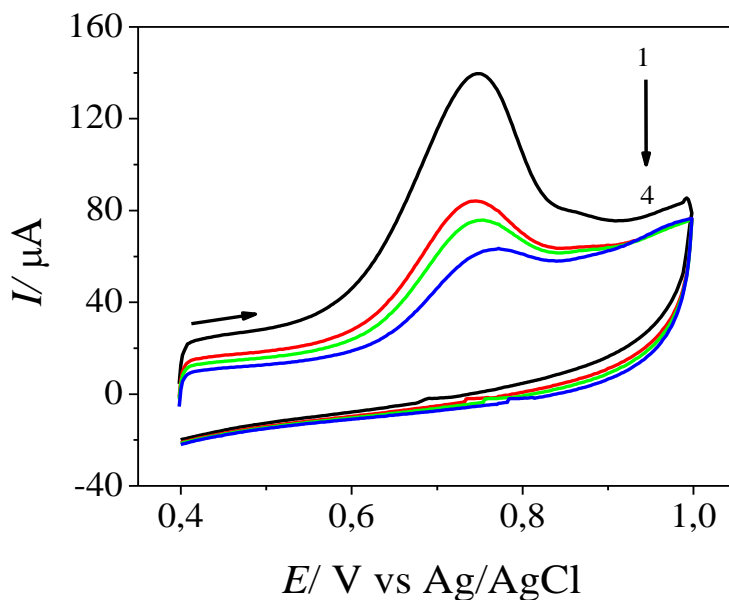


FIGURA 4.17 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de PTU em uma solução tampão BR (pH 2,0) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , empregando-se o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC: 1^o ao 4^o ciclo.

Desta maneira, estudou-se também o comportamento da redução do PTU. Observa-se no voltamograma de redução (de +0,4V para -0,4 V), (FIGURA 4.18 (b)), a ausência de picos de redução do PTU. Este comportamento é um indicativo de que o pico de redução observado anteriormente (FIGURA 4.17) só ocorre quando há a oxidação do PTU, resultados semelhantes foram obtidos por SARNA E FIJALEK⁶⁵. Assim, aplicou-se um potencial (0,90V) adequado para que houvesse a oxidação do PTU por determinado tempo (30s) e, em seguida fez-se a varredura no sentido de redução, (FIGURA 4.18 (c)), observando-se um pico próximo a -0,10 V, confirmando assim, que o pico de redução só é observado quando o PTU é oxidado.

Com estes resultados obtidos, conclui-se que é possível a aplicação de um potencial para a oxidação do PTU e posterior redução do

produto desta oxidação. Na FIGURA 4.18 observa-se que o potencial de redução do PTU é menor (mais próximo de zero) em comparação com potencial de oxidação. Assim, optou-se por trabalhar com a redução do PTU evitando ou diminuindo a interferência da maioria dos concomitantes presentes nas amostras.

Considerando-se que há adsorção do produto formado na superfície do eletrodo modificado com CNTs, desenvolveu-se um método voltamétrico adsorptivo de redissolução catódica (AdCSV) para a determinação do PTU.

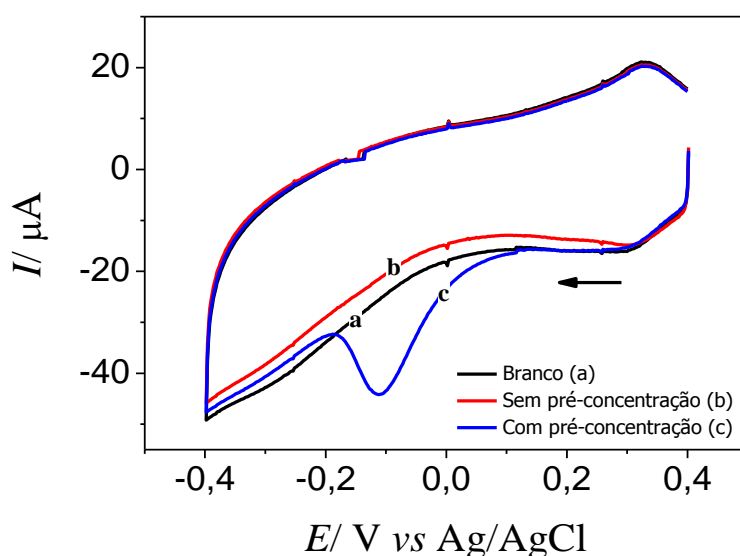


FIGURA 4.18 – Voltamogramas cíclicos da redução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em tampão BR (pH 2,0) velocidade de varredura 50 mV s^{-1} : (a,—) Branco, (b,—) sem pré concentração, (c,—) com pré concentração em potencial de 0,90 V por 30 s.

4.4.3 Efeito do Potencial e Tempo de Pré-Concentração

Considerando-se os resultados obtidos anteriormente, fez se então o estudo da influência do potencial de pré-concentração (E_{pc}) e do tempo de pré-concentração (t_{pc}), sendo os voltamogramas deste estudo apresentados na FIGURA 4.19 (A) e (B). Estudou-se a redução do produto gerado na oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU sobre o sinal analítico, as condições experimentais foram: tampão BR (pH 2,0), velocidade de varredura de 50 mV

s⁻¹, empregando-se a voltametria cíclica e os resultados estão apresentados na TABELA 4.8.

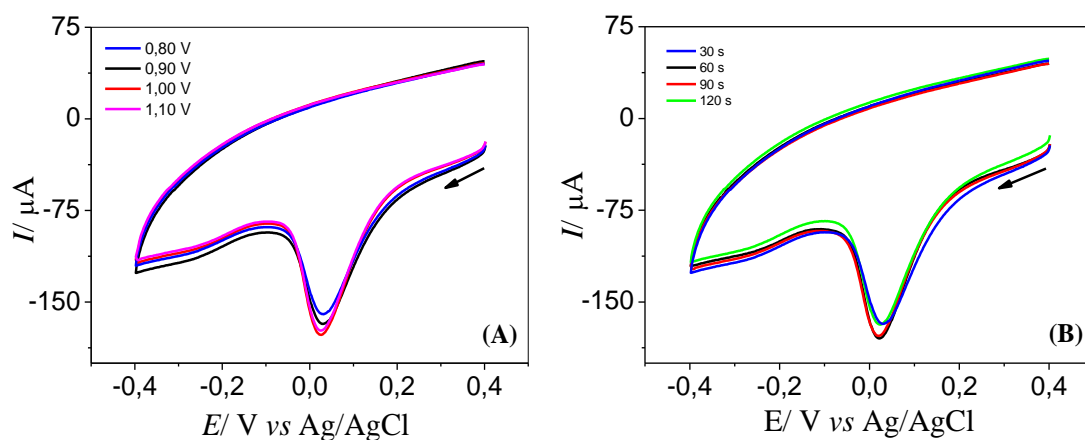


FIGURA 4.19 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a redução do produto formado na oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em uma solução tampão BR pH 2,0, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} :(A) estudo do potencial de acumulação e (B) estudo do tempo de acumulação.

TABELA 4.8 – Estudo do potencial e tempo de acumulação

Parâmetros	Faixa	Selecionado
Potencial de pré-concentração (E_{pc}) (V)	0,80 a 1,10	1,0
Tempo de pré-concentração (t_{pc}) (s)	30 a 120	60

Os resultados obtidos mostraram que o sinal analítico (corrente de pico) foi maior quando se aplicou um potencial de pré-concentração de 1,0 V durante 60 s, sendo então selecionados esses parâmetros para a determinação de PTU em produtos farmacêuticos.

4.4.4 Eletrólito Suporte e Efeito do pH

Estudou-se o comportamento eletroquímico do PTU empregando-se o eletrodo MWCNTs-PAH/GC em diferentes eletrólitos suporte (FIGURA 4.20), a saber: solução tampão BR (pH 2,0); ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato pH 7,0 e tampão acetato (pH 4,0). Nesse estudo foi empregada

a técnica de voltametria cíclica, uma concentração de PTU de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, um potencial de pré-concentração de 1,0 V durante 60 s e uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O eletrólito suporte que proporcionou um maior sinal analítico, melhor definição do pico de redução e maior reprodutibilidade das respostas voltamétricas foi o tampão BR pH 2,0. Assim, esta solução foi escolhida como o eletrólito suporte para os estudos posteriores.

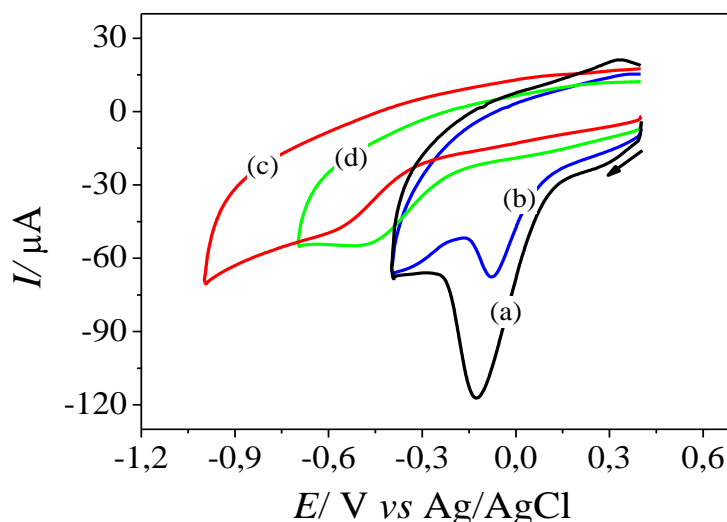


FIGURA 4.20 – Voltamogramas cíclicos em diferentes eletrólitos suporte: (a) tampão BR pH 2,0; (b) ácido sulfúrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (c) de tampão fosfato pH 7,0; tampão acetato pH 4,0, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} $E_{pc} = 1,0 \text{ V}$ e $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

4.4.5 Escolha da Técnica Voltamétrica

Inicialmente foram avaliadas as técnicas de redissolução catódica: de onda quadrada (SWAdCSV), de pulso diferencial (DPAdCSV) e de varredura linear (AdCSV). Na FIGURA 4.21 estão apresentados os voltamogramas obtidos para a redução do produto formado na oxidação de uma solução de PTU $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão BR (pH 2), aplicando se um potencial de pré-concentração de 1,0 V durante 60 s. Os parâmetros experimentais para cada técnica foram: frequência igual a 30 Hz, amplitude de 40 mV e incremento de varredura igual a 2 mV para SWAdCSV; velocidade de varredura de 40 mV s^{-1} ; amplitude de pulso igual a 50 mV e tempo de modulação de 20 s para DPAdCSV, e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}

para AdCSV. Para a técnica SWAdCSV, FIGURA 4.21(A), não é observado nenhum sinal de redução referente ao produto formado na oxidação do PTU. Já para a técnica de DPAdCSV, FIGURA 4.21(B), o sinal analítico da redução do produto gerado está sendo mascarado por um pico de intensidade de corrente muito alta, omitindo assim o sinal analítico. No entanto, essa interferência, não afeta a técnica de voltametria linear FIGURA 4.21(C), e o sinal de redução do produto fica mais evidente. Sendo assim, a técnica selecionada para determinação de PTU, foi a voltametria linear de redissolução catódica (LSAdCSV).

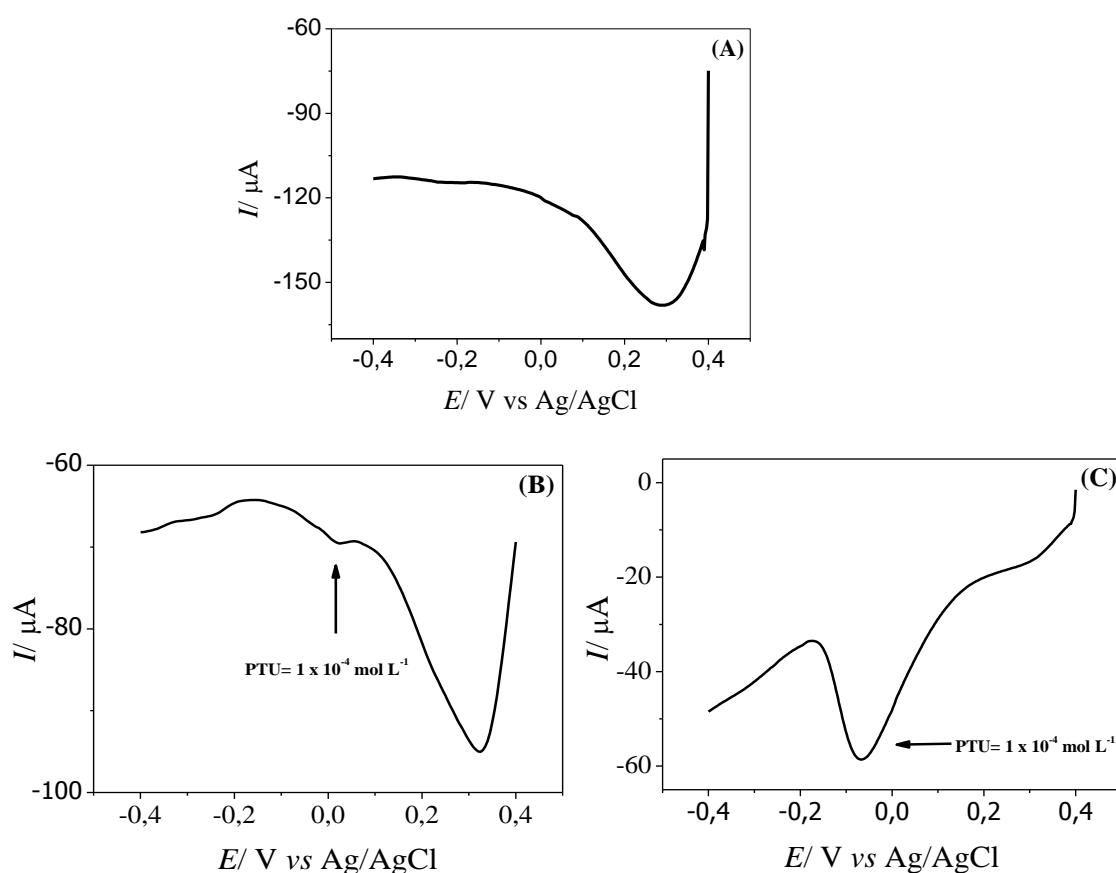


FIGURA 4.21 – Voltamogramas obtidos para a redução do produto gerado na oxidação de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU, aplicando-se um potencial de pré-concentração de 1,0 V durante 60 s, utilizando as técnicas de redissolução catódica: voltametria de onda quadrada (A), voltametria de pulso diferencial (B) e linear (C).

