

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

**ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO PARA A  
DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA/AMPEROMÉTRICA DE ANTI-  
HELMÍNTICOS E ANTI-HIPERTENSIVOS**

**Bruna Cláudia Lourenção\***

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 FAPESP**

**São Carlos - SP  
2014**

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

L892ed Lourenção, Bruna Cláudia.  
Eletrodo de diamante dopado com boro para a  
determinação voltamétrica/amperométrica de anti-  
helmínticos e anti-hipertensivos / Bruna Cláudia Lourenção.  
-- São Carlos : UFSCar, 2014.  
124 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

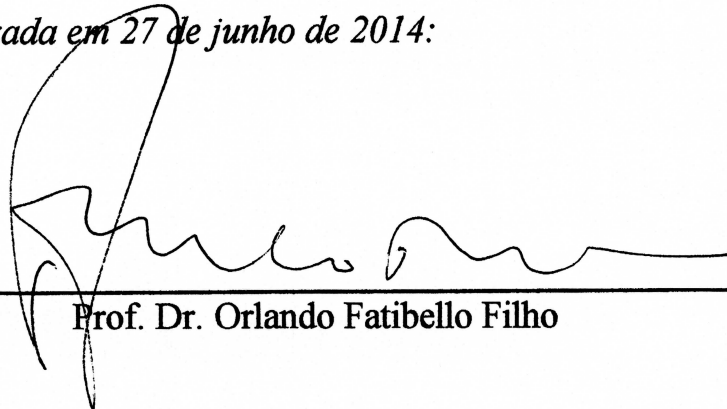
1. Química analítica. 2. Métodos eletroanalíticos. 3.  
Sistema de análise por injeção em fluxo. 4. Amperometria de  
múltiplos pulsos. 5. Anti-helmínticos. 6. Anti-hipertensivos. I.  
Título.

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

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

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Bruna Cláudia Lourenção**, realizada em 27 de junho de 2014:*



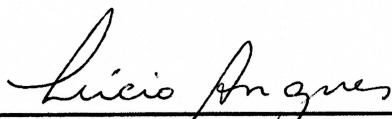
---

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



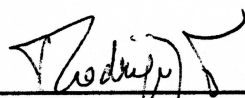
---

Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano



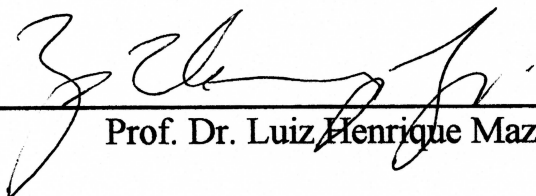
---

Prof. Dr. Lucio Angnes



---

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz



---

Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo

“Para ter algo que você nunca teve, é preciso fazer algo que você  
nunca fez”.

Chico Xavier

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto  
importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que  
possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”.

Chico Xavier

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas  
pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo  
mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

Dedico este trabalho, aos meus pais, Valmir e Cirene, por todo apoio e por estarem sempre ao meu lado, dando significado a tudo que realizei; às minhas irmãs Juliana e Daniela, à minha avó Catarina e aos meus tios, por todo amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e por me dar força, estando sempre ao meu lado e me ajudando a superar todos as dificuldades.

Ao prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela orientação, amizade, incentivo, paciência, e por toda a contribuição no meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao prof. Dr. Romeu Cardozo Rocha Filho pela grande contribuição em todo o trabalho, pelas discussões, por todos os ensinamentos e também pela amizade.

Ao prof. Dr. Greg M. Swain, por me receber de portas abertas em seu laboratório e por toda ajuda durante meu doutorado sanduíche, na Michigan State University.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Antigo Medeiros, pela amizade e pela enorme colaboração e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Marina pela colaboração na parte experimental.

Ao prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pela disponibilização do equipamento de HPLC.

À Claudia, pela amizade, exemplo de força de vontade, superação e alegria.

Ao meu namorado Diego, por todo companheirismo, amor e paciência.

Ao amigo “irmão” Geiser pela amizade.

Às amigas de São Manuel Simone, Dileiny, Milena e Celisa que mesmo distantes estiveram sempre me apoiando.

Aos amigos, Patrícia, Jorge, Marcão, Cyber, Fred, Tiago Almeida e Avaré, obrigada pelas risadas e momentos de descontração na “hora do cafezinho”.

---

Aos amigos que fiz em East Lansing - Michigan, Ricardo, Dina, Lars, Gabriel, Boris, Fabiane e Flávia, obrigada pela amizade, apoio e muitos momentos de descontração.

Aos amigos, Ellen, Tico, Dannylo, Marina, André e Lígia; obrigada pelo convívio sempre alegre e agradável.

À grande amiga Maiara pelo carinho e amizade.

Aos amigos do LABBES e do GQA.

Ao departamento de Química da UFSCar e ao programa de pós-graduação, em especial às secretárias, Cristina, Luciani e Ariane.

Aos professores do programa de pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

A todos os meus familiares, avós, tios, primas, que mesmo estando distantes sempre me deram carinho e apoio.

Ao Thiago Guerreiro, pela confecção da figura do sistema FIA.

Aos órgãos de fomento: principalmente à FAPESP pela bolsa concedida (processo nº 2009/17729-8) e à CAPES pela bolsa no exterior (PDSE-doutorado sanduíche, processo nº 5245-11-7).

---

---

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

$\Delta E_s$  – Incremento de varredura

A – Corrente (ampére)

$a$  – Amplitude de pulso de potencial

ABZ – Albendazol

ABZ-SO – Sulfóxido de albendazol

ABZSO<sub>2</sub> – albendazol 2-amino sulfona

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDD – Diamante dopado com boro (*Boron-doped diamond*)

BDD-APT – Diamante dopado com boro pré tratado anodicamente (*Boron-doped diamond anodically pretreated*)

BDD-CPT – Diamante dopado com boro pré tratado catodicamente (*Boron-doped diamond cathodically pretreated*)

CV – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry*)

$E$  – Potencial

$E_p$  – Potencial de pico

ENP – Enalapril

$f$  – Frequência de aplicação de pulsos de potencial

FC – Fator de correção

FIA – Análise por injeção em fluxo (*Flow injection analysis*)

FIA-MPA – Análise por injeção em fluxo com detecção por amperometria de múltiplos pulsos

GC – Carbono vítreo (*Glassy carbon*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

HTZ – Hidroclorotiazida

$I_p$  – Corrente de pico

---



IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IDA – Ingestão diária aceitável

IVM – Ivermectina

LD – Limite de detecção

LSV – Voltametria de varredura linear (*Linear sweep voltammetry*)

LVM – Levamisol

MERCOSUL – Mercado comum do Sul

MPA – Amperometria de múltiplos pulsos (*Multiple pulse amperometry*)

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

$r$  – coeficiente de correlação

SWV – Voltametria de onda quadrada (*Square wave voltammetry*)

$t$  – Tempo de modulação

$v$  – Velocidade de varredura

V – Volt

---

---

**LISTA DE TABELAS**

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 4.1 – Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de ABZ.....   | 44  |
| TABELA 4.2 – Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de ABZ.....   | 44  |
| TABELA 4.3 – Parâmetros analíticos para a determinação de ABZ por DPV e SWV utilizando o eletrodo de BDD-CPT.....   | 45  |
| TABELA 4.4 – Resultados obtidos na determinação de ABZ em amostras de formulações farmacêuticas usando o método de DPV proposto e o método de HPLC comparativo..... | 49  |
| TABELA 4.5 – Resultados obtidos para os estudos de repetibilidade intra e inter-dias .....  | 68  |
| TABELA 4.6 – Resultados obtidos na determinação de IVM e LVM em formulações farmacêuticas pelo método amperométrico proposto e pelos métodos comparativos.....      | 72  |
| TABELA 4.7 – Estudos de adição e recuperação de IVM e LVM em amostras de urina .....  | 73  |
| TABELA 4.8 – Variação do FC em função da concentração de ABZ-SO e a média entre os valores .....  | 83  |
| TABELA 4.9 – Resultados obtidos nos estudos de repetibilidade intra e inter-dias para ABZ-SO e LVM.....   | 87  |
| TABELA 4.10 – Estudos de adição e recuperação de ABZ-SO e LVM em amostras de urina sintética.....   | 89  |
| TABELA 4.11 – Variação do FC em função da concentração de ABZ-SO e a média entre os valores .....   | 103 |
| TABELA 4.12 – Resultados obtidos para os estudos de repetibilidade intra e inter-dias de HTZ e ENP .....  | 106 |

---

TABELA 4.13 – Teores de HTZ e ENP obtidos empregando-se o método proposto e o método comparativo (HPLC)..... 110