4.4.6 Estudo da Influência da Velocidade de Varredura de Potencial

Objetivando-se avaliar a aplicação do eletrodo MWCNTs-PAH/GC para a determinação de PTU em formulações farmacêuticas, usou-se a técnica de voltametria linear, uma vez que as técnicas de pulso não se mostraram satisfatórias, como discutido. Assim, investigou-se o efeito da velocidade de varredura de potencial no sinal analítico. Nesse estudo foi empregada uma solução de PTU $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 2,0), aplicando-se um potencial de pré-concentração de 1,0 V por 60 s. Na FIGURA 4.22 são apresentados os voltamogramas obtidos nas velocidades de varredura de potencial de (a) 0,020; (b) 0,040; (c) 0,060; (d) 0,080; (e) 0,100, (f) 0,150; (g) 0,200, (h) 250; (i) 0,300; (j) 0,350 e (l) 0,400 V s^{-1} . Como pode ser observado nesta figura, o sinal analítico aumentou até uma velocidade de varredura de potencial de 0,200 V s^{-1} , permanecendo praticamente constante em velocidades de varredura de potencial superiores, sendo então essa velocidade de varredura selecionada para os trabalhos posteriores.

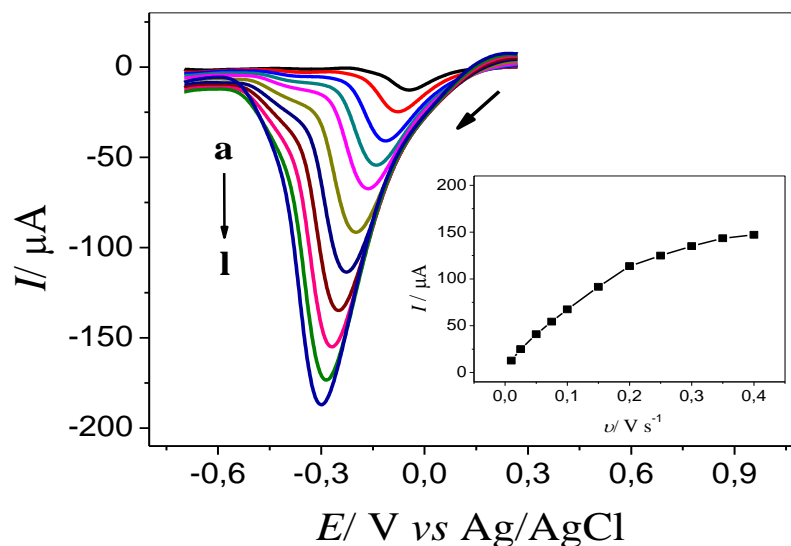


FIGURA 4.22 – Voltamogramas Adsorptivos de Redissolução Catódica (Ad CSV) para o produto formado na oxidação do PTU em tampão BR (pH 2,0 L^{-1}) nas velocidades de varredura de potencial de (a) 0,020, (b) 0,040, (c) 0,060, (d) 0,080, (e) 0,100, (f) 0,150, (g) 0,200, (h) 250, (i) 0,300, (j) 0,350 e (l) 0,400 V s^{-1} . Inserido: relação da corrente de pico catódica com a variação da velocidade de varredura.

Com os resultados obtidos neste experimento, observa-se uma relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura de potencial no intervalo de 0,020 a 0,150 V s⁻¹ (FIGURA 4.23 (A)). Outrossim, colocando-se em gráfico o log *I* em função do log *v* foi obtida uma relação linear com uma inclinação (coeficiente angular) de 0,88 (FIGURA 4.23 (B)). Esse valor obtido é concordante com o valor teórico de 1,0 para aqueles processos controlados por adsorção. Com os resultados apresentados na FIGURA 4.23 (A), característicos de processos adsorptivos, foi possível determinar a concentração do analito adsorvido na superfície do eletrodo (área de recobrimento (Γ_o), empregando-se a Eq.2.

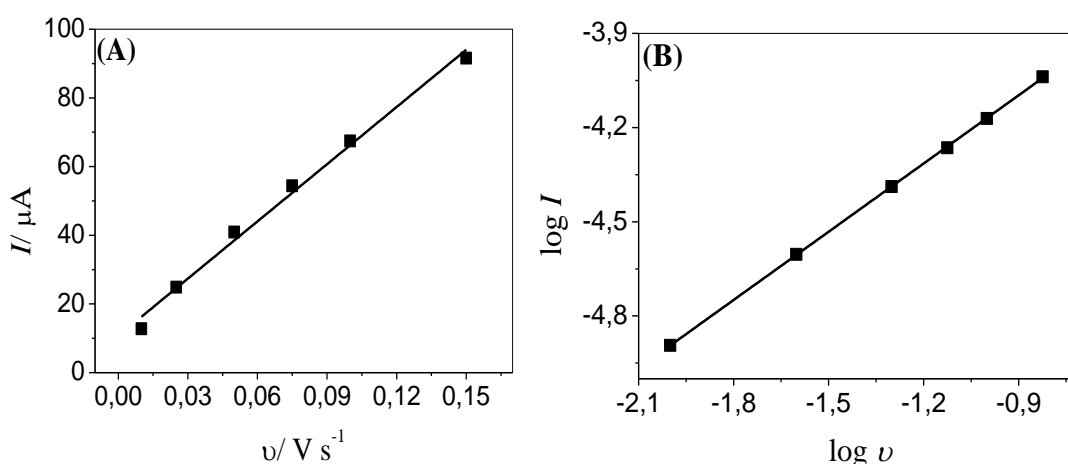


FIGURA 4.23 – (A) Dependência linear de *I* com *v*, e (B) dependência linear de log *I* com o log *v* utilizando o MWCNTs-PAH/GC para PTU 1,0 x 10⁻³ L⁻¹ em solução tampão BR (pH 2,0).

$$I = \frac{n^2 F^2 A \Gamma_o}{4 RT} v \quad (Eq. 2)$$

sendo *A* a área geométrica do eletrodo de 0,198 cm², *n* o número de elétrons, *v* velocidade de varredura de potencial, *F* constante de Faraday. O valor calculado da área de recobrimento (Γ_o) foi de 5,06 x 10⁻⁹ mol cm⁻², aplicando-se o mesmo conceito utilizado para calcular a área que uma molécula MTX ocupa na superfície do eletrodo, pode-se calcular a área de uma molécula de PTU, assumindo que a adsorção é em uma única camada (monocamada), pode-se inferir que uma molécula de PTU adsorvida ocupa uma área aproximada de 3,0 x 10⁻¹⁵ cm² na superfície do eletrodo CNTs-PAH/GC.

4.4.7 Curva Analítica

Na FIGURA 4.24 são apresentados os voltamogramas de redissolução catódica obtidos para diferentes concentrações de PTU em solução tampão BR (pH 2,0) como eletrólito suporte. Na inserção é mostrada a curva analítica obtida de corrente catódica I (μA) em função da concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de PTU, empregando-se o eletrodo proposto (MWCNTs-PAH/GC). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração do analito de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $58 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o PTU. A equação da reta obtida foi: I (μA) = $-4,8 \times 10^{-2} + 4,6 \times 10^5$ [[PTU] (mol L^{-1})], ($r = 0,996$), com um limite de detecção (LD) igual a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, calculado pelo desvio padrão de dez voltamogramas do branco multiplicado por três, dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

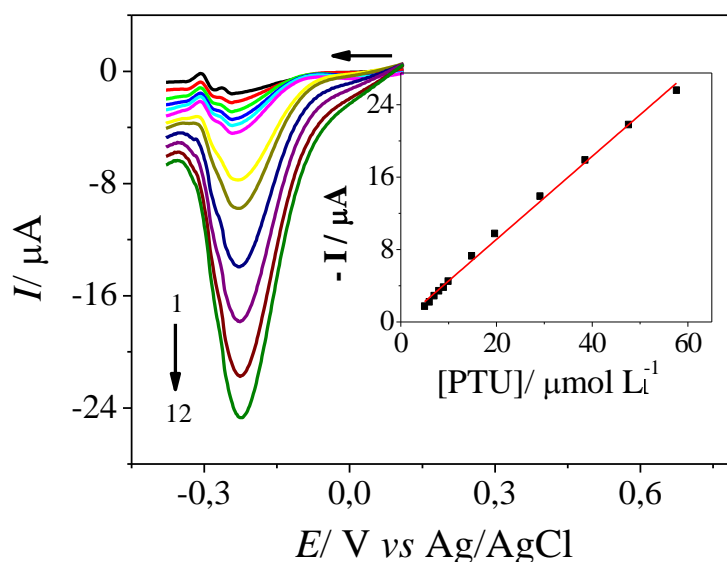


FIGURA 4.24 – Voltamogramas Adsorptivos de Redissolução Catódica (Ad CSV) obtidos usando o eletrodo MWCNTs-PAH/GC para: (1) 5,0, (2) 6,0, (3) 6,9 (4); 7,9; (5) 8,9 (6); 9,9 (7); 14,8; (8) 19,6; (9) 29,0; (10) 38,0; (11) 48,0 (12); $58,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em solução tampão BR (pH 2,0), velocidade de varredura de 200 mV s^{-1} . Inserido: curva analítica.

Os resultados obtidos empregando-se o método proposto foram comparados com os resultados obtidos em outros trabalhos descritos na literatura. Na TABELA 4.9 são apresentados a linearidades das curvas

analíticas e também os limites de detecção (LD). Como pode ser observado o método proposto nesta tese empregando-se o eletrodo MWCNTs-PAH/GC apresentou maior linearidade da curva analítica que aquela obtida empregando-se o eletrodo de ouro, sendo que a comparação dos limites de detecção ficou prejudicada, uma vez que essa grandeza não foi divulgada no artigo. Por outro lado, o limite de detecção do método proposto foi menor que aquele obtido empregando-se um eletrodo de pasta de carbono modificado com um complexo de cobalto (II) (4 – clorosalofeno de cobalto (II), CoClSal-CPE)⁶⁵. O método voltamétrico adsortivo aqui proposto apresentou menor linearidade e um LD maior que o método indireto empregando catecol e um eletrodo de carbono vítreo⁶⁶. No entanto, a desvantagem deste método é o emprego de reagente de alta toxicidade. Por outro lado, a determinação de PTU nos compostos farmacêuticos não há necessidade de métodos com alta detectabilidade, sendo que as amostras foram diluídas para a concentração desta droga ficar no intervalo de concentração da curva analítica. Outra vantagem do eletrodo aqui proposto é a simplicidade de sua confecção.

TABELA 4.9 – Comparação de diferentes eletrodos e/ou técnicas voltamétricas utilizadas na determinação do PTU

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Refêrencia
Au	SWV	500 – 800	–	64
CoClSal-CPE	DPV	5 – 500	2	65
GC**	DPV	0,1 – 10	0,05	66
MWCNTs-PAH/GC	LSAdCSV	5 – 58	1	Proposto

**determinação indireta usando catecol.

4.4.8 Aplicação do Método Proposto na Determinação de PTU em Formulações Farmacêuticas

O procedimento analítico desenvolvido foi aplicado para a determinação de PTU em amostras comerciais. Os resultados obtidos empregando-se o método proposto foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método oficial da Farmacopéia Britânica⁶⁸. Na TABELA 4.10 são apresentados os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método comparativo da Farmacopéia Britânica.

TABELA 4.10 – Determinação de PTU em formulações farmacêuticas utilizando-se o método voltamétrico proposto com o eletrodo MWCNTs-PAH/GC, e método preconizado pela Farmacopéia Britânica⁶⁸

Amostras	PTU (mg comprimido ⁻¹)			Erro Relativo ^[b] (%)
	Valor Rotulado	Método de Referência ^[a]	Método Proposto ^[a]	
A	100	99 ± 1	99 ± 1	0
B	100	103 ± 1	102 ± 2	-1,0
C	100	101 ± 2	103 ± 2	2,0

[a] n=3.

[b] $[100 \times (\text{Método Proposto} - \text{Método de Referência})] / \text{Método de Referência}$.

Aplicando-se o teste *t* pareado¹¹⁸ para os resultados obtidos para ambos os métodos, o valor de *t* calculado (0,4512) foi menor do que o valor tabelado (4,303, $\alpha = 0,5$), pode-se então concluir que os resultados obtidos para ambos procedimentos não são estatisticamente diferentes, em um nível de confiança de 95%.

4.4.9 Estudo de Adição e recuperação e interferentes

Foram estudados o efeito da matriz das amostras na determinação do PTU. O estudo de adição e recuperação foi realizado por adição de quantidades conhecidas de soluções padrão de PTU em soluções de uma amostra farmacêutica, sendo a concentração final de PTU determinada empregando o método proposto. As recuperações do analito encontradas

variaram de 96,6 a 105 % como é apresentado ns TABELA 4.11, indicando assim que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de PTU empregando-se o método proposto.

TABELA 4.11 – Porcentagens obtidas no estudo de adição e recuperação para soluções de PTU $7,50 \times 10^{-6}$ e $30,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

[PTU] × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹		%
Adicionado	Recuperado	
7,50	7,24	96,6
30,00	30,04	102
7,50	7,59	101
30,00	30,09	100
7,50	7,35	98,0
30,00	31,50	105

O efeito de eventuais interferentes foi investigado por meio da adição dos possíveis interferentes a uma solução padrão de PTU. Os interferentes em potencial estudados foram: carbonato cálcio, amido, estearato de magnésio e povidona. Nesse estudo, fixou a concentração do padrão em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PTU e as concentrações dos concomitantes nas proporções seguintes: 1:1 e 1:10 (analito:interferente). As respostas foram comparadas com os resultados obtidos utilizando apenas uma solução padrão de PTU. As recuperações obtidas mostraram que estes compostos não interferem na determinação do PTU nas condições de trabalho utilizadas, uma vez que não foram observadas variações significativas acima de 4% no sinal analítico com as adições dos interferentes..