---

**LISTA DE FIGURAS**

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1.1 – Estruturas químicas dos anti-helmínticos ABZ e ABZ-SO.....   | 3  |
| FIGURA 1.2 – Estrutura química da IVM.....  | 6  |
| FIGURA 1.3 – Estrutura química do LVM.....  | 8  |
| FIGURA 1.4 – Estrutura química do ENP.....  | 11 |
| FIGURA 1.5 – Estrutura química da HTZ.....  | 12 |
| FIGURA 1.6 – Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais dos eletrodos de BDD.....  | 18 |
| FIGURA 3.1 – (A) Fotografia do eletrodo de BDD com área de 0,56 cm <sup>2</sup> , utilizado nas medidas voltamétricas. (B) Adaptador para o eletrodo de BDD com área geométrica de 0,33 cm <sup>2</sup> utilizado nas medidas amperométricas.....   | 24 |
| FIGURA 3.2 – Fotografia das partes necessárias para a confecção e montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo: (A) Haste em Al; (B) e (C) suportes em acrílico para acomodação de: (D) tubo em aço inoxidável (contra eletrodo), (E) <i>o-ring</i> , (F) eletrodo de BDD, (G) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L <sup>-1</sup> ) miniaturizado e (H) parafusos para acoplamento das partes B e C da célula..... | 25 |
| FIGURA 3.3 – Fotografias da célula eletroquímica para análises em fluxo montada: zoom: (1) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L <sup>-1</sup> ) miniaturizado, (2) suporte em acrílico com o eletrodo de trabalho (BDD) acomodado, (3) contato elétrico rosqueado pela parte inferior do detector, (4) entrada da solução carregadora/amostra e (5) saída da solução carregadora/amostra e contra eletrodo.....               | 26 |
| FIGURA 3.4 – Representação esquemática do sistema FIA, acoplado a célula eletroquímica, utilizado para as medidas amperométricas em fluxo. (A) bomba peristáltica; (B) injetor; (C) soluções analisadas; (D) entrada de solução; (E) eletrodo de referência; (F) contato elétrico para o eletrodo de BDD; (G) eletrodo auxiliar (tubo de aço inox) / saída de solução; zoom: (H) eletrodo de BDD. ....                                    | 27 |

---

- FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de ABZ  $99,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e na ausência de ABZ (branco(—)),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 37
- FIGURA 4.2 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ABZ  $99,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  sobre um eletrodo de BDD-CPT (—) e BDD-APT (—), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ )..... 38
- FIGURA 4.3 – Dependência do potencial de pico de oxidação do ABZ ( $99 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com o  $\text{pH}_{\text{cond}}$  (diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,01$ ;  $0,05$ ;  $0,10$  e  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ) do eletrólito suporte utilizando um eletrodo de BDD-CPT. Equação da reta :  $E \text{ (V)} = 1,078 - 0,051 \text{ pH}_{\text{cond}}$ ..... 40
- FIGURA 4.4 – Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  contendo ABZ e ABZ-SO. Velocidades de varredura:  $10, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) e (C) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o ABZ e ABZ-SO, respectivamente. Equações das retas:  $\log I = -4,3 + 0,50 \log \nu$  (ABZ) e  $\log I = -4,4 + 0,32 \log \nu$  (ABZ-SO)..... 41
- FIGURA 4.5 – Mecanismo de oxidação proposto para ABZ sobre o eletrodo de BDD-CPT em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ..... 43
- FIGURA 4.6 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de ABZ (1 a 13: (1) Branco, (2)  $0,08$ ; (3)  $0,12$ ; (4)  $0,16$ ; (5)  $0,20$ ; (6)  $0,39$ ; (7)  $0,77$ ; (8)  $1,13$ ; (9)  $1,48$ ; (10)  $3,30$ ; (11)  $5,05$ ; (12)  $6,74$ ; (13)  $8,36 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) a curva analítica em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , ( $t = 4 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ). ..... 46
- FIGURA 4.7 – Cromatograma obtido para o ABZ  $0,25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . O gráfico inserido é a respectiva curva analítica obtida em unidades de área para ABZ. Concentrações da curva analítica:  $3,0$ ;  $6,0$ ;  $9,0$ ;  $20,0$ ;  $80,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/metanol/água ( $45/35/20$ , v/v/v) (eluição isocrática), vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção:  $50,0 \text{ } \mu\text{L}$  e o  $\lambda$  de  $315 \text{ nm}$ . ..... 48

- FIGURA 4.8 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (30% de etanol v/v) na presença de IVM  $177,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (–) e na ausência de IVM (branco (–))  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . (B) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de LVM  $48,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (–) e na ausência de LVM (branco (–)),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 52
- FIGURA 4.9 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos na oxidação de IVM  $180,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % etanol v/v) utilizando um BDD-CPT (–) e BDD-APT (–), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). (B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos na oxidação de LVM  $48,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando um BDD-CPT (–) e BDD-APT (–), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ). ..... 53
- FIGURA 4.10 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de IVM  $180,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes eletrólitos suporte: ácido acético  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  (–);  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (–);  $\text{HCl}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (–) e tampão BR (pH 2,1) (–). ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). ..... 55
- FIGURA 4.11 – Voltamogramas de onda quadrada para o LVM  $48,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  sobre o eletrodo de BDD-APT e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em diferentes concentrações:  $0,05$  (–);  $0,10$  (–);  $0,30$  (–) e  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  (–) ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ). ..... 56
- FIGURA 4.12 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos ( $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $E = 3 \text{ mVs}^{-1}$ ) antes (–) e após (–) a eletrólise do LVM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e BDD. Potencial aplicado de  $1,75 \text{ V}$  por  $2400 \text{ s}$ . ..... 58
- FIGURA 4.13 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD solução de LVM  $132,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura:  $10, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450$  e  $500 \text{ mVs}^{-1}$ . (B) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o LVM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 59

- FIGURA 4.14 – Mecanismo de oxidação proposto para o LVM na superfície do BDD em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 60
- FIGURA 4.15 – (A) Voltamograma hidrodinâmico obtido para IVM  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % v/v de etanol), volume de injeção =  $350 \text{ } \mu\text{L}$  e vazão =  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ . (B) Voltamograma hidrodinâmico obtido para LVM  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \text{ } \mu\text{L}$  e vazão =  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 62
- FIGURA 4.16 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora para (A) IVM  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) LVM  $10,0 \text{ } \mu\text{mol mol L}^{-1}$ . ..... 64
- FIGURA 4.17 – Intensidades dos sinais de corrente de IVM  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e LVM  $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) em função do volume da alça de amostragem: 100 a  $500 \text{ } \mu\text{L}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 64
- FIGURA 4.18 – (A) Amperograma obtido empregando-se o eletrodo de BDD em solução de IVM em diferentes concentrações: 0,60; 1,00; 3,00; 5,00; 7,00; 10,0; 30,0 e  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica obtida para a IVM. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % v/v de etanol), volume de injeção:  $350 \text{ } \mu\text{L}$  e vazão:  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Os sinais obtidos em A e D (FIGURA A) são correspondentes a duas amostras comerciais. .... 66
- FIGURA 4.19 – (A) Amperograma obtido empregando-se o eletrodo de BDD em solução de LVM em diferentes concentrações: 0,01; 0,06; 0,10; 0,30; 0,60; 1,00; 3,00 e  $6,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica obtida para o LVM. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção:  $450 \text{ } \mu\text{L}$  e vazão:  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Os sinais de corrente obtidos em E (FIGURA A) são correspondentes a uma amostra comercial. .... 67
- FIGURA 4.20 - Espectros obtidos para diferentes concentrações de solução de IVM ( $5,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $7,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $9,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $10,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $20,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

|  |    |
|--|----|
| $L^{-1}$ ; $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em metanol e $\lambda = 245 \text{ nm}$ e a curva analítica obtida (inserte).....   | 70 |
| FIGURA 4.21 – Curva da titulação potenciométrica do LVM com o titulante NaOH ( $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ) e gráfico da primeira derivada da curva de titulação (inserte).....   | 71 |
| FIGURA 4.22 – Voltamogramas obtidos por SWV para ABZ-SO $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH: 0,3 (—); 2,9 (—); 6,7 (—); 10,3 (—) e 11,9 (—) em solução padrão de tampão BR e $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $\text{pH}_{\text{cond}} 0,30$ ). ( $f = 20 \text{ s}^{-1}$ , $a = 30 \text{ mV}$ , $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ). .....                  | 75 |
| FIGURA 4.23 – Voltamogramas cíclicos obtido na oxidação de ABZ-SO $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um BDD-APT (—) e BDD-CPT (—).....   | 76 |
| FIGURA 4.24 – (A) Voltamograma hidrodinâmico obtido para ABZ-SO $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Voltamograma hidrodinâmico obtido para LVM $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte = $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção = $350 \mu\text{L}$ e vazão = $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ .....                                    | 78 |
| FIGURA 4.25 – Intensidades dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potenciais: (●) ABZ-SO $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: $1,40 \text{ V}$ e (■) LVM $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: $1,90 \text{ V}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora = $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ..... | 79 |
| FIGURA 4.26 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) para (A) ABZ-SO $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) LVM $10,0 \mu\text{mol mol L}^{-1}$ .....   | 80 |
| FIGURA 4.27 – Intensidades dos sinais de corrente de ABZ-SO $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A) e LVM $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B) em função do volume da alça de amostragem: $100$ a $500 \mu\text{L}$ em $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .....  | 81 |
| FIGURA 4.28 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT e soluções de ABZ-SO $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ , LVM $1,00 \mu\text{mol$   |    |