4.4.10 Estudo da Repetibilidade

Foi estudada a repetibilidade intra-dias para o eletrodo MWCNTs-PAH/GC, por meio de determinações sucessivas (n = 10) para uma solução de concentração de PTU $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em eletrólito suporte tampão BR (pH 2,0), aplicando-se um potencial de acumulação de 1,0 V durante 60 s. O desvio

padrão relativo para essas medidas foram de 0,8%, mostrando assim boa repetibilidade. A repetibilidade inter-dias foi realizada em 3 diferentes dias ($n=5$) com diferentes filmes de MWCNTs-PAH/GC usando a mesma dispersão de MWCNTs-PAH, nas mesmas condições citadas acima, obtendo-se um desvio padrão relativo de 3,6%.

A estabilidade do eletrodo de MWCNTs-PAH/GC, também foi investigada para uma concentração de PTU de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão BR (pH 2,0), aplicando-se 1,0 V durante 60 s. Após 65 ciclos de varredura, a corrente anódica diminuiu cerca de 8,0%, podendo ser assim então, que o eletrodo apresentou boa estabilidade que pode ser estar relacionada à interação eletrostática entre os grupos carboxílicos dos MWCNTs funcionalizados com os grupos amino protonados contidos na cadeia de polieletrólito PAH.

4.4.11 Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos para o PTU

Utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, calculou-se o número de elétrons (n), da etapa determinante, envolvidos na reação de oxidação do PTU e o valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s), sobre o eletrodo MWCNTs-PAH/GC.

Realizou-se um estudo em diferentes velocidades de varredura, de 20 a 400 mV s^{-1} , para uma concentração de PTU de $1,0 \times 10^{-4}$ em solução de tampão BR (pH 2). Na FIGURA 4.25 é apresentado o gráfico que relaciona o potencial de oxidação (E) em função de $\ln v$.

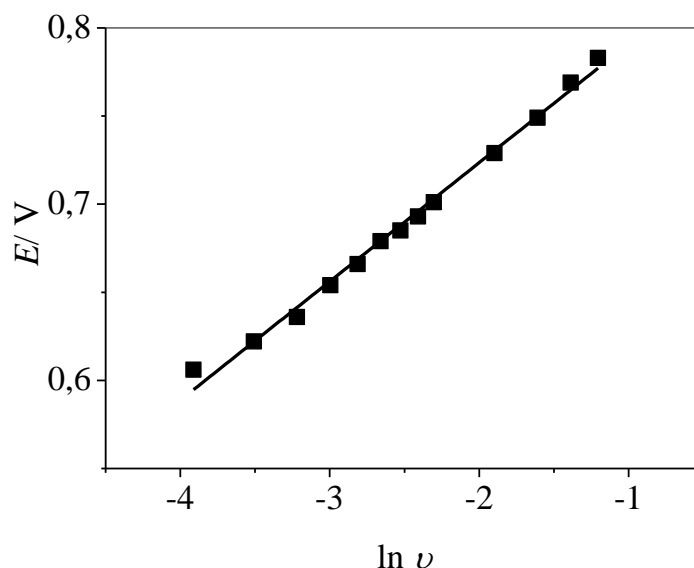


FIGURA 4.25 – Relação do potencial de oxidação em função de $\ln v$, para uma concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PTU em tampão BR (pH 2,0).

Com esse estudo foi possível calcular o número de elétrons envolvidos na oxidação para o PTU, e obter a valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) para eletrodo de MWCNTs-PAH/GC, aplicando-se a teoria Laviron para processos irreversíveis:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left(\frac{RTk_s}{\alpha nF} \right) + \frac{RT}{\alpha nF} \ln v \quad (\text{Eq. 3})$$

sendo v a velocidade de varredura, E^0 o potencial formal redox, $T = 298 \text{ K}$, $R = 8,314 \text{ mol J}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e $F = 96,480 \text{ C mol}^{-1}$. Um valor de E^0 igual a 0,591 foi determinado a partir da intersecção de E vs v . extrapolando v para 0. Com base no valor obtido para a inclinação da reta do gráfico de E vs. $\ln v$ de 0,067 foi possível calcular o número de elétrons envolvidos na etapa determinante para a oxidação, e o valor encontrado foi de 1 elétron.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e, com base nos estudos encontrados na literatura sobre a oxidação eletroquímica do PTU em meio ácido⁶⁶ e /ou com moléculas semelhantes¹¹⁹⁻¹²² é apresentado um mecanismo de reação, FIGURA 4.26. No mecanismo proposto, PTU é oxidado, formando um radical livre (FIGURA 4.26 (A)), seguido pela dimerização do radical com formação do dissulfureto (-S-S-) (FIGURA 4.26

(B)), que posteriormente foi reduzido na superfície do eletrodo MWCNTs-PAH/GC, obtendo-se o pico catódico e o analito PTU de partida (FIGURA 4.26 (C))¹²².

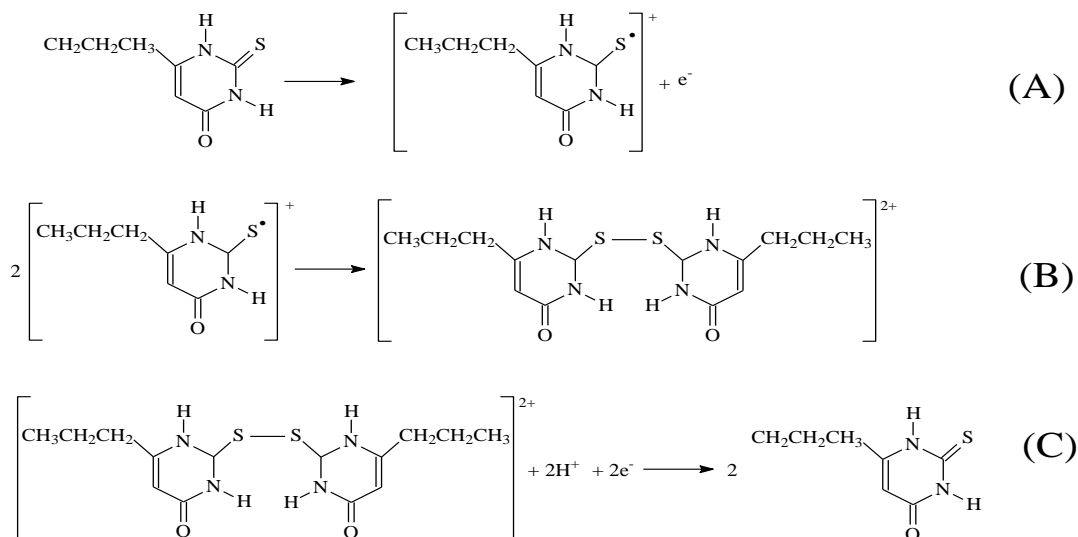


FIGURA 4.26 – Mecanismo de reação para a oxidação e redução do PTU.

Os valores calculados para constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) foi de $1,29 \text{ s}^{-1}$

4.5 Determinação de Propranolol (PROP)

4.5.1 Estudo do Comportamento Voltamétrico do PROP

Empregando-se voltametria cíclica, foi feito um experimento para verificar o comportamento eletroquímico do PROP nos seguintes eletrodos: carbono vítreo (GC), carbono vítreo com o filme de PAH (PAH/GC) e carbono vítreo com PAH e nanotubos de carbono (MWCNTs-PAH/GC). As condições experimentais foram: ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de agitação de 180 s e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Na FIGURA 4.27 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se os eletrodos supramencionados. Como pode ser observado nesta figura, os eletrodos PAH/GC e GC não apresentaram pico de oxidação, e ao se empregar o eletrodo MWCNTs-PAH/GC, observa-se um pico anódico da oxidação do

PROP, em um potencial de 0,93 V. Com os CNTs imobilizados no filme polimérico o processo eletroquímico é evidenciado por conta da transferência de elétrons entre o analito e a superfície do eletrodo modificado.

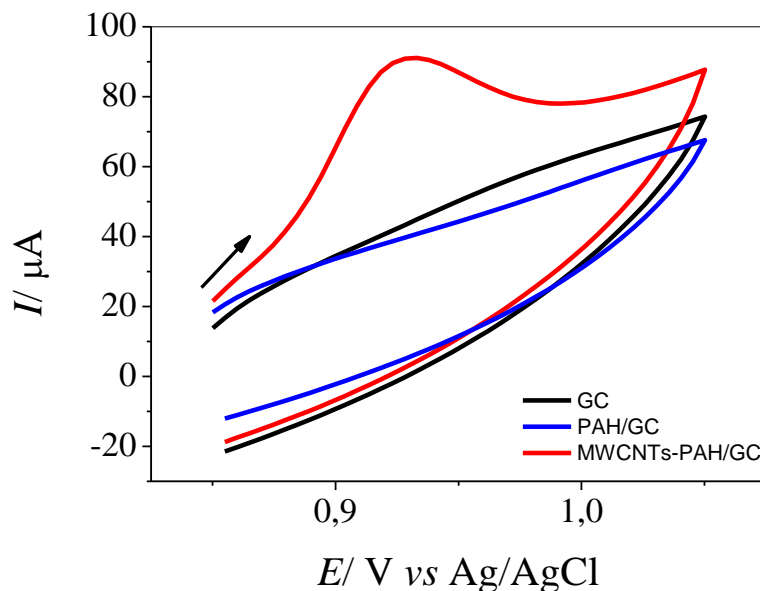


FIGURA 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ empregando-se os eletrodos com e sem modificação da superfície: GC(—), PAH/GC (—) e MWCNTs-PAH/GC (—) modificado.

Neste estudo pode ser observado que o processo de oxidação do PROP na superfície do eletrodo MWCNTs-PAH/GC, não é acompanhado pela redução, concluindo-se assim, que o processo de oxidação para o PROP no eletrodo proposto é irreversível^{88,89}.

Considerando-se que há adsorção do analito na superfície do eletrodo modificado com CNTs, desenvolveu-se um método de redissolução anódica com pré-concentração do PROP.

4.5.2 Tempo de Pré-Concentração

No estudo do tempo de pré-concentração do PROP sobre a superfície do eletrodo MWCNTs-PAH/GC, empregou-se a técnica de voltametria cíclica para uma solução de PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 50

mV s^{-1} . Neste estudo a pré-concentração foi feita em circuito aberto, ou seja, sem aplicação de potencial. Na FIGURA 4.28 (A) são mostrados os voltamogramas obtidos para a técnica de CV nos tempos de pré-concentração variando de 60 a 240 s. Como pode ser observado na FIGURA 4.28 (B), o tempo de pré-concentração que proporcionou a maior magnitude do sinal analítico e maior repetibilidade dos resultados foi o tempo de pré-concentração de 180 s. Em tempos superiores não houve uma variação significativa da intensidade de corrente de pico de oxidação do PROP, devido provavelmente a saturação da superfície do eletrodo de trabalho com o analito.

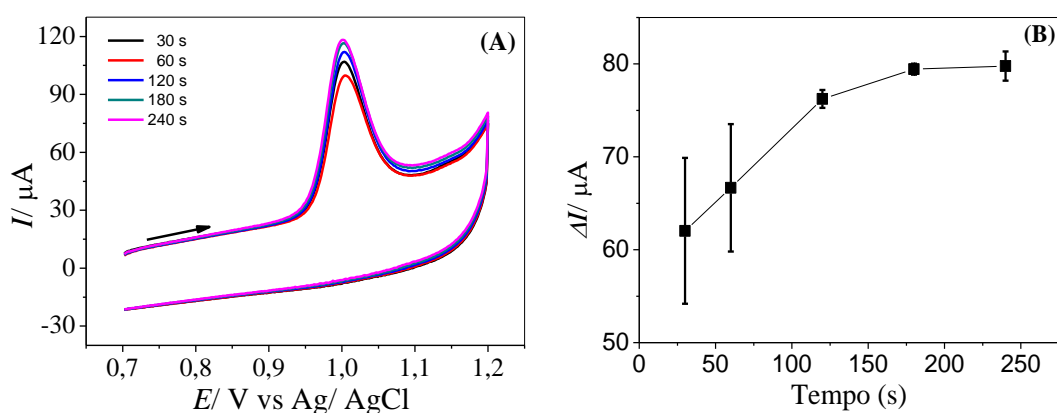


Figura 4.28 – (A) Voltamogramas cíclicos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} PROP em ácido sulfúrico $0,1$ mol L^{-1} com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação da magnitude do sinal analítico com o tempo de pré-concentração.

4.5.3 Estudo do Eletrólito Suporte

Utilizando a técnica de voltametria linear de redissolução anódica, foram estudados os eletrólitos suportes, a saber: tampão fosfato em diferentes pHs e ácido sulfúrico $0,1$ mol L^{-1} , os voltamogramas obtidos são apresentados na FIGURA 4.29 (A). O eletrólito que proporcionou a melhor resposta em termos de intensidade do sinal analítico e melhor definição do pico de oxidação foi o ácido sulfúrico. Portanto, o meio eletrolítico selecionado para a realização das medidas voltamétricas foi o ácido sulfúrico.

Após selecionar o ácido sulfúrico como eletrólito suporte, estudou-se a influência da concentração desse eletrólito suporte sobre o sinal analítico. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 4.29 (B). Observa-se que o potencial de oxidação é influenciado pela variação da concentração do ácido sulfúrico. Nota-se, no entanto, que não houve uma variação significativa da intensidade da corrente de pico com o aumento da concentração do eletrólito acima da concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante o sinal analítico em concentrações superiores. Como não houve uma melhora significativa na magnitude do sinal analítico, optou-se em utilizar a solução de ácido sulfúrico de menor concentração (consumo menor de reagente para o tratamento após o seu emprego), mas que oferecesse um bom desempenho analítico para a determinação de PROP, como foi o caso do H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

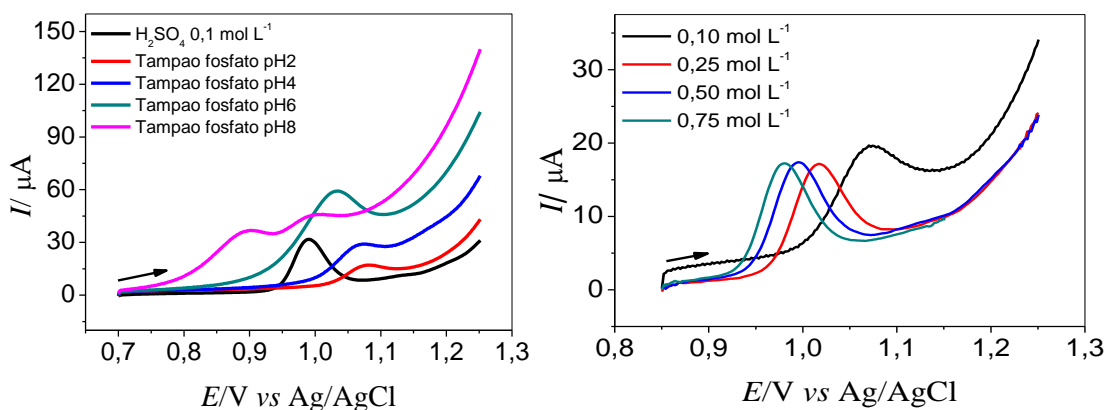


FIGURA 4.29 – (A) Voltamogramas obtidos para o PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, (B) diferentes concentrações de solução de H_2SO_4 .