- $L^{-1}$  e ABZ-SO + LVM nas mesmas concentrações. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . ..... 82
- FIGURA 4.29 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo BDD-APT em diferentes concentrações de ABZ-SO (–) e LVM (–). Concentrações de ABZ-SO: 2,00; 6,00; 10,0; 30,0; 60,0; 80,0; 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LVM: 0,03; 0,08; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; e 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) curva analítica obtida para o ABZ-SO e (C) curva analítica obtida para o LVM. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ , E 1,40 e 1,90 V. Os sinais obtidos em a e b correspondem a duas amostras analisadas. .... 85
- FIGURA 4.30 – Amperogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT em soluções de ABZ-SO + LVM em duas concentrações diferentes de ABZ-SO (6,00 e  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (–) e LVM (0,08 e  $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (–) ( $n = 10$ ). Eletrólito suporte /solução carregadora:  $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . .... 87
- FIGURA 4.31 – Voltamogramas cíclicos (–) obtidos para (A) HTZ  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução de  $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (–) voltamogramas para a solução do branco ( $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). .... 90
- FIGURA 4.32 – Voltamogramas de onda quadrada para (A) HTZ  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  empregando-se o eletrodo de BDD-CPT (–) e BDD-APT (–),  $H_2SO_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ). .... 91
- FIGURA 4.33 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de (A) HTZ  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  em diferentes eletrólitos suporte,  $H_2SO_4$  (–), nitrato de potássio (–) e tampão BR (–) ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ). .... 92
- FIGURA 4.34 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de HTZ  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  (A) e ENP  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  (B) em  $H_2SO_4$  com diferentes

|  |     |
|--|-----|
| concentrações, 0,50 mol L <sup>-1</sup> (→); 0,30 mol L <sup>-1</sup> (←); 0,10 mol L <sup>-1</sup> (↔) e 0,05 mol L <sup>-1</sup> (↔); ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ , $a = 50 \text{ mV}$ , $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).....   | 93  |
| FIGURA 4.35 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-CPT solução de HTZ 99,0 μmol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> em diferentes velocidades de varredura: 10; 30; 50; 70; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e 500 mVs <sup>-1</sup> . (B) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para a HTZ..... | 94  |
| FIGURA 4.36 – (A) Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura para o LVM em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,50 mol L <sup>-1</sup> e (B) Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para o LVM em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,50 mol L <sup>-1</sup> .....   | 95  |
| FIGURA 4.37 – Mecanismo de oxidação da HTZ na superfície do BDD-CPT em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> .....   | 97  |
| FIGURA 4.38 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para uma concentração de 50,0 μmol L <sup>-1</sup> de (A) HTZ e (B) para uma concentração de 50,0 μmol L <sup>-1</sup> de ENP. Eletrólito suporte/solução carregadora = H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> , volume de injeção = 350 μL e vazão = 3,0 mL min <sup>-1</sup> .....   | 98  |
| FIGURA 4.39 – Intensidades dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais: (■) HTZ 10,0 μmol L <sup>-1</sup> , pulso de potencial 1,50 V e (●) ENP 50,0 μmol L <sup>-1</sup> , pulso de potencial: 1,80 V. Eletrólito suporte/solução carregadora H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> .....   | 99  |
| FIGURA 4.40 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> ) para (A) HTZ 10,0 μmol L <sup>-1</sup> e (B) ENP 50,0 μmol L <sup>-1</sup> .....   | 100 |
| FIGURA 4.41 – Intensidades dos sinais de corrente de HTZ 10,0 μmol L <sup>-1</sup> (A) e ENP 50,0 μmol L <sup>-1</sup> (B) em função do volume da alça de amostragem: 100 a 600 μL em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> .....  | 101 |
| FIGURA 4.42 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o  |     |

- eletrodo de BDD e soluções de HTZ 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , ENP 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e HTZ + ENP nas mesmas concentrações. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 4,5  $\text{mL min}^{-1}$ ..... 102
- FIGURA 4.43 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT em diferentes concentrações de uma mistura de (–) HTZ e (–) ENP. Concentrações de HTZ: 0,40; 0,60; 0,90; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ENP: 0,03; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; e 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) curva analítica obtida para o HTZ e (C) curva analítica obtida para o ENP. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 4,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Os sinais obtidos em A correspondem a uma amostra analisada. .... 105
- FIGURA 4.44 – Amperogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-CPT em soluções de HTZ + ENP em duas concentrações diferentes HTZ (0,90 e 6,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (–) e ENP (0,20 e 0,80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (–) (n = 10). Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 3,0  $\text{mL min}^{-1}$  ..... 107
- FIGURA 4.45 – (A) Cromatograma obtido para o ENP e HTZ 90,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) e (C) As respectivas curvas analíticas obtidas em unidades de área para HTZ e ENP. Concentrações das curvas analíticas: 6,00; 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 100,0; 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/metanol/tampão trietilamônio fosfato pH 2,5 (50/25/25, v/v/v) (eluição isocrática), vazão= 0,3  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção= 20  $\mu\text{L}$  e o  $\lambda$  de 210 nm..... 109

---

**RESUMO**

ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA/AMPEROMÉTRICA DE ANTI-HELMÍNTICOS E ANTI-HIPERTENSIVOS. Neste trabalho de doutorado desenvolveu-se, primeiramente, um método para determinação do anti-helmíntico albendazol (ABZ) utilizando-se voltametria de pulso diferencial (DPV) e o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) pré-tratado catodicamente (BDD-CPT). A curva analítica obtida apresentou resposta linear de 0,08 a 8,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com um LD de 0,06  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O método foi aplicado na determinação de ABZ em três formulações farmacêuticas com resultados similares aos obtidos empregando-se um método comparativo. A segunda etapa do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de dois procedimentos eletroanalíticos utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) e detecção amperométrica para a determinação individual de dois anti-helmínticos, a ivermectina (IVM) e o levamisol (LVM), sendo empregado o BDD pré-tratado anodicamente (BDD-APT) para o LVM e o BDD-CPT, para a IVM. As correspondentes curvas analíticas apresentaram boas linearidades nas faixas de concentrações de 0,60 a 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (IVM) e 0,01 a 6,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LVM), com LDs iguais a 0,30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 1,0  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente. Estes analitos foram determinados em amostras comerciais de formulações farmacêuticas e amostras de urina sintética sendo os resultados obtidos concordantes com os resultados obtidos empregando-se dois métodos comparativos (um para cada analito). A frequência analítica para cada método foi de 48 e 56 determinações por hora para IVM e LVM, respectivamente. Outro procedimento desenvolvido foi a determinação simultânea de dois anti-helmínticos, LVM e sulfóxido de albendazol (ABZ-SO), em amostras de urina sintética utilizando um sistema FIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA) empregando-se um eletrodo de BDD-APT. O método proposto foi baseado na determinação direta

---

do ABZ-SO e indireta da LVM. A sequência de aplicação dos pulsos em função do tempo, previamente otimizada, foi,  $E_{\text{det.1}} = +1,40 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas de ABZ-SO) e  $E_{\text{det.2}} = +1,90 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os anti-helmínticos ABZ-SO e LVM). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de 2,00 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (ABZ-SO) e 0,03 a 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LVM), com LDs de 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 6,0  $\text{nmol L}^{-1}$  para ABZ-SO e LVM, respectivamente. Amostras de urina sintética dopadas com ABZ-SO e LVM em duas diferentes concentrações apresentaram recuperações de 93,3 a 100 %. O procedimento desenvolvido mostrou-se simples, preciso e rápido, com uma frequência analítica de 53 determinações por hora. No último procedimento desenvolveu-se um método para a determinação simultânea de hidroclorotiazida (HTZ) e o enalapril (ENP) (anti-hipertensivos) utilizando-se um sistema FIA-MPA e o eletrodo de BDD-CPT. O método FIA-MPA proposto também foi baseado na determinação direta da HTZ e indireta do ENP. A sequência de aplicação dos pulsos em função do tempo utilizada foi,  $E_{\text{det.1}} = +1,50\text{V} / 150 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas do HTZ) e  $E_{\text{det.2}} = +1,80\text{V} / 150 \text{ ms}$  (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (HTZ e ENP)). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de 0,40 a 8,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o HTZ e de 0,03 a 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o ENP e os LDs obtidos para HTZ e ENP foram de 0,20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Foram analisadas três amostras comerciais farmacêuticas contendo os dois analitos e os resultados obtidos empregando-se o método FIA-FIA-MPA estão em concordância com aqueles obtidos empregando-se um método comparativo (HPLC) em um nível de confiança de 95%. O procedimento desenvolvido mostrou-se simples e rápido, com uma frequência analítica de 89 determinações por hora.

---

**ABSTRACT**

BORON DOPED DIAMOND ELECTRODE FOR THE VOLTAMETRIC/AMPEROMETRIC DETERMINATION OF ANTHELMINTIC AND ANTIHYPERTENSIVE DRUGS. In this work it was developed, firstly, one method for determination of anthelmintic albendazole (ABZ) using differential pulse voltammetry (DPV) and the boron doped diamond (BDD) electrode cathodically pretreated (BDD-CPT). The corresponding analytical curve showed linear response in the concentration range from 0.08 to 8.36  $\mu\text{mol L}^{-1}$  with detection limit (LD) of 0.06  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The proposed method was applied in the determination of ABZ in three pharmaceutical formulations with similar results those obtained using a comparative method. The second part of this work it was to develop two electroanalytical procedures using the amperometry technique coupled to a flow injection analysis system (FIA) for the individual determination of two anthelmintic, the ivermectin (IVM) and levamisole (LVM), where it was used the BDD electrode anodically pretreated (BDD-APT) for LVM and BDD-CPT for IVM. Good linear ranges were obtained for the respective analytical curves with values of 0.60 to 50.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for IVM and 0.01 to 6.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for LVM with LD of 0.30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 1.0  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectively. These analytes were determined in samples of commercial pharmaceutical formulations and synthetic urine and the results obtained are in agreement with the results obtained using two comparative methods (one for each analyte). The analytical frequencies for each method were 48 and 56 determinations per hour for IVM and LVM, respectively. Another procedure was developed for simultaneous determination of two anthelmintics LVM and albendazole sulfoxide (ABZ-SO) in synthetic urine samples using a FIA system with multiple pulses amperometry (MPA) detection and the BDD-APT electrode. This method was applied for directly determination of ABZ-SO and for indirectly determination of LVM. The employed sequence of dual-potential

---

waveform as a function of time, previously optimized, were  $E_{\text{det.1}} = +1.40 \text{ V} / \text{ms}$  200 (pulse potential at which occurs only ABZ-SO oxidation) and  $E_{\text{det.2}} = 1.90 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (pulse potential at which the oxidation of both anthelmintic, ABZ-SO and LVM, occurs). The analytical curves showed linearity from 2.00 to 100.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (ABZ-SO) and 0.03 to 1.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LVM), with LD of 1.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 6.0  $\text{nmol L}^{-1}$  for ABZ-SO and LVM, respectively. Samples of synthetic urine doped with two different concentrations of ABZ-SO and LVM presented recoveries from 93.3 to 100%. The procedure was simple, accurate and fast, with an analytical frequency of 53 samples per hour. In the last one procedure it was developed a method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide (HTZ) and enalapril (ENP) (antihypertensives) using a FIA-MPA system and BDD-CPT electrode. The FIA-MPA method was also proposed based on the direct determination of HTZ and indirect of ENP. The sequence application of the pulses as a function of time, were,  $E_{\text{det.1}} = +1.50 \text{ V} / \text{ms}$  150 (pulse potential at which HTZ occurs) and  $E_{\text{det.2}} = +1.80 \text{ V} / \text{ms}$  150 (pulse potential at which oxidation of both analytes (HTZ and ENP) occurs). The analytical curves presented linearity from 0.40 to 8.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to HTZ and from 0.03 to 1.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to ENP and LD obtained for HTZ and ENP were 0.20 and 0.01  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. It was analysed three pharmaceutical commercial samples containing both analytes and the results obtained using the FIA-MPA method are in agreement with those obtained using a comparative method (HPLC) with a confidence level of 95%. The procedure was simple and fast, with an analytical frequency of 89 samples per hour.

---

---

**SUMÁRIO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 – Anti-helmínticos .....   | 1         |
| 1.1.1 – Albendazol (ABZ) e sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) .....                                  | 2         |
| 1.1.2 – Ivermectina (IVM) .....  | 5         |
| 1.1.3 – Levamisol (LVM) .....  | 7         |
| 1.2 – Anti-hipertensivos .....   | 10        |
| 1.2.1 – Enalapril (ENP) e hidroclorotiazida (HTZ) .....  | 11        |
| 1.3 – Métodos eletroanalíticos.....  | 14        |
| 1.3.1 – Amperometria de múltiplos pulsos e sistema de análise por injeção em fluxo (FIA-MPA) ..... | 15        |
| 1.4 – Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....  | 17        |
| <b>2 – OBJETIVOS.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3 – PARTE EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1 – Instrumentação .....   | 22        |
| 3.1.1 – Eletrodos .....  | 22        |
| 3.1.2 – Células eletroquímicas .....   | 24        |
| 3.1.2.1 – Células eletroquímicas para medidas amperométricas .....                                 | 25        |
| 3.1.3 – Sistema FIA .....  | 27        |
| 3.2 – Reagentes e soluções.....  | 28        |
| 3.2.1 – Preparo das amostras .....   | 29        |
| 3.2.1.1 – Amostras comerciais de ABZ .....   | 29        |
| 3.2.1.2 – Amostras comerciais de IVM .....   | 29        |
| 3.2.1.3 – Amostra comercial de LVM .....   | 30        |

---



---

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1.4 – Amostras comerciais de ENP e HTZ .....  | 30        |
| 3.2.1.5 – Urina sintética .....   | 30        |
| 3.3 – Procedimento experimental .....   | 31        |
| 3.3.1 – Pré-tratamentos aplicados ao eletrodo de BDD .....  | 31        |
| 3.3.2 – Determinação do limite de detecção .....  | 32        |
| 3.3.3 – Eletrólise em potencial controlado .....  | 32        |
| 3.3.4 – Tratamento dos dados.....   | 33        |
| 3.3.5 – Métodos comparativos .....  | 33        |
| 3.3.5.1 – Métodos cromatográficos .....   | 33        |
| 3.3.5.2 – Método espectrofotométrico com absorção no ultravioleta.....  | 34        |
| 3.3.5.3 – Titulação potenciométrica .....   | 34        |
| <br>  |           |
| <b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>36</b> |
| <br>  |           |
| 4.1 – Determinação dos anti-helmínticos.....  | 36        |
| 4.1.1 – Determinação voltamétrica de ABZ .....  | 36        |
| 4.1.1.1 – Investigação da resposta eletroquímica do ABZ e diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD..... | 36        |
| 4.1.1.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico .....  | 37        |
| 4.1.1.1.2 – Efeito do eletrólito suporte .....  | 38        |
| 4.1.1.2 – Mecanismo de oxidação do ABZ sobre o eletrodo de BDD-CPT ....   | 40        |
| 4.1.1.2.1 – Voltametria cíclica .....   | 40        |
| 4.1.1.3 – Determinação voltamétrica de ABZ e aplicação do método proposto na determinação de produtos farmacêuticos .....             | 43        |
| 4.1.1.3.1 – Método comparativo – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....   | 48        |
| 4.1.2 – Determinação individual de IVM e LVM empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica .....   | 50        |

---

---

|  |    |
|--|----|
| 4.1.2.1 – Investigação do comportamento eletroquímico de IVM e LVM e efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD.....         | 51 |
| 4.1.2.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico .....   | 52 |
| 4.1.2.1.2 – Efeito do eletrólito suporte .....   | 54 |
| 4.1.2.2 – Mecanismo de oxidação do LVM sobre o eletrodo de BDD-APT ...   | 56 |
| 4.1.2.2.1 – Eletrólise em potencial controlado.....  | 57 |
| 4.1.2.2.2 – Voltametria cíclica .....  | 59 |
| 4.1.2.3 – Determinação amperométrica de IVM e LVM e aplicação do método proposto na determinação de amostras de formulações farmacêuticas e urina ..               | 61 |
| 4.1.2.3.1 – Otimização dos parâmetros amperométricos e do sistema FIA.....   | 61 |
| 4.1.2.3.2 – Métodos comparativos – absorção espectrofotométrica no ultravioleta visível (UV-Vis) e titulação potenciométrica.....                                  | 69 |
| 4.1.3 – Determinação simultânea de ABZ-SO e LVM utilizando-se um sistema FIA e detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA) .....                           | 74 |
| 4.1.3.1 – Investigação do comportamento eletroquímico de ABZ-SO e LVM e efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao BDD .....                 | 74 |
| 4.1.3.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico .....   | 76 |
| 4.1.3.2 – Determinação amperométrica de ABZ-SO e LVM e aplicação do método proposto na determinação de amostras de urina .....                                     | 77 |
| 4.1.3.2.1 – Otimização dos parâmetros amperométricos e do sistema FIA-MPA.....   | 77 |
| 4.1.3.2.2 – Comportamento amperométrico do ABZ-SO e LVM frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial .....  | 81 |
| 4.2 – Determinação de anti-hipertensivos.....  | 89 |
| 4.2.1 – Investigação do comportamento eletroquímico do HTZ e ENP e estudo do efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD..... | 89 |

---

---

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico .....  | 91         |
| 4.2.1.2 –Efeito do eletrólito suporte .....   | 92         |
| 4.2.2 – Mecanismo de oxidação do HTZ sobre o eletrodo de BDD-CPT .....  | 93         |
| 4.2.2.1 – Voltametria cíclica .....   | 94         |
| 4.2.2.2 – Eletrólise em potencial controlado.....   | 96         |
| 4.2.3 – Determinação amperométrica de HTZ e ENP e aplicação do método proposto na determinação de amostras farmacêuticas..... | 97         |
| 4.2.3.1 – Otimização dos parâmetros do sistema FIA-MPA .....  | 97         |
| 4.2.3.2 – Comportamento amperométrico da HTZ e ENP frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial .....              | 101        |
| 4.2.3.3 – Método comparativo – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).. ..   | 108        |
| <br>  |            |
| <b>5 – CONCLUSÕES.....</b>  | <b>112</b> |
| <br>  |            |
| <b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>114</b> |

---

# **1– INTRODUÇÃO**

## **1.1 – Anti-helmínticos**

Os helmintos são animais metazoários (organismos pluricelulares) de vida livre ou parasitas de plantas e animais, incluindo o homem. É um grupo muito numeroso, composto de vários filos, entre os mais importantes estão, platelmintos, asquelmintos e nematelmintos<sup>1</sup>. Estes filos são divididos em classes, onde as mais importantes em relação às infecções parasitárias são: cestódeos (tênia), nematódeos (lombrigas) e vermes trematódeos (do fígado). As infecções por helmintos são controladas através da administração de agentes anti-helmínticos.

Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas, apenas no continente americano, estejam infectadas por algum tipo de parasita intestinal e que milhares de óbitos ocorrem a cada ano devido a este tipo de infecção, sendo também este tipo de doença bastante comum entre os animais<sup>2,3</sup>.

No Brasil, a contaminação populacional por helmintos é intensa, principalmente em determinadas regiões como norte e nordeste, em função, sobretudo, da deficiência de saneamento básico e da precária educação sanitária<sup>4,5</sup>. Desta maneira, este tipo de doença pode ser considerado um problema de saúde pública, apesar do avanço nos medicamentos antiparasitários<sup>6,7</sup>.

Os anti-helmínticos são medicamentos que agem expelindo os vermes do trato gastrointestinal ou, de forma sistêmica, erradicando os helmintos adultos ou formas de desenvolvimento que invadem órgãos e tecidos. Estes medicamentos são amplamente utilizados tanto no tratamento de seres humanos, quanto na medicina veterinária<sup>8</sup>.

Existem no mercado diversos produtos anti-helmínticos com diferentes tipos de ação, podendo também ser de diferentes classes

---

farmacológicas<sup>9</sup>. Os anti-helmínticos estão agrupados em duas categorias: de amplo espectro, que atuam em praticamente todos os nematódeos, e de curto espectro, que atuam em alguns outros gêneros de helmintos<sup>8</sup>.

O controle das helmintoses com a utilização de fármacos é o método mais empregado atualmente. Porém, a utilização indiscriminada e o uso incorreto destes medicamentos, têm como consequência a seleção de populações de helmintos resistentes aos diferentes fármacos<sup>10,11</sup>, sendo uma das alternativas encontradas a associação de princípios ativos<sup>12-14</sup>. Assim, a combinação dos diferentes compostos já existentes pode ser um dos caminhos para o controle da resistência anti-helmíntica<sup>9</sup>.

Para evitar problemas de resíduos em produtos de origem animal e de intoxicação devido ao consumo diário, o Brasil, via ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) em diversos alimentos e valores máximos de ingestão diária aceitáveis (IDA) para estes compostos<sup>15</sup>. No entanto, os limites nacionais ainda não foram definidos pelo setor de saúde brasileiro, e, portanto, vem-se utilizando no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (Instrução Normativa/MAA N° 42, de 20 de dezembro de 1999), os níveis obtidos de referências internacionais como, MERCOSUL, Codex Alimentarius, FDA/USA e União Européia<sup>16</sup>.

### **1.1.1 – Albendazol (ABZ) e sulfóxido de albendazol (ABZ-SO)**

O ABZ (FIGURA 1.1), é um anti-helmíntico pertencente à classe dos benzimidazóis.

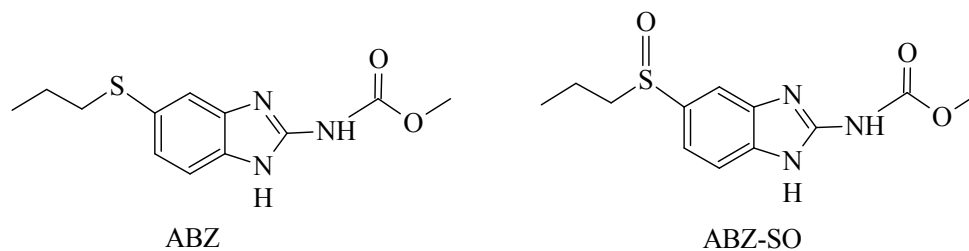


FIGURA 1.1 – Estruturas químicas dos anti-helmínticos ABZ e ABZ-SO.

De acordo com VAN DEN ENDEN<sup>17</sup> o ABZ é um dos mais importantes medicamentos anti-helmíntico disponível no mercado (juntamente com praziquantel e ivermectina) sendo de fácil utilização e com atividade contra diversos helmintos. Há também disponível no mercado o medicamento na forma de sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) (metabólito do ABZ), também chamado de ricobendazol<sup>18</sup>.

ABZ é um anti-helmíntico extensivamente metabolizado para seu principal metabólito ativo, o ABZ-SO e depois metabolizado na sua forma inativa, albendazol sulfona (ABZSO<sub>2</sub>)<sup>19,20</sup>. Devido a este extenso metabolismo, concentrações de ABZ em plasma são baixas, assim estudos farmacocinéticos são desenvolvidos usando-se seus principais metabólitos, ABZ-SO e ABZSO<sub>2</sub><sup>19,21</sup>.

O ABZ é excretado principalmente pela urina na forma de seus principais metabólitos (ABZ-SO, ABZSO<sub>2</sub> e albendazol 2-amino sulfona)<sup>22</sup>. Os principais resíduos de ABZ ocorrem no fígado e rim<sup>23</sup>.

De acordo com estudos realizados por MARRINER et al.<sup>24</sup>, um indivíduo excreta, via urina, 0,88 % de todo o ABZ ingerido (400 mg de ABZ - dose diária recomendada para um indivíduo) na forma de ABZ-SO. Assim, considerando-se estes valores em concentração (utilizando a massa molar da ABZ = 265,34 g mol<sup>-1</sup>) e considerando esta ingestão em um litro de urina, este indivíduo deve excretar 1,51 mmol L<sup>-1</sup> de ABZ, sendo 13,3 μmol L<sup>-1</sup> excretado pela urina na forma de ABZ-SO.

Enquanto ABZ possui um efeito terapêutico, alguns estudos farmacocinéticos indicam que ABZ-SO é responsável tanto pelo efeito anti-helmíntico quanto pelos efeitos tóxicos<sup>25</sup>.

Os anti-helmínticos, geralmente, apresentam baixa toxicidade, no entanto, alguns estudos relatam a observação de mal formação congênita resultante da administração de ABZ durante a gestação em ovelhas, porém o uso de ABZ durante a gravidez não é contra-indicado para o gado<sup>22,23</sup>. Em contrapartida, a segurança em expor, a essas substâncias, as crianças menores de um ano de idade, durante a gravidez e lactação tem sido questionada<sup>26</sup>.

Para evitar problemas, a legislação do MERCOSUL, estabelece valores de IDA de 0 –50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  15 (peso corpóreo do indivíduo) para os resíduos de ABZ (ABZ-SO e ABZSO<sub>2</sub>) em alimentos de origem animal.

A determinação de ABZ em diversas matrizes biológicas requer a determinação simultânea deste com seus metabólitos, ou apenas de seus metabólitos, considerando que, estes são os principais componentes encontrados após sua ingestão.

Diversos métodos analíticos para determinação individual ou simultânea de ABZ e seus metabólitos são descritos na literatura, como por exemplo métodos espectrofotométricos<sup>27</sup> e cromatográficos<sup>28-32</sup>. Além disso, muitos destes métodos cromatográficos foram desenvolvidos para a determinação de ABZ e seus metabólitos em diferentes matrizes, tais como, tecidos biológicos<sup>33</sup>, plasma<sup>28,29,34</sup>, urina<sup>35</sup>, leite<sup>36</sup>, formulações farmacêuticas<sup>37</sup> entre outros. Porém, poucos métodos são descritos na literatura para a determinação de ABZ utilizando técnicas eletroquímicas<sup>38-41</sup> e nenhum trabalho descrevendo a determinação de ABZ-SO empregando-se técnicas eletroquímica foi descrito.

MSAGATI e NGILA<sup>38</sup> desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de anti-helmínticos da classe dos benzimidazóis utilizando um eletrodo rotativo de carbono vítreo modificado com poli (3-metil-tiofeno).