4.5.4 Otimização dos Parâmetros Voltamétricos para a Determinação de PROP.

As técnicas voltamétricas de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV) e de pulso diferencial (DPAdASV) foram avaliadas, com o objetivo de se obter melhores sensibilidade e linearidade e menor limite de detecção para a determinação de PROP. Os parâmetros estudados e os

selecionados para a SWAdASV e DPAdASV são apresentados nas TABELA 4.12 e TABELA 4.13.

TABELA 4.12 – Parâmetros investigados da técnica SWAdASV e os valores selecionados para a determinação de PROP

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência (Hz)	10 – 50	40
Amplitude (mV)	5 – 60	30
Incremento de Varredura (mV)	1 – 7	5

TABELA 4.13 – Parâmetros investigados da técnica DPAdASV e os valores selecionados para a determinação de PROP

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	5 – 90	90
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	40
Tempo de modulação (ms)	5 – 30	5

4.5.5 Curvas Analíticas

Após a otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas de redissolução anódica, construíram-se as curvas analíticas adicionando-se alíquotas da solução padrão de PROP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de eletrólito suporte H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.30 (A) e (B) são apresentados os voltamogramas obtidos empregando-se as técnicas de onda quadrada (A) e de pulso diferencial (B) para diferentes concentrações de PROP e as respectivas curvas analíticas (inserido).

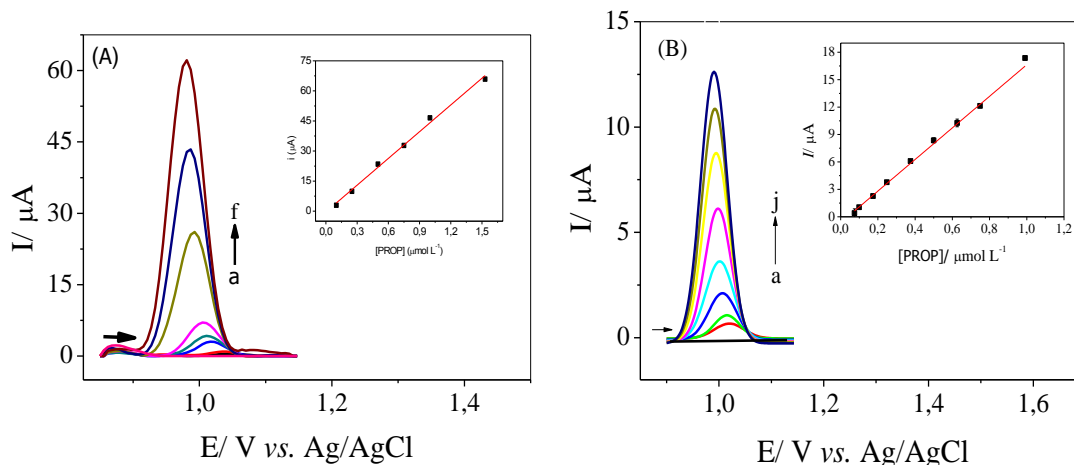


FIGURA 4.30 – (A) Voltamogramas obtidos para a técnica SWAdASV para o PROP em H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,10; (c) 0,25; (d) 0,50; (e) 0,75; (f) 1,00; (g) 1,50 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ de PROP. (B) Voltamogramas obtidos para a técnica de DPAdASV para o PROP em H₂SO₄ 0,25 mol l⁻¹, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,075; (c) 0,100; (d) 0,175; (e) 0,250; (f) 0,380; (g) 0,500; (h) 0,630, (i) 0,750 e (j) 1,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ de PROP. Inseridos nos gráficos a relação da concentração com a corrente de pico.

Na TABELA 4.14 são apresentados os resultados obtidos para as técnicas de SWAdASV e de DPAdASV, tais como equação da reta, linearidade de concentração de PROP, coeficiente de correlação (r) e limite de detecção (LD). O limite de detecção foi calculado pelo desvio padrão de dez voltamogramas do branco multiplicado por três, dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

TABELA 4.14 – Resultados obtidos para diferentes técnicas voltamétricas para a quantificação do PROP

Resultados	SWAdASV	DPAdASV
Eq. da Reta	$-3,5 \times 10^{-7} + 44 [C/ \mu\text{mol L}^{-1}]$	$-8,1 \times 10^{-7} + 19 [C/ \mu\text{mol L}^{-1}]$
Linearidade/ mol L ⁻¹	1,0 × 10 ⁻⁷ a 1,5 × 10 ⁻⁶	7,5 × 10 ⁻⁸ a 1,0 × 10 ⁻⁶
r	0,994	0,998
LD (mol L ⁻¹)	7,5 × 10 ⁻⁸	6,3 × 10 ⁻⁸

Ambas as técnicas voltamétricas apresentaram boas linearidades e sensibilidades, com bons limites de detecção, porém a técnica de DPAdASV apresentou uma faixa linear com concentrações menores para o PROP em relação a técnica de SWAdASV e um menor limite de detecção. Sendo assim, a DPAdASV foi selecionada para a determinação de PROP em amostras farmacêuticas.

Os resultados obtidos utilizando o método proposto (desempenho analítico) foram comparados com outros trabalhos encontrados na literatura que utilizam métodos eletroanalíticos para determinação de PROP. Na TABELA 4.15 são apresentados estas comparações.

TABELA 4.15 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos com diferentes eletrodos e/ou técnicas voltamétricas para a determinação de PROP

Eletrodo	Técnica	Linearidade (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	Referências
Au	DPV	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$	85
GC	DPV	$4,0 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-6}$	86
Nafion/GC	SWAdASV	$8,0 \times 10^{-8} - 6,0 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-8}$	87
MWCNTs/SR	DPV	$5,0 \times 10^{-7} - 7,0 \times 10^{-6}$ (DPV); $3,0 \times 10^{-7} - 5,4 \times 10^{-6}$ (SWV)	$1,2 \times 10^{-7}$ (DPV)	88
	e		$7,8 \times 10^{-8}$ (SWV)	
	SWV			
BDD	SWV	$2,0 \times 10^{-7} - 9,0 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$	89
MWCNTs-PAH/GC	DPAdASV	$7,5 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6}$	$6,3 \times 10^{-8}$	Método Proposto

Pode-se observar na TABELA 4.15 que o método proposto apresentou melhor resposta em termos de linearidade de concentração da curva analítica e LD em comparação aos métodos que utilizam os eletrodos sólidos como Au, GC e BDD e com os eletrodos modificados MWCNTs/SR, Náfion/GC. Desta maneira, pode se concluir que o método proposto para a

determinação PROP em formulação farmacêutica utilizando o eletrodo MWCNTs-PAH/GC apresentou boa linearidade e baixo LD.

4.5.6 Estudo da Repetibilidade

O estudo da repetibilidade intra-dias e inter-dias para o método proposto foram avaliados para uma solução padrão de PROP $1,0 \times 10^{-7}$ em ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo da repetibilidade intra-dias, um conjunto de 10 medidas ($n=10$) foram realizadas nas mesmas condições experimentais e com o mesmo eletrodo, sendo o valor calculado do desvio padrão relativo (RSD) de 3,3%. A repetibilidade inter-dias foi avaliada por medidas durante cinco diferentes dias ($n=5$), e para cada dia o filme foi renovado com a mesma dispersão de MWCNTs-PAH e o RSD calculado foi de 4,8%.

4.5.7 Estudo de Adição e Recuperação

Foram calculados as porcentagens de recuperação para adições de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de PROP em eletrólito suporte. As porcentagens de recuperação variaram entre 99,7 % e 105% como é apresentado na TABELA 4.16.

TABELA 4.16 - Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de PROP

Amostras	[PROP] $\times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$		%
	Adicionado	Recuperado	
A	1,00	1,01	101
	5,00	5,19	104
B	1,00	99,7	99,7
	5,00	5,14	103
C	1,00	1,05	105
	5,00	5,08	102

Estes valores indicam que não há interferência significativa da matriz das amostras na determinação de PROP empregando o método voltamétrico proposto.

4.5.8 Análises das amostras

O método de DPAdASV foi aplicado para determinação de PROP em formulações farmacêuticas, e os resultados obtidos foram comparados com aqueles empregando-se o método padrão da Farmacopéia Brasileira (espectrofotométrico). Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 4.17.

TABELA 4.17 - Resultados obtidos na determinação de PROP em amostras comerciais para o método proposto e método da Farmacopéia Brasileira⁸⁴

Amostras	PROP (mg/comprimido)		Erro relativo ^b (%)
	Espectrofotométrico ^a	Voltamétrico ^a	
A/	10±0,8	10±1,2	0,0
B	40±1,3	39±0,5	-2,5
C	80±1,3	81±0,5	+1,3

^a n = 3 medidas;

^b [100 × ((método Voltamétrico – método Espectrofotométrico) / método Espectrofotométrico)]

Para avaliar os níveis de confiança entre os resultados obtidos empregando-se os dois procedimentos, aplicou-se o teste *t-pareado*. Foi calculado um $t_{\text{exp}} = 0,17$, valor menor que o $t_{\text{crítico}} (3,18, \alpha = 0,05)$. Sendo assim, os resultados da determinação de PROP obtidos empregando-se o método voltamétrico e o método espectrofotométrico, recomendado pela Farmacopeia Brasileira, não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95 % e, estão dentro de um erro relativo aceitável, no caso variaram de -2,5 a 1,3 %.

4.5.9 Estudo dos Parâmetros Eletroquímicos do PROP

A FIGURA 4.31 são apresentados os voltamogramas obtidos em diferentes velocidades de varredura para uma concentração de PROP de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ com eletrodo de trabalho MWCNTs-PAH/GC .

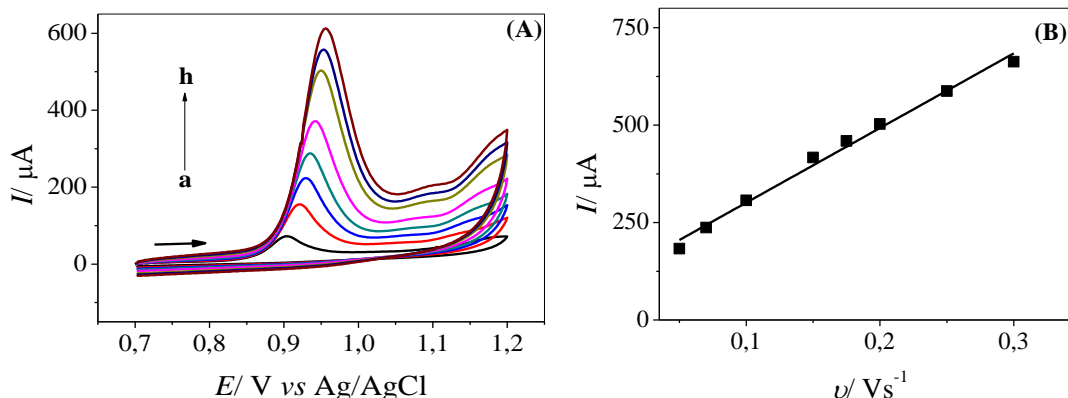


FIGURA 4.31 – (A) Voltamogramas cíclicos nas velocidades de (a) 10, (b) 50, (c) 100, (d) 150; (e) 175; (f) 200; (g) 250 e (h) 300 mV s^{-1} em ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e concentração de PROP de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. (B) a relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura.

Observa-se que o potencial de oxidação do PROP deslocou-se para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, característica de um sistema irreversível^{106,107}.

Empregando-se a relação da corrente de pico com a velocidade de varredura é possível determinar a área de recobrimento (Γ_o) do PROP adsorvido sobre a superfície do eletrodo MWCNTs-PAH/GC de acordo com a Equação 2^{106,116}.

$$I = \frac{n^2 F^2 \Gamma_o A}{4RT} v \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo A a área geométrica, n o número de elétrons, v a velocidade de varredura, F a constante de Faraday. O valor calculado para área de recobrimento (Γ_o) foi de $2,61 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^2$, assumindo-se que a adsorção foi

em uma única camada, pode-se calcular que a área que uma molécula de PROP ocupa na superfície do eletrodo foi de cerca de $6,38 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$.

Neste estudo, determinou-se também o valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) empregando-se a equação de Laviron¹⁰⁶. Na FIGURA 4.32 é apresentado o gráfico do potencial de oxidação (E) em função de $\ln v$.

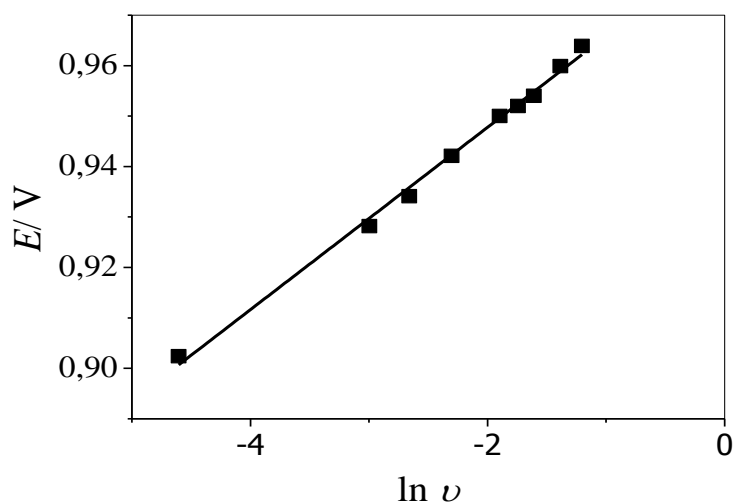


FIGURA 4.32 – Dependência linear de E com o $\ln v$, utilizando a o eletrodo MWCNTs-PAH/GC para uma concentração de PROP $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Utilizando-se a equação da reta do gráfico, $E/V = 0,984 + 0,018 \ln v$; $r = 0,995$, dos potenciais de pico anódico vs. $\ln v$, FIGURA 4.32, pode-se substituir os valores na Eq. 3 para processos irreversíveis¹⁰⁶, e calcular a constante de transferência de elétrons (k_s) para o eletrodo MWCNTs-PAH/GC.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{RTk^0}{\alpha nF} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln v \quad (Eq. 3)$$

Assim, com o valor obtido para o coeficiente angular (0,029) e utilizando $T = 298 \text{ K}$, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, e $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$ o valor calculado para αn foi de 1,46. O valor de E^0 foi determinado a partir do coeficiente linear do gráfico de E_p vs v . Extrapolando v para 0, obtém se o valor de E^0 igual a 0,904 V. Sabendo que na oxidação do PROP envolve 2 elétron^{123,124} pode se estimar o valor de α , que foi igual a 0,73, e o valor

calculado para constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) foi de $0,95 \text{ s}^{-1}$. Nos trabalhos citados na literatura não há menção dos valores de k_s , ficando assim prejudicada uma comparação do valor obtido neste trabalho de tese.

4.6 Determinação de VERAPAMIL (VPM)

4.6.1 Estudo do Comportamento Voltamétrico do VPM

Utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, verificou-se o comportamento eletroquímico do VPM para os eletrodos, com e sem modificação, GC, PAH/GC e MWCNTs-PAH/GC, nas seguintes condições experimentais: VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de agitação inicial de 120 s e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas obtidos são apresentados na FIGURA 4.33 para os eletrodos mencionados. Como pode ser observado para os eletrodos GC e PAH/GC não é exibido um aumento de corrente anódica. Por outro lado, ao se utilizar o eletrodo MWCNTs-PAH/GC observa-se um aumento significativo da corrente de pico de oxidação desse princípio ativo em um potencial de 1,087 V, demonstrando que a utilização dos MWCNTs imobilizados na superfície do GC, facilitam a transferência de elétrons. Também foi observado que o processo de oxidação do VPM não é acompanhado do pico de redução, o que indica que a reação de oxidação do VPM é um processo irreversível, corroborando com os resultados obtidos na literatura^{102,103}.

Considerando-se que há adsorção do analito na superfície do eletrodo modificado com MWCNTs, desenvolveu-se um método de redissolução com pré-concentração do VPM.

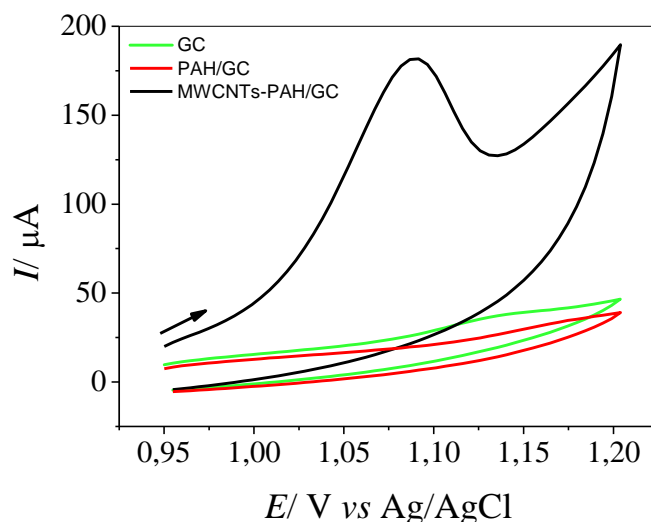


FIGURA 4.33 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de VPM em ácido sulfúrico $0,1$ mol L^{-1} a uma velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$ com tempo de agitação inicial de 120 s, para os eletrodos GC (—), PAH/GC (—) e MWCNTs-PAH/GC (—). os diferentes eletrodos

4.6.2 Estudo do Eletrólito Suporte

Foi estudado a influencia dos eletrólitos suporte sobre o sinal analítico para a oxidação do VPM, utilizando a técnica de voltametria linear. Os eletrólitos estudados foram: tampão fosfato, pH 2,0 e 4,0; ácido sulfúrico $0,1$ mol L^{-1} e tampão BR (pH 2,0), com velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$ e tempo de pré-concentração de 120 s, sendo os voltamogramas apresentados na FIGURA 4.34 (A). O eletrólito que proporcionou a melhor resposta em termos de magnitude do sinal analítico foi o ácido sulfúrico, apesar do potencial de oxidação do VPM estar deslocado para potencias mais positivos. No entanto, esse eletrólito foi aquele que proporcionou uma melhor definição do pico de oxidação, bem como um aumento significativo do sinal analítico em relação aos outros eletrólitos estudados, sendo assim selecionado. Após selecionar o ácido sulfúrico como eletrólito suporte, estudou-se a influência da concentração desse eletrólito suporte sobre o sinal analítico. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 4.34 (B). Observa-se que o potencial de oxidação é pouco influenciado pela variação da concentração do ácido sulfúrico e um aumento significativo da intensidade da

corrente de pico com o aumento da concentração do eletrólito até a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante o sinal analítico em concentrações superiores. Portanto, o eletrólito e a concentração selecionados para a determinação de VPM foi o H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

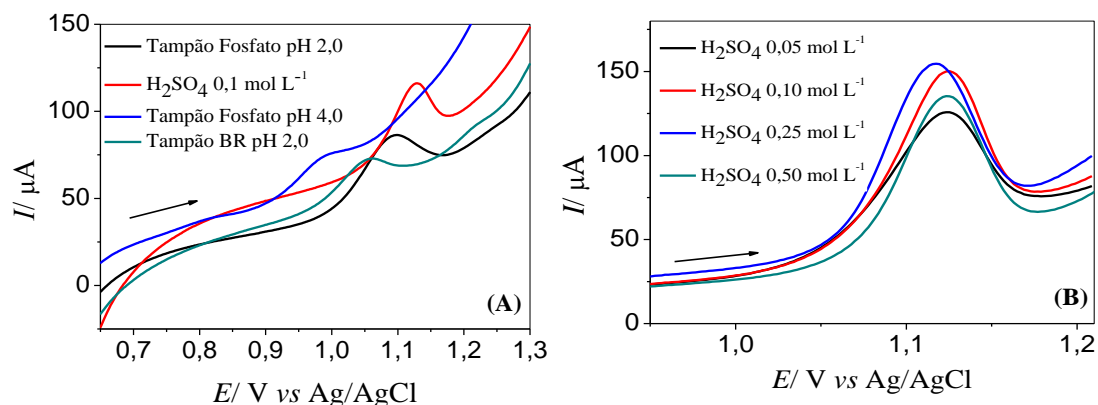


FIGURA 4.34 – Voltamogramas de cíclicos para o VPM $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} em diferentes eletrólitos suporte, (B) voltamogramas obtido em diferentes concentrações de ácido sulfúrico.

4.6.3 Tempo de Pré-Concentração

As condições experimentais para o estudo do tempo de pré-concentração foram: concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM em eletrólito suporte de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e pré-concentração em circuito aberto (sem aplicação de potencial). Na FIGURA 4.35 (A) são apresentados os voltamogramas obtidos para a técnica de voltametria linear, nos tempos de pré-concentração variando de 30 a 180 s. Como pode ser observado na FIGURA 4.35 (B), o tempo de pré-concentração que proporcionou a melhor resposta quanto a intensidade de sinal e boa repetibilidade foi o tempo de 150 s, acima desse tempo, o sinal de corrente pico de oxidação para VPM não variou significativamente.

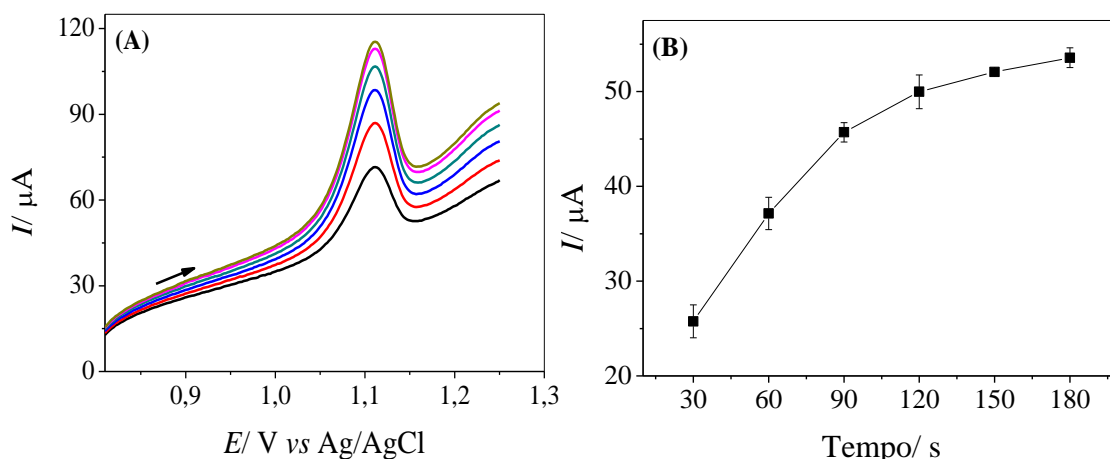


FIGURA 4.35 – (A) Voltamogramas obtidos para a oxidação de VPM em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ em diferentes tempos de pré-concentração. (B) Variação do pico de corrente com o tempo de pré-concentração

4.6.4 Estudo dos Parâmetros Voltamétricos para Determinação do VPM

Foram estudados os parâmetros para as técnicas de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWAdASV) e voltametria de pulso diferencial (DPAdASV). Na TABELA 4.18 são apresentados os parâmetros estudados e os valores selecionados para técnica SWAdASV e DPAdASV. Nesses estudos foram empregados um tempo de pré-concentração de 150 s, ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e o eletrodo MWCNTs-PAH/GC.

TABELA 4.18 – Parâmetros otimizados para a técnica de SWAdASV

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência (Hz)	10 – 60	40
Amplitude (mV)	5 – 50	35
Incremento de Varredura (mV)	1 – 9	7

A seguir são apresentados na TABELA 4.19 os intervalos de valores estudados para cada parâmetro e as melhores condições para a técnica de voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial.

TABELA 4.19 – Parâmetros otimizados para DPAdASV.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	10 – 90	70
Amplitude de pulso (mV)	5 – 140	90
Tempo de modulação (ms)	5 – 25	9

4.6.5 Curvas Analíticas

Com a otimização dos parâmetros para as técnicas estudadas construíram-se as curvas analíticas e a escolha da técnica voltamétrica para determinação de VPM foi aquela que apresentou boa sensibilidade e maior linearidade de concentração da curva analítica. A Figura 4.36 apresenta os voltamogramas e as suas respectivas curvas analíticas obtidas para as técnicas de SWAdASV (A) e DPAdASV(B).

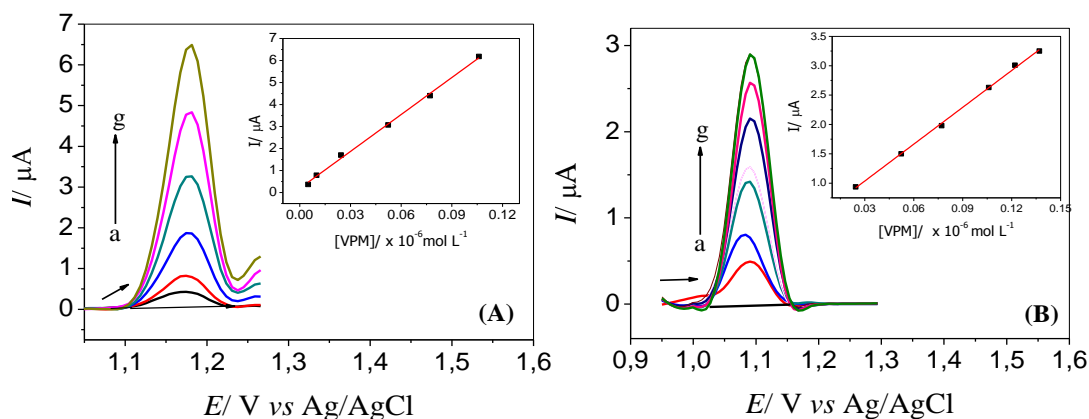


FIGURA 4.36 – A) Voltamogramas obtidos para a técnica de SWAdASV para o VPM em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,005; (c) 0,010; (d) 0,030; (e) 0,050; (f) 0,075; (g) $0,100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM. (B) Voltamogramas obtidos para a técnica de DPAdASV para o VPM em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (a) branco; e nas concentrações de (b) 0,025; (c) 0,050; (d) 0,075; (e) 0,10; (f) $0,12 \times 10^{-6}$ (g) $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de VPM

A curva analítica obtida para a técnica de SWAdASV teve equação de reta igual a $I/A = 1,9 \times 10^{-6} + 5,6 \times 10^1 C/\text{mol L}^{-1}$, com uma faixa linear de concentração de $5,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, coeficiente de

correlação de 0,994 e limite de detecção de $3,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Para a técnica de DPAdASV a equação da curva analítica obtida foi de $I/A = 4,1 \times 10^{-7} + 2,1 \times 10^1 C/ \text{mol L}^{-1}$ com linearidade de concentração de $2,5 \times 10^{-8}$ a $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, coeficiente linear de 0,992 e limite de detecção de $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. As duas técnicas voltamétricas estudadas, apresentaram boas linearidades e sensibilidades, com bons limites de detecção, porém a técnica de SWAdASV apresentou uma faixa linear com concentrações menores para o VPM em relação a técnica de DPAdASV e um menor limite de detecção, portanto a técnica de SWAdASV foi selecionada para a determinação de VPM em amostras farmacêuticas. Com os resultados obtidos empregando-se o método proposto (desempenho analítico), foi comparado com outros trabalhos encontrados na literatura que utilizam métodos eletroanalíticos para determinação de VPM. Na TABELA 4.20 são apresentadas estas comparações.