Para ABZ, o LD obtido utilizando-se voltametria de onda quadrada (SWV) foi de  $0,33 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com uma faixa de concentração linear de 3,9 a  $29,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

DE OLIVEIRA e STRADIOTTO<sup>40</sup> desenvolveram um método voltamétrico para a determinação de ABZ em formulações farmacêuticas utilizando voltametria de varredura linear (LSV), SWV, voltametria de pulso diferencial (DPV) e um eletrodo de carbono vítreo (GC) como eletrodo de trabalho. Os limites de detecção, utilizando estas técnicas voltamétricas, foram de 0,30, 0,62, e  $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

ABU ZUHRI et al.<sup>41</sup> determinaram ABZ utilizando DPV e redissolução catódica em eletrodo gotejante de mercúrio, utilizando o pico de redução do complexo de ABZ-Cu(II) em  $-0,28 \text{ V}$  (*vs.* SCE), após acúmulo do complexo no eletrodo em  $0,00 \text{ V}$  por 180 s. A curva analítica foi linear de 0,03 a  $0,90 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o LD obtido foi de  $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 1.1.2 – Ivermectina (IVM)

Na metade da década de 70 foi descoberto um novo grupo de medicamento, que passou a ser comercializado no Brasil a partir de 1981, conhecido como lactonas macrocíclicas, compreendendo as avermectinas e milbemicinas, caracterizadas pela possibilidade de utilização em diversas espécies de animais e pela elevada eficácia contra artrópodes e nematódeos<sup>42</sup>.

Na FIGURA 1.2 é apresentada a estrutura química da IVM, um anti-helmíntico representante da classe das avermectinas, sendo este uma mistura de dois homólogos de no mínimo 80% da avermectina 22,23-dihidroavermectina B<sub>1a</sub> e de no máximo 20% da avermectina 22,23-dihidroavermectina B<sub>1b</sub><sup>43</sup>.

Este agente antiparasitário é um dos mais frequentemente utilizados no tratamento de várias infecções de nematóides e artrópodes que infectam



animais, bem como seres humanos, devido ao seu amplo espectro de atividade, elevada eficácia e ampla margem de segurança<sup>44,45</sup>.

Outras aplicações da IVM na saúde humana incluem o tratamento da sarna, piolhos e infecções parasitárias em pacientes com AIDS<sup>46</sup>.

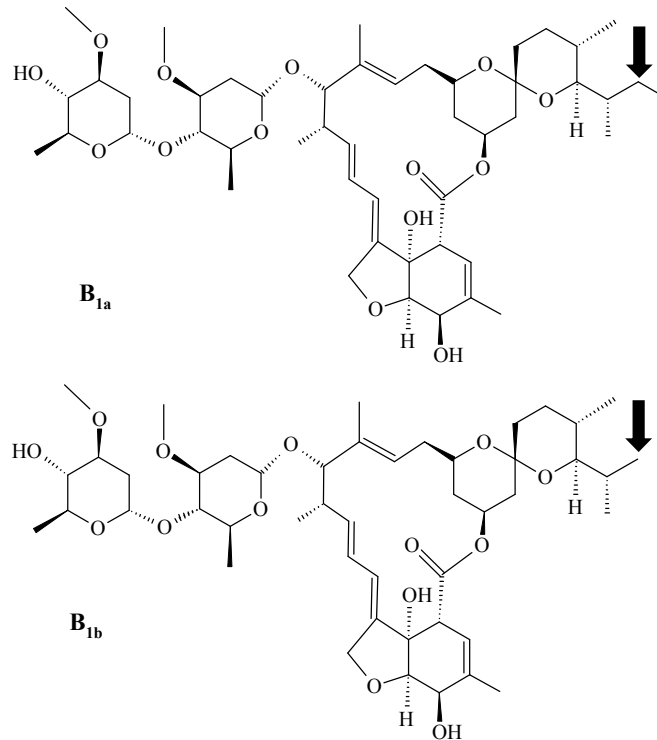


FIGURA 1.2 – Estrutura química da IVM.

Nos últimos anos, tem sido relatado na literatura médica intoxicação do sistema nervoso central em seres humanos por avermectinas. Estado mental alterado, hipotensão e insuficiência respiratória são alguns sintomas de envenenamento grave em seres humanos causadas por doses mais elevadas de avermectinas quando penetram na barreira hemato-encefálica<sup>47,48</sup>.

A fim de evitar problemas de intoxicação, a legislação do MERCOSUL, por exemplo, estabelece a quantidade de ingestão diária aceitável (IDA) de 0 a 1,0 mg kg<sup>-1</sup> por peso corpóreo<sup>15</sup>.

Estudos farmacocinéticos demonstram que a IVM é sistemicamente absorvida depois da administração oral ou subcutânea, porém é melhor absorvida quando administrada por via subcutânea<sup>49,50</sup>.

A partir de estudos com IVM radiomarcada em bovinos, ovinos, suínos e ratos, verificou-se que a IVM é essencialmente excretada pelas fezes e apenas porcentagens de 0,5 a 2,0 % são excretadas pela urina<sup>51,43</sup>.

Em humanos, a ivermectina excretada, via urina, é de no máximo 2% de toda IVM ingerida. A dose diária recomendada para um indivíduo é de 200 µg de IVM por kg de peso corpóreo<sup>45,51</sup>, sendo assim, uma pessoa com 70 kg pode ingerir uma dose de 14,0 mg de IVM por dia. Transformando-se estes valores em concentração (utilizando a massa molar da IVM = 875,10 g mol<sup>-1</sup>) e considerando esta ingestão em um litro de urina, este indivíduo deve excretar 16,0 µmol L<sup>-1</sup> de IVM, sendo 0,32 µmol L<sup>-1</sup> via urinária.

Muitos métodos cromatográficos foram desenvolvidos nos últimos anos para a determinação de ivermectina em diferentes matrizes, tais como tecidos bovinos<sup>52</sup>, leite<sup>53,54</sup>, soro<sup>54</sup>, plasma<sup>55</sup>, formulações farmacêuticas<sup>56</sup> entre outros<sup>46,57,58</sup>. No entanto, não foram encontrados na literatura relatos sobre o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de IVM.

### 1.1.3 – Levamisol (LVM)

Em 1966, o LVM foi identificado como a fração levógira do fármaco já existente, o tretamisol, e o responsável pela eficácia do produto, sendo atualmente comercializado nas formas de cloridrato e fosfato<sup>59</sup>.

O LVM (FIGURA 1.3) é um anti-helmíntico de amplo espectro utilizado em bovinos, ovinos, caprinos, suínos, aves e seres humanos bem como em outras indicações, incluindo, em seres humanos, terapia adjuvante em tratamento do câncer e seu uso também tem sido focado em seus efeitos imunomoduladores<sup>60</sup>. Recentemente LVM também tem sido identificado como

um adulterante da cocaína<sup>61,62</sup>, pois potencializa os efeitos produzidos sobre a estimulação do sistema nervoso central.

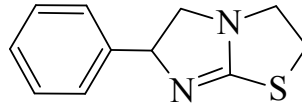


FIGURA 1.3 – Estrutura química do LVM.

Efeitos adversos na saúde, tais como, agranulocitose, vasculite cutânea e leucoencefalopatia<sup>63,64</sup>, são reportados após a administração oral deste fármaco.

Embora sejam utilizados na indústria de aves, os EUA regulamentam o nível de tolerância nos tecidos comestíveis ( $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) apenas para bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Alguns países proíbem seu uso em espécies lactantes. No entanto, alguns estudos mostraram que há um aumento na produção de leite devido ao tratamento com este anti-helmíntico, sendo assim, este é muitas vezes utilizado de forma indiscriminada<sup>65</sup>. No Brasil, a legislação do MERCOSUL regulamenta para o LVM uma IDA de  $0 - 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  por unidade de peso corpóreo do indivíduo<sup>15</sup>.

Há poucos relatos publicados sobre a farmacologia clínica de levamisol e seus metabólitos em seres humanos. Embora o LVM seja extensivamente metabolizado in vivo, os únicos metabólitos confirmados em urina humana são p-hidroxilevamisole e seu metabólito glucoronido<sup>66</sup>.

O LVM pode ser administrado via oral, subcutânea ou transcutânea tendo absorção rápida em todas as formas de administração. O LVM é parcialmente metabolizado no fígado e a eliminação se dá pelas fezes, leite e principalmente pela urina, sendo que apenas 5% é excretado na urina de forma não modificada<sup>67</sup>.

A dose padrão diária comum em humanos, 150 mg, é dada em um dose única ou em doses divididas, correspondentes a 2,5 mg por kg de peso corpóreo do indivíduo<sup>68</sup>.

Considerando-se que um indivíduo excreta de forma não modificada, via urina, no máximo 5%<sup>67</sup> de todo LVM ingerido e que a dose diária recomendada para um indivíduo é de 150 mg<sup>68</sup>, calculando-se estes valores em concentração (utilizando a massa molar da LVM = 240,75 g mol<sup>-1</sup>) e considerando esta ingestão em um litro de urina, este indivíduo deve excretar 0,62 mmol L<sup>-1</sup> de LVM, sendo que 31,2 μmol L<sup>-1</sup> é via urinária.

Diversos métodos têm sido propostos na literatura para a determinação de LVM. Estes métodos incluem principalmente cromatografia líquida acoplada com diferentes detectores<sup>62,69,70</sup>. Entretanto, nenhum método simultâneo para LVM e ABZ-SO (principalmente metabólito do ABZ encontrado em urina) é descrito na literatura utilizando técnicas eletroquímicas. Além disso, para a determinação individual de LVM, há poucos métodos eletroanalíticos já propostos, sendo de nosso conhecimento, apenas dois.