TABELA 4.20 – Comparação do desempenho analítico obtido neste trabalho com aquele obtido em diversos métodos propostos na literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear (mol L⁻¹)	LD (mol L⁻¹)	Ref
		$2,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$		
GSR	DPV e SWV	(DPV); $2,0 \times 10^{-6} - 1,40 \times 10^{-5}$ (SWV)	$7,0 \times 10^{-7}$ (DPV e SWV)	102
HMDE	LSV	$1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-9}$	103
GC	DPV	$8,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-7}$ (DPV)	104
	SWV		$1,3 \times 10^{-7}$ (SWV)	
MWCNTs- PAH/GC	SWAdASV	$5,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-9}$	Método Proposto

Pode-se observar na TABELA 4.20 que o método proposto apresentou melhor resposta em termos de linearidade de concentração da

curva analítica e LD em comparação com métodos citados que utilizam diferentes eletrodos.

4.6.6 Estudo da Repetibilidade

O estudo da repetibilidade intra e inter-dia para o método proposto foi realizado com uma solução padrão de VPM $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para o estudo da repetibilidade intra-dia, um conjunto de 10 medidas ($n=10$) foram realizadas nas mesmas condições experimentais e com o mesmo eletrodo, sendo o valor calculado do desvio padrão relativo (RSD) de 4,8 %. A repetibilidade inter-dias foi avaliada por medidas durante quatro diferentes dias ($n=4$), e para cada dia o filme foi renovado com a mesma dispersão de MWCNTs-PAH e o RSD calculado foi de 4,5 %.

4.6.7 Estudo de Adição e Recuperação

Foram avaliados o efeito da matriz das amostras na determinação do VPM. O estudo de adição e recuperação foi realizado por adição de quantidades conhecidas de soluções padrão de VPM em soluções de três amostras farmacêutica, sendo a concentração final de VPM determinada empregando o método proposto. As recuperações do analito variaram de 98,8 a 103 %, como é apresentado na TABELA 4.21, indicando assim que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de VPM empregando-se o método proposto.

TABELA 4.21 – Resultados obtidos no estudo de adição e recuperação para diferentes concentrações de VPM

Amostras	[VPM] × 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹		%
	Adicionado	Recuperado	
A	2,50	2,54	102
	5,00	5,19	103
B	2,50	2,48	101
	5,00	4,96	99,2
C	2,50	2,47	98,8
	5,00	4,98	99,6

4.6.8 Aplicação do Método Proposto na Determinação de VPM em Formulações Farmacêuticas

Empregou-se a técnica de SWAdASV para determinação e VPM em formulações farmacêuticas. Na TABELA 4.22 são apresentados os teores de VPM determinados em comprimidos comerciais empregando o método proposto e o método espectrofotométrico preconizado pela Farmacopéia Brasileira⁸⁴.

Foram realizadas três determinações para cada amostra, e calculados os desvios padrões para essas determinações. Como pode ser visto nessa tabela, não foram observadas diferenças significativas entre os métodos proposto e o de referência. Aplicando-se o teste t pareado com os resultados obtidos usando ambos os métodos, os valores de t calculados (0,651) foram menores do que o valor crítico (3,18, $\alpha = 0,5$), podendo-se concluir assim que os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto estão em concordância com aqueles obtidos empregando-se o método de referência, a um nível de confiança de 95%.

TABELA 4.22 – Determinação de VPM em formulações farmacêuticas pelo método proposto usando MWCNTs-PAH/GC, e pelo método preconizado pela Farmacopéia Brasileira⁸⁴.

Amostras	VPM (mg comprimido ⁻¹)			Erro Relativo ^[b] (%)
	Valor Rotulado	Método de Referencia ^[a]	Método Proposto ^[a]	
A	40	39,8 ± 1	39,9 ± 0,5	+0,3
B	40	39,1 ± 1	39,3 ± 1	+0,5
C	40	40,9 ± 2	39,9 ± 1	-2,4

[a] n=3.

[b] $[100 \times (\text{Método Proposto} - \text{Método de Referencia})] / \text{Método de Referencia}$.

4.6.9 Estudo Eletroquímico para VPM

Empregando-se voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura foi possível obter informações do sistema eletroquímico como o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação do VPM, a constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) e a área de recobrimento (Γ_o) do eletrodo de MWCNTs-PAH/GC para VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 4.37 pode-se observar os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial para a técnica de voltametria cíclica para uma solução de VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

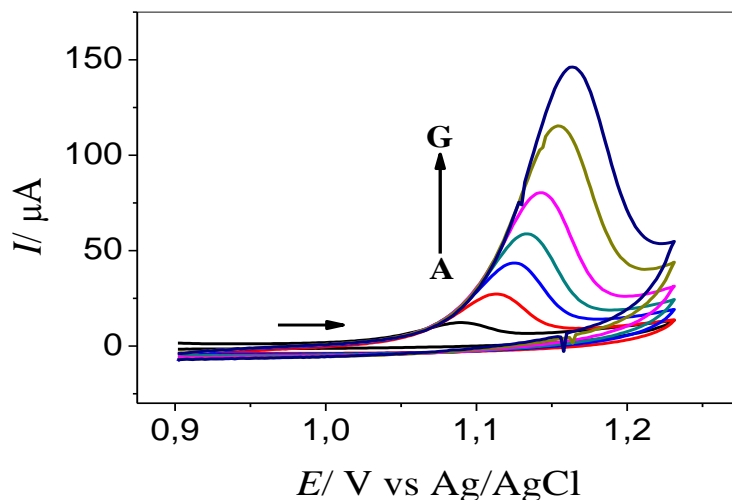


FIGURA 4.37 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial de (A) 0,01; (B) 0,03; (C) 0,05; (D) 0,07; (E) 0,10; (F) 0,15 e (G) 0,20 V s^{-1} para uma solução de VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 4.38 (A) é apresentada a relação da corrente de pico (I) com a velocidade de varredura (ν) para uma solução de VPM de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se uma relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura, característico de processos adsortivos. Essa característica também pode ser observada na FIGURA 4.38 (B), cujo valor encontrado para a inclinação da reta (coeficiente angular) é de 0,9, valor próximo de 1,0, indicando assim que o processo é controlado por adsorção¹⁰⁷.

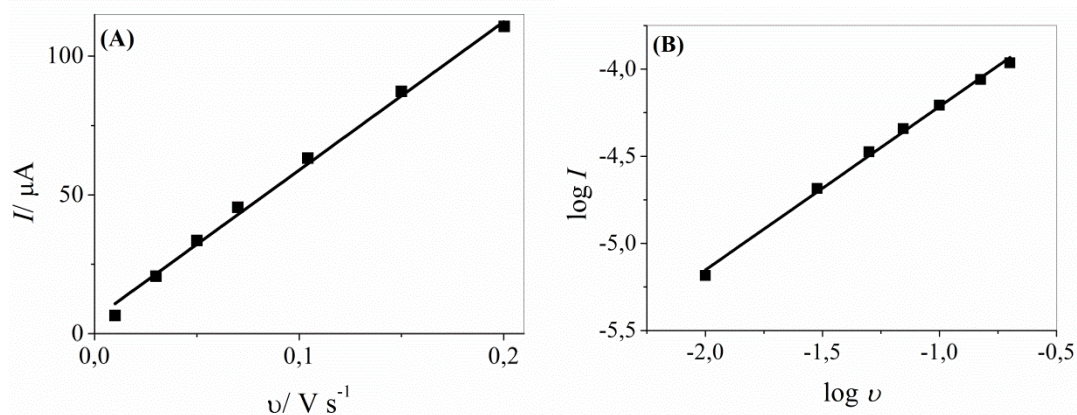


FIGURA 4.38 – (A) Dependência linear da com corrente com o a velocidade de varredura utilizando a MWCNTs-PAH/GC para VPM $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em

solução ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ em diferentes velocidades, (B) Relação de log *I* por log *v*.

Por meio desta relação da corrente de pico com a velocidade de varredura é possível determinar a área de recobrimento (Γ_o) para o VPM adsorvido sobre a superfície do eletrodo MWCNTs-PAH/GC de acordo com a Equação 2^{106,116}.

$$I = \frac{n^2 F^2 \Gamma_o A}{4RT} v \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo *A* a área geométrica, *n* o número de elétrons, *v* a velocidade de varredura, *F* a constante de Faraday. O valor calculado para área de recobrimento (Γ_o) foi de 7,26 x 10⁻¹⁰ mol cm², assumindo-se que a adsorção foi em uma única camada, pode-se calcular a área que uma molécula de VPM ocupa na superfície do eletrodo, sendo a área calculada de cerca de 2,29 x 10⁻¹⁵ cm².

Na FIGURA 4.39 é apresentado o gráfico que relaciona o potencial de oxidação (*E*) em função de ln *v*, utilizando esta relação pode-se obter o valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (*k_s*) empregando-se a equação de Laviron¹⁰⁶.

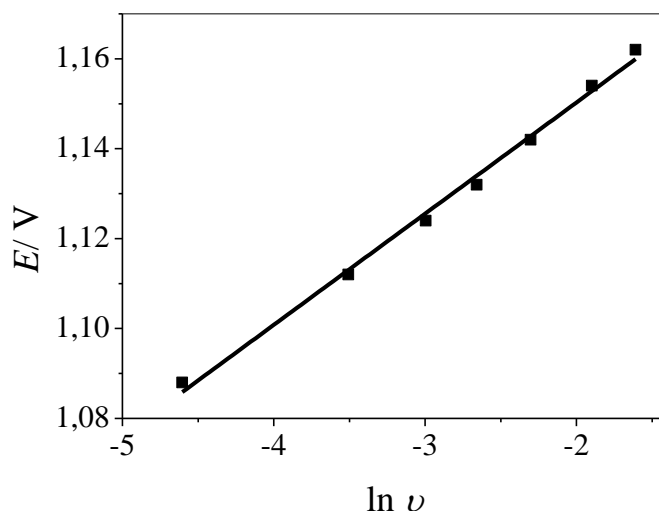


FIGURA 4.39 – Dependência de *E* vs ln *v* para VPM 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹.

Empregando-se a equação da reta obtida do gráfico, $E/V = 1,20 + 0,025 \ln \nu$; $r = 0,994$, E vs. $\ln \nu$, FIGURA 4.14, pode se substituir os valores na Eq. 3 para processos irreversíveis¹⁰⁶, e calcular a constante de transferência de elétrons (k_s) para o eletrodo proposto MWCNTs-PAH/GC.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left(\frac{RTk^0}{\alpha nF} \right) + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \nu$$

O valor obtido para o coeficiente angular foi de 0,025, e utilizando $T = 298$ K, $R = 8,314$ J K⁻¹ mol⁻¹, e $F = 96485$ C mol⁻¹, o valor calculado para αn foi de 0,97. O valor de E^0 foi determinado a partir da intersecção de E vs. ν . Extrapolando ν para 0, obtém se o valor de E^0 igual a 1,105 V. Sabendo que é 1 elétron¹⁰²⁻¹⁰⁴ na oxidação do VPM envolvido pode se estimar o valor de α , que foi igual a 0,97, e o valor calculado para constante heterogênea de transferência de elétrons (k_s) foi de 1,08 s⁻¹, não sendo possível comparar com os valores da literatura por falta destes estudos em outros trabalhos.

Capítulo 5 – CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho de tese verificou-se que os métodos eletroanalíticos para a determinação de metotrexato (MTX), propiltiouracil (PTU), propranolol (PROP) e verapamil (VPM) em formulações farmacêuticas empregando-se os eletrodos modificados com filmes de MWCNTs/DHP e MWCNTs-PAH apresentaram diversas vantagens em relação a maioria dos métodos eletroanalíticos descritos na literatura.^{55,66,85-89,102-104}

Empregando-se a técnica de DPAdASV e o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs-DHP, a curva analítica para o MTX foi linear no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Uma comparação dos teores de MTX em diversas amostras obtidos empregando-se o método proposto e o cromatográfico¹¹⁵ foram concordantes a um nível de confiança de 95 %. A imobilização dos MWCNTs no filme de DHP na superfície do eletrodo de carbono vítreo possibilitou se trabalhar em menores potenciais de trabalho (menor sobrepotencial) e maior sensibilidade por conta do efeito eletrocatalítico verificado.

A utilização do DHP na formação do filme com MWCNTs observa-se o recobrimento do DHP sobre os MWCNTs (FIGURA 4.3 B), e o aumento da área ativa de cerca de 1,5 vezes maior que aquela encontrada para o GC. Ao se empregar o eletrodo DHP/GC, observou-se diminuição da magnitude do sinal analítico, (FIGURA 4.1B), indicando que o DHP dificulta a transferência de elétrons, obtendo-se uma área ativa menor quando comparada ao eletrodo de GC.

Com a utilização do polieletrólito, hidrocloreto de polialilamina (PAH) para a formação do filme com os MWCNTs sobre o eletrodo de GC, os MWCNTs estão mais expostos como foi observado nas imagens de MEV (FIGURA 4.4 B), e este apresentou um aumento da área ativa de cerca de 3 vezes maior que aquela para o eletrodo de GC. O eletrodo PAH/GC apresentou uma área ativa muito próximo do eletrodo GC (FIGURA 4.2 A e B), indicando que o filme sobre o eletrodo de carbono vítreo não dificultou o transporte do analito até o sensor base, uma vez que as magnitudes de correntes obtidas

empregando-se o eletrodo de GC e o eletrodo CG/PAH foram similares. Sendo assim, o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC foi empregado para o desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos para a determinação de PTU, PROP e VPM.

O efeito eletrocatalítico também é observado para PTU utilizando-se o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC, com deslocamento dos potenciais de oxidação e redução para mais próximos de zero. Empregando-se a técnica LSAdCSV, construiu-se uma curva analítica, que apresentou uma faixa linear de concentração de PTU de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. As quantificações dos teores de PTU nas amostras farmacêuticas comerciais foram realizadas com sucesso, com erros que variaram entre -1,0 e 2,0 % quando comparado com o método preconizado pela Farmacopéia Britânica⁶⁸ (titulação potenciométrica), a um nível de confiança de 95%.

Para o PROP e VPM observou-se um aumento da corrente anódica nos potenciais de 0,930 e 1,08 V respectivamente, ao se utilizar o eletrodo de MWCNTs-PAH/GC, enquanto que para os eletrodos PAH/GC e GC não foi observado um sinal analítico importante, indicando que a presença dos MWCNTs melhorou a resposta voltamétrica quando comparado com os eletrodos de PAH/GC e GC, devido as propriedades dos MWCNTs, como a facilidade de transferência de elétrons e aumento da área superficial.

O método voltamétrico proposto, DPAdASV, para a quantificação do PROP apresentou uma curva analítica de $7,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $6,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Neste intervalo de concentração, foram realizadas com sucesso as determinações do teor do PROP em amostras farmacêuticas comerciais, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos, empregando-se o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira⁸⁴ (espectrofotométrico), apresentando-se erros que variaram entre -2,5 a 1,3 % a um nível de confiança de 95%.

O VPM foi quantificado em amostras comerciais empregando-se a técnica de SWAdASV com o eletrodo MWCNTs-PAH/GC, foi possível obter uma curva analítica com uma linearidade de concentração de VPM mais baixas em relação aos trabalhos encontrados na literatura, e com menor limite de detecção. A linearidade da curva analítica para o VPM foi de $5,0 \times 10^{-9}$ a $5,0$

$\times 10^{-7}$, com limite de detecção de $3,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Os resultados dos teores deste analito em produtos farmacêuticos empregando-se o método proposto com aqueles obtidos empregando-se o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira⁸⁴ (espectrofométrico) não apresentou diferença significativa a um nível de confiança de 95%.

C pítulo 6 – PERSPECTIVAS FUTURAS

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Aplicar o eletrodo estudado na determinação de outros fármacos, e utilizar outras configurações de célula eletroquímica empregando-se sistemas de análises por injeção em fluxo junto com a técnica de múltiplos pulso para determinação simultânea de alguns analitos, sejam eles de importância farmacêutica ou alimentícia. Propor novos eletrodos a partir de materiais nanoestruturados, por exemplo, incorporar nanopartículas metálicas nos CNTs ou no grafeno. Estudar novos filmes poliméricos e polieletrólitos para novos sensores eletroquímicos.

**CAPÍTULO 7 –
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IJIMA, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*. **354**(6348): 56, 1991.
2. KAVAN, L.; DUNSCH, L. & KATAURA, H., "Electrochemical tuning of electronic structure of carbon nanotubes and fullerene peapods". *Carbon*. **42**(5-6): 1011, 2004.
3. IJIMA, S. & ICHIHASHI, T., "Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter". *Nature*. **363**(6430): 603, 1993.
4. BETHUNE, D.S.; KIANG, C.H.; DEVRIES, M.S.; GORMAN, G.; SAVOY, R.; VAZQUEZ, J. & BEYERS, R., "Cobalt-catalyzed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layerwalls". *Nature*. **363**(6430): 605, 1993.
5. ABOURBIH, S.; FILION, K.B.; JOSEPH, L.; SCHIFFRIN, E.L.; RINFRET, S.; POIRIER, P.; PILOTE, L.; GENEST, J. & EISENBERG, M.J., "Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: A systematic review". *Am J Med*. **122**(10): 962, 2009.
6. WONG, E.W.; SHEEHAN, P.E. & LIEBER, C.M., "Nanobeam mechanics: Elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes". *Science*. **277**(5334): 1971, 1997.
7. ZHANG, Z. & RUSLING, J.F., "Electron transfer between myoglobin and electrodes in thin films of phosphatidylcholines and dihexadecylphosphate". *Biophys. Chem*. **63**(2-3): 133, 1997.
8. WEI, Y.L.; SHAO, C. & LIU, J.B., "Voltammetric determination of ethamsylate in bulk solution and pharmaceutical tablet by nano-material composite-film coated electrode". *Mat Sci Eng C-Mater*. **29**(8): 2442, 2009.
9. WEN, X.Q.; FEI, J.J.; CHEN, X.M.; YI, L.H.; GE, F. & HUANG, M.H., "Electrochemical analysis of trifluralin using a nanostructuring electrode with multi-walled carbon nanotubes". *Environ. Pollut*. **156**(3): 1015, 2008.
10. BETHUNE, D.S.; KIANG, C.H.; DEVRIES, M.S.; GORMAN, G.; SAVOY, R.; VAZQUEZ, J. & BEYERS, R., "Cobalt-catalyzed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls". *Nature*. **363**(6430): 605, 1993.
11. JOURNET, C.; MASER, W.K.; BERNIER, P.; LOISEAU, A.; DELACHAPPELLE, M.L.; LEFRANT, S.; DENIARD, P.; LEE, R. & FISCHER, J.E., "Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique". *Nature*. **388**(6644): 756, 1997.
12. DAL, H.J.; RINZLER, A.G.; NIKOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D.T. & SMALLEY, R.E., "Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide". *Chem. Phys. Lett*. **260**(3-4): 471, 1996.
13. THESS, A.; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H.J.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C.H.; 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**(5274): 483, 1996.
14. LI, Y.L.; KINLOCH, I.A. & WINDLE, A.H., "Direct spinning of carbon nanotube fibers from chemical vapor deposition synthesis". *Science*. **304**(5668): 276, 2004.
15. KIM, B. & SIGMUND, W.M., "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir*. **20**(19): 8239, 2004.

16. BEKYAROVA, E.; DAVIS, M.; BURCH, T.; ITKIS, M.E.; ZHAO, B.; SUNSHINE, S. & HADDON, R.C., "Chemically functionalized single-walled carbon nanotubes as ammonia sensors". *J. Phys. Chem. B.* **108**(51): 19717, 2004.
17. KANBUR, Y. & KUCUKYAVUZ, Z., "Surface modification and characterization of multi-walled carbon nanotubes". *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* **19**(6): 497, 2011.
18. AGUI, L.; YANEZ-SEDENO, P. & PINGARRON, J.M., "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry - A review". *Anal. Chim. Acta.* **622**(1-2): 11, 2008.
19. QUINTERO, J.A.A., *Determinação voltamétrica de fibratos em formulações farmacêuticas utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono* in *Departamento de Química*. 2012, Universidade Federal de São Carlos. p. 73.
20. LIU, H.Y.; WANG, L.W. & HU, N.F., "Direct electrochemistry of hemoglobin in biomembrane-like DHP-PDDA polyion-surfactant composite films". *Electrochim. Acta.* **47**(15): 2515, 2002.
21. WANG, L.W. & HU, N.F., "Electrochemistry and electrocatalysis with myoglobin in biomembrane-like DHP-PDDA polyelectrolyte-surfactant complex films". *J. Colloid Interface Sci.* **236**(1): 166, 2001.
22. LUKAC, S., "Surface-potential at surfactant and phospholipid-vesicles as determined by amphiphilic pH indicators". *J. Phys. Chem.* **87**(24): 5045, 1983.
23. CARTER BORGES, N.; DUARTE MENDES, G.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGAB, R.E.; ZAPPIB, E.; DUARTE MENDES, F. & NUCCIA, G., "Comparative bioavailability study with two gemfibrozil tablet formulations in healthy volunteers". *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **55**(7): 382, 2005.
24. MELANSON, J.E.; BARYLA, N.E. & LUCY, C.A., "Double-chained surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis". *Anal. Chem.* **72**(17): 4110, 2000.
25. JANEGITZ, B.C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; BRETT, C.M.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film". *Sens. Actuators, B.* **158**(1): 411, 2011.
26. CHOI, J. & RUBNER, M.F., "Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly". *Macromolecules.* **38**(1): 116, 2005.
27. KIOUSSIS, D.R.; SMITH, D.F. & KOFINAS, P., "Ammonium perchlorate-binding poly(allylamine hydrochloride) hydrogels for wastewater remediation". *J. Appl. Polym. Sci.* **80**(11): 2073, 2001.
28. WANG, B.Z.; NOGUCHI, T. & ANZAI, J., "Layer-by-layer thin film-coated electrodes for electrocatalytic determination of ascorbic acid". *Talanta.* **72**(2): 415, 2007.
29. SUN, P.; HU, N. & LIU, H., "pH-Switchable bioelectrocatalysis based on weak polyelectrolyte multilayers". *Electroanalysis.* **23**(2): 513, 2011.
30. JIANG, K.; EITAN, A.; SCHADLER, L.S.; AJAYAN, P.M.; SIEGEL, R.W.; GROBERT, N.; MAYNE, M.; REYES-REYES, M.; TERRONES, H. & TERRONES, M., "Selective attachment of gold nanoparticles to nitrogen-doped carbon nanotubes". *Nano Lett.* **3**(3): 275, 2003.

31. KIM, J.-B.; PREMKUMAR, T.; LEE, K. & GECKELER, K.E., "A facile approach to single-wall carbon nanotube/poly(allylamine) nanocomposites". *Macromol. Rapid Commun.* **28**(3): 276, 2007.
32. GRUNLAN, J.C.; LIU, L. & REGEV, O., "Weak polyelectrolyte control of carbon nanotube dispersion in water". *J. Colloid Interface Sci.* **317**(1): 346, 2008.
33. SILVA, C.P. & CARAPUCA, H.M., "Glassy carbon electrodes coated with poly(allylamine hydrochloride), PAH: Characterization studies and application to ion-exchange voltammetry of trace lead(II) at combined PAH/mercury film electrodes". *Electrochim. Acta.* **52**(3): 1182, 2006.
34. TAKEDA, H.H.; JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; MATTOSO, L.H.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Sens. Actuators, B.* **161**(1): 755, 2012.
35. SARTORI, E.R.; TAKEDA, H.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film for the voltammetric determination of sulfite in foods". *Electroanalysis.* **23**(11): 2526, 2011.
36. BONASSA, E.M.A., *Enfermagem em Quimioterapia*. 2 ed. 1996, São Paulo Atheneu. 241.
37. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. & GILMAN, A.G., *Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. 2003, Rio de Janeiro. 1647.
38. RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M., *Farmacologia*. 4 ed. 2000. 703.
39. ESPINOSA-MANSILLA, A.; MERAS, I.D.; GOMEZ, M.J.R.; DE LA PENA, A.M. & SALINAS, F., "Selection of the wavelength range and spectrophotometric determination of leucovorin and methotrexate in human serum by a net analyte signal based method". *Talanta.* **58**(2): 255, 2002.
40. MERAS, I.D.; MANSILLA, A.E.; LOPEZ, F.S. & GOMEZ, M.J.R., "Comparison of UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration for determination of methotrexate and leucovorin in biological fluids". *Anal. Bioanal. Chem.* **373**(4-5): 251, 2002.
41. SASTRY, C.S.P. & RAO, J., "Spectrophotometric methods for the determination of methotrexate in pharmaceutical formulations". *Anal. Lett.* **29**(10): 1763, 1996.
42. CHEN, S. & ZHANG, Z., "Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with electrochemical oxidation fluorimetry for the determination of methotrexate in human serum and urine". *Spectrochim. Acta, Part A.* **70**(1): 36, 2008.
43. CHEN, S.; ZHANG, Z.; HE, D.; HU, Y.; ZHENG, H. & HE, C., "Flow-injection-electrochemical oxidation fluorimetry for determination of methotrexate". *Luminescence.* **22**(4): 338, 2007.
44. DEN BOER, E.; HEIL, S.G.; VAN ZELST, B.D.; MEESTERS, R.J.W.; KOCH, B.C.P.; TE WINKEL, M.L.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M.M.; LUIDER, T.M. & DE JONGE, R., "A U-HPLC-ESI-MS/MS-Based stable isotope dilution method for the detection and quantitation of methotrexate in plasma". *Ther Drug Monit.* **34**(4): 432, 2012.
45. GAO, L.; CHALUPSKY, K.; STEFANI, E. & CAI, H., "Mechanistic insights into folic acid-dependent vascular protection: Dihydrofolate reductase (DHFR)-mediated reduction in oxidant stress in endothelial cells and

- angiotensin II-infused mice: A novel HPLC-based fluorescent assay for DHFR activity". *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**(6): 752, 2009.
46. JAMSHIDZADEH, A.; FARSHAD, O. & REZAEI, Z., "Simple HPLC method for determination of methotrexate in plasma". *Ther Drug Monit.* **33**(4): 549, 2011.
 47. MERAS, I.D.; MANSILLA, A.E. & GOMEZ, M.J.R., "Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection". *Anal. Biochem.* **346**(2): 201, 2005.
 48. NAGULU, M.; KIRAN, V.U. & KRISHNA, D.R., "HPLC method of determination of methotrexate in human serum". *Asian Journal of Chemistry.* **21**(9): 6845, 2009.
 49. UCHIYAMA, M.; MATSUMOTO, T.; MATSUMOTO, T.; JIMI, S.; TAKAMATSU, Y.; TAMURA, K. & HARA, S., "Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction". *Biomed. Chromatogr.* **26**(1): 76, 2012.
 50. YOUSEFI, G.; FOROUTAN, S.M.; ZARGHI, A. & SHAFATI, A., "Quantification of polyethylene glycol esters of methotrexate and determination of their partition coefficients by validated HPLC methods". *Iran. J. Pharm. Res.* **8**(1): 27, 2009.
 51. BAREK, J.; MEJSTRIK, V.; MUCK, A. & ZIMA, J., "Polarographic and voltammetric determination of chemical carcinogens". *Crit. Rev. Anal. Chem.* **30**(1): 37, 2000.
 52. FIJALEK, Z.; SZYSZKO, E. & GALL, M., "Polarographic investigation of pteroylglutamic acid-derivatives .1. Methotrexate". *Acta Pol. Pharm.* **41**(5): 547, 1984.
 53. ORDIERES, A.J.M.; GARCIA, A.C.; ALVAREZ, J.M.F. & BLANCO, P.T., "Phase-selective alternating-current polarographic assay of methotrexate in human serum". *Anal. Chim. Acta.* **233**(2): 281, 1990.
 54. SELESOVSKA, R.; BANDZUCHOVA, L. & NAVRATIL, T., "Voltammetric behavior of methotrexate using mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode". *Electroanalysis.* **23**(1): 177, 2011.
 55. GAO, L.; WU, Y.; LIU, J. & YE, B., "Anodic voltammetric behaviors of methotrexate at a glassy carbon electrode and its determination in spiked human urine". *J. Electroanal. Chem.* **610**(2): 131, 2007.
 56. WANG, F.; WANG, Y.; LU, K.; WEI, X. & YE, B., "Sensitive determination of methotrexate at nano-Au self-assembled monolayer modified electrode". *J. Electroanal. Chem.* **674**: 83, 2012.
 57. WANG, F.; WU, Y.; LIU, J. & YE, B., "DNA Langmuir-Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determination of methotrexate". *Electrochim. Acta.* **54**(5): 1408, 2009.
 58. WANG, S.; QI, Z.; HUANG, H. & DING, H., "Electrochemical determination of methotrexate at a disposable screen-printed electrode and its application studies". *Anal. Lett.* **45**(12): 1658, 2012.
 59. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. & GILMAN, A.G., *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.* 12 ed. 2010, New York: McGraw-Hill.
 60. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. & GILMAN'S, G., *Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9th