HOLBROOK et al.<sup>71</sup> determinaram cloridrato de tetramisol em extratos de tecidos animais utilizando polarografia. Neste trabalho os autores observaram dois picos de redução da molécula, porém esta foi quantificada em apenas um dos potenciais (-1,50 V) e o composto pôde ser medido em concentração mínima de 0,001 μg mL<sup>-1</sup> (0,004 μmol L<sup>-1</sup>).

SADEGHI et al.<sup>72</sup> desenvolveram um sensor potenciométrico baseado num polímero com impressão molecular para o reconhecimento e determinação de cloridrato de levamisol. As características do sensor proposto foram avaliadas utilizando o potencial de resposta do cloridrato de levamisol, no intervalo de atividade de 2,5 μmol L<sup>-1</sup> – 100 mmol L<sup>-1</sup>, com uma resposta quase Nernstiana de 57,0 mV / década e um LD de 1,0 μmol L<sup>-1</sup>.

## 1.2 – Anti-hipertensivos

Hipertensão arterial, usualmente chamada de pressão alta, é uma condição definida por elevação do valor da pressão arterial sistólica acima de 140 mmHg (milímetros de mercúrio) ou da pressão diastólica acima de 90 mmHg. A pressão pode se elevar por vários motivos, mas, principalmente, porque os vasos nos quais o sangue circula se contraem<sup>73</sup>.

A hipertensão arterial pode atacar os vasos sanguíneos, coração, rins e cérebro sendo um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais<sup>73</sup>.

É uma doença com alta prevalência na população brasileira e mundial, com elevado custo econômico-social, principalmente em decorrência das suas complicações<sup>74</sup>.

De acordo com dados do ministério da saúde, em 2006 no Brasil, cerca de 17 milhões de pessoas eram portadores de hipertensão arterial, 35% da população com 40 anos ou mais. Esse número é bastante crescente, sendo seu aparecimento cada vez mais precoce com uma estimativa de que cerca de 4% das crianças e adolescentes também sejam portadoras<sup>73</sup>.

Existem, basicamente, duas abordagens terapêuticas para a hipertensão arterial: o tratamento baseado em modificações do estilo de vida, como incentivo às atividades físicas e alimentação saudável, e o tratamento medicamentoso, utilizando-se, neste caso, os agentes anti-hipertensivos<sup>73</sup>.

Com base em diversos estudos que mostram que em cerca de dois terços dos casos de hipertensão a monoterapia não foi suficiente para atingir as reduções de pressão previstas, há uma tendência atual para a introdução da terapêutica combinada de anti-hipertensivos como medida medicamentosa. Assim, a associação de medicamentos pode, através de efeitos sinérgicos e aditivos, atingir mais rapidamente o objetivo do tratamento<sup>75</sup>.

---

Medicamentos contendo os princípios ativos, enalapril (ENP) e hidroclorotiazida (HTZ) em associações, têm sido bastante comercializado para o tratamento do controle da pressão arterial<sup>76</sup>.

### 1.2.1 – Enalapril (ENP) e hidroclorotiazida (HTZ)

O ENP (FIGURA 1.4) é classificado, dentro dos anti-hipertensivos, como um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), a inibição da ECA resulta em um nível plasmático diminuído de angiotensina II, e como consequência, leva a uma diminuição da atividade vasopressora e diminuição da secreção da aldosterona o que pode resultar em discreto aumento nos níveis séricos do potássio<sup>77</sup>.

É um monoéster e derivado de dois aminoácidos, a L-alanina e a L-prolina, precisando ser hidrolisado no fígado para a produção do enalaprilato (forma ativa). Portanto, é considerado uma pró-droga, com rápida absorção e boa biodisponibilidade<sup>77</sup>. O ENP é administrado na forma do sal, maleato de enalapril.

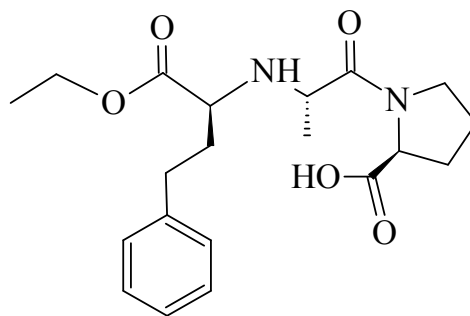


FIGURA 1.4 – Estrutura química do ENP.

Seu comportamento farmacocinético é linear, no qual há um aumento da concentração sérica proporcionalmente ao aumento da dose administrada. A excreção do ENP é renal, com uma fração de 40% da dose eliminada na urina como enalaprilato, e o restante como enalapril intacto<sup>77,78</sup>.

O ENP parece ser bem tolerado, porém apresenta alguns efeitos adversos. Os efeitos adversos mais comuns associados com o uso de enalapril são dor de cabeça, tonturas, fadiga, diarreia, náuseas, erupções cutâneas, tosse e hipotensão, nos casos mais raros há a ocorrência de angioedema, hipercalcemia, ou insuficiência renal aguda<sup>79</sup>.

A HTZ é um dos tipos de diurético da classe dos tiazídicos, a FIGURA 1.5 apresenta a estrutura química deste composto. Os diuréticos são substâncias que aumentam o fluxo urinário e atuam na redução da capacidade tubular de reabsorção de sódio e água. Possuem amplas indicações no tratamento de doenças como edema renal, hepático e cardíaco e também na hipertensão arterial sistêmica, hipercalcemia e diabetes insípido nefrogênico<sup>80</sup>.

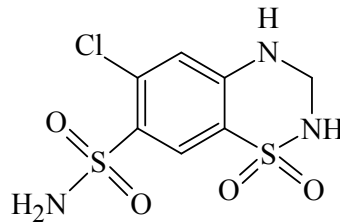


FIGURA 1.5 – Estrutura química da HTZ.

É bastante eficaz via administração oral, sendo bem absorvida pelo trato gastrointestinal e excretada, principalmente, via excreção renal pela urina sem sofrer metabolização<sup>81</sup>.

A HTZ apresenta como principais efeitos adversos o resultado de suas ações renais, como a redução de potássio plasmático, o que pode induzir arritmias ventriculares<sup>76</sup>. Outros efeitos indesejáveis são a alcalose metabólica, o aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico e a hiperglicemia, devendo por isso, ser usado com cautela<sup>82 81</sup>.

Dentro deste contexto, é importante e de interesse o desenvolvimento de técnicas que sejam cada vez mais sensíveis na determinação destes compostos, porém, a maioria dos procedimentos descritos na literatura

para estes compostos, emprega técnicas cromatográficas, que são técnicas com uma instrumentação relativamente cara, nas quais, também podem ser necessários longos tempos de análise e tratamento das amostras.

Os métodos eletroanalíticos são bem menos empregados neste tipo de determinação, no entanto, estes podem apresentar algumas vantagens frente aos métodos cromatográficos, como, por exemplo, menor consumo de reagentes, menor tempo de análise e instrumentação de menor custo. Alguns trabalhos envolvendo métodos eletroquímicos para a determinação individual destes compostos são encontrados na literatura. No caso do ENP, apenas um trabalho envolvendo a determinação eletroquímica é descrito.

GUSAKOVA e IVANOVSKAYA<sup>83</sup> desenvolveram um método para a determinação de ENP em amostras biológicas utilizando voltametria de redissolução anódica e um eletrodo de filme de mercúrio. Neste método, os autores realizaram uma pré-concentração do ENP em potencial de  $-1,3$  V em meio de KCl  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  durante 5 min. Após esta etapa de pré-concentração, ao realizar a varredura (de  $-1,20$  V a  $-0,20$  V), obteve-se um pico de oxidação próximo a  $-0,9$  V. Uma faixa linear foi obtida nas concentrações de  $2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  –  $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$ .

KARIMI-MALEH et al.<sup>84</sup> desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de HTZ em formulações farmacêuticas e urina, empregando-se um eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido ferrocenodocarboxílico e a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). Foram obtidas duas faixas lineares nas concentrações de  $0,08$  –  $5,80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $5,80$  –  $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , com um LD de  $0,037 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

RAZAK<sup>85</sup> utilizou um eletrodo de carbono vítreo, juntamente com a técnica de DPV para a determinação de HTZ em amostras farmacêuticas e urina. A faixa linear de concentração obtida neste trabalho foi de  $24$  –  $320 \text{ ng mL}^{-1}$  com limites de detecção de  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $16,8 \text{ nmol L}^{-1}$ ) para soluções padrões e de  $14,0 \text{ ng mL}^{-1}$  para urina.

---



O estudo do comportamento eletroquímico e a determinação de HTZ em amostras de urina e formulações farmacêuticas sobre um eletrodo de carbono vítreo, modificado com nanotubos de carbono, utilizando a voltametria de redissolução anódica em circuito aberto, foi descrita por REZAEI e DAMIRI<sup>86</sup>. Sob as condições empregadas foram obtidas duas faixas lineares de concentração: 2,0 – 20,0 nmol L<sup>-1</sup> e 0,2 – 100,0 μmol L<sup>-1</sup> com LD de 0,8 nmol L<sup>-1</sup>.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura para a determinação simultânea de ENP e HTZ em diversas matrizes, a grande maioria emprega os métodos cromatográficos<sup>87-90</sup>.