- ed. 1996, New York McGraw-Hill.
61. ZAKRZEWSKI, R., "High-performance liquid chromatographic determination of propylthiouracil in human urine by post-column iodine-azide reaction". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**(1): 145, 2008.
 62. WEI, Y.; ZHANG, Z.-J.; ZHANG, Y.-T. & SUN, Y.-H., "Determination of propylthiouracil and methylthiouracil in human serum using high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **854**(1-2): 239, 2007.
 63. GARCIA, M.S.; ALBERO, M.I.; SANCHEZPEDRENO, C. & TOBAL, L., "Kinetic determination of carbimazole, methimazole and propylthiouracil in pharmaceuticals, animal feed and animal livers". *Analyst.* **120**(1): 129, 1995.
 64. CIESIELSKI, W. & ZAKRZEWSKI, R., "Potentiometric and coulometric titration of 6-propyl-2-thiouracil". *Analyst.* **122**(5): 491, 1997.
 65. SARNA, K. & FIJALEK, Z., "Voltammetric and electrochemical quartz crystal microbalance study of antithyroid drugs". *Chem. Anal.* **42**(3): 425, 1997.
 66. SHAHROKHIAN, S. & JANNAT-REZVANI, M.J., "Voltammetric studies of propylthiouracil at a carbon-paste electrode modified with cobalt(II)-4-chlorosalophen: Application to voltammetric determination in pharmaceutical and clinical preparations". *Microchim. Acta.* **151**(1-2): 73, 2005.
 67. SHAHROKHIAN, S. & SABERI, R.-S., "Differential pulse voltammetric determination of propylthiouracil and methylthiouracil using their catalytic effects on the electrochemical oxidation of catechol". *Int. J. Electrochem. Sci.* **2**(2): 158, 2007.
 68. R GAUR; M AZIZI; J GAN; P HANSAL; K HARPER; R MANNAN; A PANCHAL; K PATEL; M PATEL; N PATEL; J RANA & ROGOWSKA, A., *British Pharmacopoeia Volume I & II*. 1 ed. Vol. 1. 2009, London.
 69. SASTRY, C.S.P.; SRINIVAS, K.R. & PRASAD, K., "Spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical formulations with N-bromosuccinimide and celestine blue". *Mikrochim. Acta.* **122**(1-2): 77, 1996.
 70. GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. & MELWANKI, M.B., "Indirect spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations". *Anal. Sci.* **18**(6): 671, 2002.
 71. EL-RIES, M.A.; ABOU ATTIA, F.M. & IBRAHIM, S.A., "AAS and spectrophotometric determination of propranolol HCl and metoprolol tartrate". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**(2): 179, 2000.
 72. MEHVAR, R. & BROCKS, D.R., "Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* **4**(2): 185, 2001.
 73. DELAPENA, A.M.; SALINAS, F. & DURAN, M.S., "Simultaneous determination of propranolol and hydralazine by derivative synchronous spectrofluorometry". *Anal. Chim. Acta.* **255**(2): 317, 1991.
 74. RAMESH, K.C.; GOWDA, B.G.; SEETHARAMAPPA, J. & KESHAVAYYA, J., "Indirect spectrofluorimetric determination of piroxicam and propranolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical preparations". *J. Anal. Chem.* **58**(10): 933, 2003.

75. TABRIZI, A.B., "A simple spectrofluorimetric method for determination of piroxicam and propranolol in pharmaceutical preparations". *Journal of Food and Drug Analysis*. **15**(3): 242, 2007.
76. MOHAN, A.; DHAYALAMURTHI, S.; ANANDAN, P. & SARAVANAN, D., "Development and validation of a dissolution method for novel fixed dose combination of etodolac and propranolol hydrochloride tablets by RP-HPLC". *Acta Chromatographica*. **23**(4): 551, 2011.
77. MORANTE-ZARCERO, S. & SIERRA, I., "Simultaneous enantiomeric determination of propranolol, metoprolol, pindolol, and atenolol in natural waters by HPLC on new polysaccharide-based stationary phase using a highly selective molecularly imprinted polymer extraction". *Chirality*. **24**(10): 860, 2012.
78. RANI, T.G.; SHANKAR, G.D.; KADGAPATHI, P. & SATYANARAYANA, B., "Development of an RP-HPLC Method for the simultaneous estimation of propranolol hydrochloride and diazepam in combined dosage form". *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. **45**(4): 296, 2011.
79. MORANTE-ZARCERO, S. & SIERRA, I., "Comparative HPLC methods for beta-blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **62**: 33, 2012.
80. LLORENT-MARTINEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P. & MOLINA-DIAZ, A., "Chemiluminescence optosensing implemented with multicommutation: Determination of salicylic acid". *Anal. Chim. Acta*. **580**(2): 149, 2006.
81. TOWNSHEND, A.; PULGARIN, J.A.M. & PARDO, M.T.A., "Flow injection-chemiluminescence determination of propranolol in pharmaceutical preparations". *Anal. Chim. Acta*. **488**(1): 81, 2003.
82. TSOGAS, G.Z.; STERGIUO, D.V.; VLESSIDIS, A.G. & EVMIRIDIS, N.P., "Development of a sensitive flow injection-chemiluminescence detection method for the indirect determination of propranolol". *Anal. Chim. Acta*. **541**(1-2): 151, 2005.
83. RAO, Z.M.; WU, Q.L.; XIE, G.P.; XU, H.H. & ZHANG, X.Q., "Determination of propranolol hydrochloride by flow injection chemiluminescence". *Chinese J. Anal. Chem.* **32**(12): 1660, 2004.
84. *Farmacopeia Brasileira*. 5ª ed. ed. 2010, Brasília: Fiocruz. 1488.
85. AMBROSI, A.; ANTIOCHIA, R.; CAMPANELLA, L.; DRAGONE, R. & LAVAGNINI, I., "Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples". *J. Hazard. Mater.* **122**(3): 219, 2005.
86. BARANOWSKA, I. & KOPER, M., "Electrochemical behavior of propranolol and its major metabolites, 4'-Hydroxypropranolol and 4'-Hydroxypropranolol Sulfate, on glassy carbon electrode". *J. Braz. Chem. Soc.* **22**(8): 1601, 2011.
87. NIGOVIC, B.; MARUSIC, M. & JURIC, S., "A highly sensitive method for determination of beta-blocker drugs using a Nafion-coated glassy carbon electrode". *J. Electroanal. Chem.* **663**(2): 72, 2011.
88. DOS SANTOS, S.X.; CAVALHEIRO, E.T.G. & BRETT, C.M.A., "Analytical potentialities of carbon nanotube/silicone rubber composite electrodes: Determination of propranolol". *Electroanalysis*. **22**(23): 2776, 2010.
89. SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Square-wave voltammetric determination of propranolol and

- atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*. **81**(4-5): 1418, 2010.
90. ERK, N., "Simultaneous determination of verapamil hydrochloride and pentobarbital in sugar-coated tablets by spectrophotometric methods". *Stp Pharma Sciences*. **6**(5): 349, 1996.
91. ISSA, Y.M.; SALEM, A.A. & BAHBOUH, M.S., "Charge transfer complex formation in spectrophotometric determination of verapamil hydrochloride". *Anal. Lett.* **30**(6): 1153, 1997.
92. RAHMAN, N. & HODA, M.N., "Spectrophotometric determination of verapamil hydrochloride in drug formulations with chloramine-T as oxidant". *Anal. Bioanal. Chem.* **374**(3): 484, 2002.
93. SULTANA, N.; ARAYNE, M.S. & WAHEED, A., "IN-vitro interaction studies of verapamil with fluoroquinolones using first order derivative uv spectrophotometry and RP-HPLC". *J. Chil. Chem. Soc.* **56**(4): 848, 2011.
94. FARIDBOD, F.; GANJALI, M.R.; SAFARALIEE, L.; RIAHI, S.; HOSSEINI, M. & NOROUZI, P., "Verapamil potentiometric membrane sensor for verapamil pharmaceutical analysis. Computational investigation". *Int. J. Electrochem. Sci.* **4**(10): 1419, 2009.
95. HASSAN, S.S.M.; MAHMOUD, W.H.; ELMOSALLAMY, M.A.F. & ADBEL-SAMAD, M.S., "Miniaturized verapamil solid-state potentiometric sensors based on native ionic polymers". *Mikrochim. Acta.* **131**(3-4): 199, 1999.
96. NIKOLIC, K. & MEDENICA, M., "Potentiometric and conductometric determination of verapamil hydrochloride". *Pharmazie.* **44**(7): 497, 1989.
97. ARAYNE, M.S.; SULTANA, N. & MIRZA, A.Z., "Simultaneous determination of gliquidone, pioglitazone hydrochloride, and verapamil in formulation and human serum by RP-HPLC". *J. Chromatogr. Sci.* **49**(2): 114, 2011.
98. HUBERT, P. & CROMMEN, J., "Hplc determination of verapamil and norverapamil in plasma using automated solid-phase extraction for sample preparation and fluorometric detection". *J. Liq. Chromatogr.* **17**(10): 2147, 1994.
99. JOHNSON, S.M. & KHALIL, S.K.W., "An HPLC method for the determination of verapamil and norverapamil in human-plasma". *J. Liq. Chromatogr.* **10**(6): 1187, 1987.
100. SULTANA, N.; ARAYNE, M.S. & WAHEED, A., "Method development of verapamil in presence of NSAIDs using RP-HPLC technique". *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**(7): 2274, 2011.
101. IVANOVA, V.; ZENDELOVSKA, D.; STEFOVA, M. & STAFILOV, T., "HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction". *J. Biochem. Biophys. Methods.* **70**(6): 1297, 2008.
102. SEMAAN, F.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. & BRETT, C.M.A., "Electrochemical behavior of verapamil at graphite-polyurethane composite electrodes: Determination of release profiles in pharmaceutical samples". *Anal. Lett.* **42**(8): 1119, 2009.
103. KASIM, E.A.; GHANDOUR, M.A.; EL-HATY, M.T. & AHMED, M.M., "Determination of verapamil by adsorptive stripping voltammetry in urine and pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**(4): 921, 2002.
104. DEMIRCAN, S.; KIR, S. & OZKAN, S.A., "Electroanalytical characterization of verapamil and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum". *Anal. Lett.* **40**(6): 1177, 2007.

105. LAVIRON, E., "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems ". *J. Electroanal. Chem.* **101**(1): 19, 1979.
106. BARD, *Electrochemical methods fundamentals and applications*. 2nd ed. ed, ed. FAULKNER. 2001, John Wiley & SonsInc.: New York.
107. GOSSER, D.K., *Cyclic voltammetry simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1994, New York: VCH Publisher.
108. KONOPKA, S.J. & MCDUFFIE, B., "Diffusion coefficients of ferricyanide and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry". *Anal. Chem.* **42**(14): 1741, 1970.
109. ARDILA, J.A.; OLIVEIRA, G.G.; MEDEIROS, R.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Determination of gemfibrozil in pharmaceutical and urine samples by square-wave adsorptive stripping voltammetry using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film". *J. Electroanal. Chem.* **690**(0): 32, 2013.
110. JANEGITZ, B.C., *Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro*, in *Departamento de Química*. 2013, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos-SP. p. 149.
111. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO, O. & BRETT, C.M.A., "Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode". *Anal. Chem.* **81**(13): 5364, 2009.
112. ZHAO, Q.; GAN, Z. & ZHUANG, Q., "Electrochemical sensors based on carbon nanotubes". *Electroanalysis*. **14**(23): 1609, 2002.
113. LI, J.; KOEHNE, J.E.; CASSELL, A.M.; CHEN, H.; NG, H.T.; YE, Q.; FAN, W.; HAN, J. & MEYYAPPAN, M., "Inlaid multi-walled carbon nanotube nanoelectrode arrays for electroanalysis". *Electroanalysis*. **17**(1): 15, 2005.
114. WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C. & COMPTON, R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis". *Microchim. Acta.* **152**(3-4): 187, 2006.
115. LIU, X.; LIU, J.; HUANG, Y.; ZHAO, R.; LIU, G. & CHEN, Y., "Determination of methotrexate in human serum by high-performance liquid chromatography combined with pseudo template molecularly imprinted polymer". *J. Chromatogr. A.* **1216**(44): 7533, 2009.
116. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A., *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. 1993, New York: Oxford University Press Inc. 792.
117. JIANG, K.Y.; EITAN, A.; SCHADLER, L.S.; AJAYAN, P.M.; SIEGEL, R.W.; GROBERT, N.; MAYNE, M.; REYES-REYES, M.; TERRONES, H. & TERRONES, M., "Selective attachment of gold nanoparticles to nitrogen-doped carbon nanotubes". *Nano Lett.* **3**(3): 275, 2003.
118. ANDERSON, R.L., *Practical statistics for analytical chemists*. . 1987, New York: Van Nostrand Reinhold.
119. HOLZER, K.P. & WRONA, M.Z., "Electrochemical oxidation of 4-thiouracil to bis(4-thiouracil)disulfide and chemical-transformations of the disulfide". *Bioelectrochem. Bioenerg.* **10**(2-3): 199, 1983.
120. HOLZER, K.P. & WRONA, M.Z., "Investigation of the enzymatic, chemical and electrochemical oxidation of 4-thiouracil". *Bioelectrochem. Bioenerg.* **11**(1): 3, 1983.

121. SPATARU, N.; SPATARU, T. & FUJISHIMA, A., "Voltammetric determination of thiourea at conductive diamond electrodes". *Electroanalysis*. **17**(9): 800, 2005.
122. FREEDMAN, L.D. & CORWIN, A.H., "Oxidation-reduction potentials of thiol-disulfide systems". *J. Biol. Chem.* **181**(2): 601, 1949.
123. GOYAL, R.N.; GUPTA, V.K.; OYAMA, M. & BACHHETI, N., "Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode". *Electrochem. Commun.* **8**(1): 65, 2006.
124. GOYAL, R.N. & SINGH, S.P., "Voltammetric determination of atenolol at C-60-modified glassy carbon electrodes". *Talanta*. **69**(4): 932, 2006.