### 1.3 – Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos compreendem um grupo de métodos analíticos baseados nas propriedades elétricas de um analito em solução. Dentre estes, se encontram os métodos voltamétricos, que se baseiam na medida da corrente em função do potencial, em uma célula eletroquímica sob condições de polarização, na qual a velocidade de reação (oxidação ou redução) da espécie analisada é limitada pela velocidade de transferência de massa e de carga entre a espécie de interesse e a superfície do eletrodo<sup>91</sup>.

Os diferentes tipos de voltametria podem empregar diversos tipos de sinais de excitação em forma de onda, sendo a mais simples delas a LSV, a qual o potencial varia linearmente entre um valor máximo e um valor mínimo.

Dentre as técnicas voltamétricas, a CV é bastante aplicada como ferramenta de diagnóstico para fornecer informações acerca do mecanismo de reações redox.

Já as SWV e DPV são técnicas com aplicações de pulsos de potencial que possibilitam a aquisição de dados com sensibilidade comparável àquelas obtidas com o emprego de técnicas cromatográficas com detecção por

espectrofotometria de absorção no ultravioleta, por isso, são as técnicas mais utilizadas nas quantificações de diversos analitos nas mais diversas matrizes<sup>91</sup>.

### **1.3.1 – Amperometria de múltiplos pulsos e sistema de análise por injeção em fluxo (FIA-MPA)**

A análise por injeção em fluxo (FIA) tem apresentado diversas vantagens, tais como, baixo custo dos componentes do sistema, elevada frequência de amostragem, possibilidade de automatização, consumo reduzido de reagentes e amostras e, conseqüentemente, redução na geração de resíduos.

Dentro deste contexto, o sistema FIA pode ser facilmente associado a detecção amperométrica convencional apresentando algumas vantagens em comparação aos métodos voltamétricos convencionais considerando que pode ser mais sensível e apresentar menores efeitos de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que o tempo de contato da amostra e dos produtos do processo redox com o eletrodo é muito menor do que em processos estacionários e, além disso, a presença de corrente capacitiva é negligenciável, o que favorece a detecção de baixas concentrações<sup>92</sup>.

No entanto, a detecção amperométrica convencional apresenta uma limitação que é a dificuldade da determinação simultânea de compostos eletroativos com potenciais redox distintos<sup>92</sup>, este problema pode ser contornado utilizando-se dois eletrodos de trabalho, porém nesse caso é necessário a utilização de um bipotenciostato ou multipotenciostatos para controlar o potencial de cada eletrodo de trabalho, aumentando a complexidade da análise e conseqüentemente o custo da instrumentação.

Assim, uma alternativa para a resolução deste problema, em questões de custos, seria a utilização da amperometria no modo pulsado utilizando um simples potenciostato.

---

Na amperometria de modo pulsado os pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho, sequencialmente e continuamente, em função do tempo. Esta técnica amperométrica no modo pulsado é disponibilizada em diversos potenciostatos comerciais.

No potenciostato comercializado pela empresa Metrohm - Eco Chemie, a técnica é disponibilizada pelo software que controla este potenciostato (software GPES). Este software permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com a possibilidade de aquisição da corrente em função do tempo em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de 10 amperogramas distintos “simultaneamente”), essa técnica é conhecida como amperometria de múltiplos pulsos (MPA)<sup>92</sup>.

Assim, os trabalhos descritos na literatura que aplicam a detecção MPA acoplada ao sistema FIA apresentam como vantagem a possibilidade de aplicação de dois ou mais pulsos de potenciais nos quais, um pulso é utilizado para a detecção do analito e os outros pulsos são utilizados para realizar a limpeza e/ou ativação da superfície do eletrodo de trabalho no transcorrer do experimento, e ainda a possibilidade de detecção simultânea de diversos analitos de forma direta ou indireta, com a vantagem de não necessitar de tratamento prévio da amostra ou até mesmo, tratamentos quimiométricos dos resultados obtidos<sup>93</sup>.

Além das vantagens apresentadas pela técnica FIA-MPA, a utilização do eletrodo de BDD, via de regra, elimina a necessidade da utilização de um potencial para a limpeza do eletrodo, uma vez que uma das características deste eletrodo é a baixa adsorção.

Sendo assim, observa-se que a detecção MPA associada a um sistema FIA é extremamente interessante para o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a análise individual ou simultânea de compostos eletroativos, direta ou indiretamente.

---

## 1.4 – Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante, por ser naturalmente um isolante, não fornece requisitos necessários para sua utilização em eletroquímica. Além disso, o diamante que é de difícil acesso natural, apresentava como desvantagem condições de síntese drásticas como altas temperaturas e altas pressões, sendo assim, não era viável o uso deste material como material eletródico<sup>94</sup>.

Com a melhora na tecnologia para a fabricação de filmes de diamante a partir da fase vapor, métodos efetivos para o crescimento de filmes de diamante sintético começaram a ser desenvolvidos. Utilizando a dopagem do diamante com boro, filmes semicondutores começaram a ser fabricados, o que fez aumentar a procura por este material para fins eletroquímicos<sup>94-96</sup>.

POFERL et al.<sup>97</sup>, em 1973, foram os primeiros a crescer BDD a baixas pressões, empregando a técnica de CVD (deposição química a partir da fase vapor), a partir da mistura  $B_2H_6/CH_4$ , usando grãos de diamante natural como substrato.

Os eletrodos de BDD possuem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outros eletrodos à base de carbono comumente utilizados, tais como o carbono vítreo, o grafite pirolítico e a pasta de carbono. Algumas dessas propriedades são<sup>98</sup>: a) estabilidade à corrosão em meios muito agressivos; b) baixa e estável corrente de fundo; c) estabilidade de resposta em longo prazo; d) fraca adsorção e; e) larga janela de potencial em meio aquoso e não-aquoso. Neste eletrodo, a reação de desprendimento de hidrogênio começa em  $-1,5$  V e a de desprendimento de oxigênio em  $+2,3$  V vs. Ag/AgCl ( $KCl$   $3$  mol  $L^{-1}$ ) em solução de ácido sulfúrico  $0,5$  mol  $L^{-1}$ .

Em função dessas propriedades únicas, o eletrodo de BDD está sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos

eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos<sup>99-103</sup> e inorgânicos<sup>104-106</sup>, nas mais diversas matrizes<sup>107-109</sup>.

De acordo com muitos autores, as superfícies dos filmes de BDD recém-preparadas são terminadas em hidrogênio, entretanto, esta terminação pode ser facilmente mudada para oxigênio, por exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição ou ainda usando-se polarizações anódicas. Por outro lado, para se obter novamente o eletrodo de BDD com terminações superficiais em hidrogênio, pode-se realizar uma polarização catódica, por exemplo. Assim, é possível que se tenha eletrodos de BDD com terminações superficiais preferencialmente em hidrogênio ou em grupos contendo oxigênio, sendo estas superfícies hidrofóbicas ou hidrofílicas, como ilustrado na FIGURA 1.6.

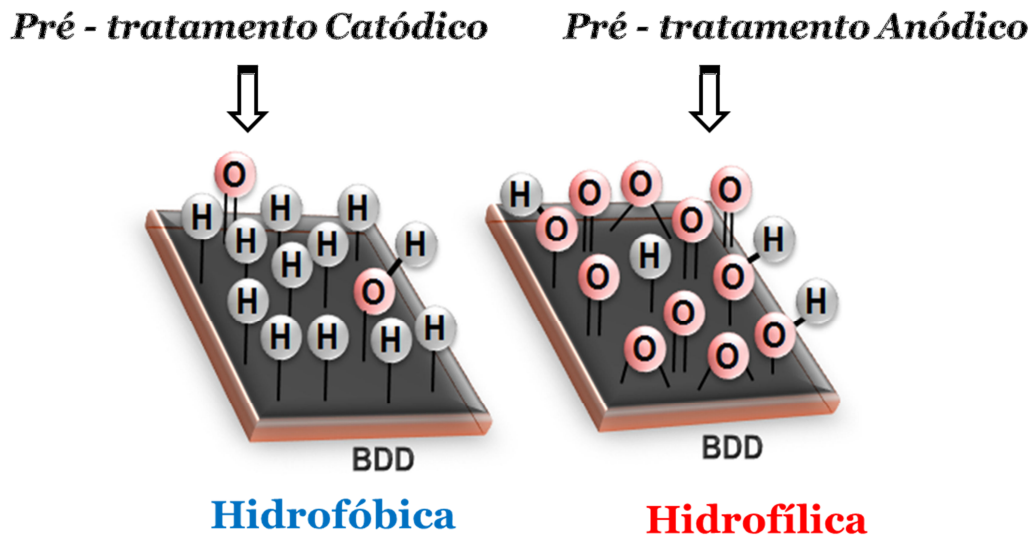


FIGURA 1.6 – Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais dos eletrodos de BDD.

YAGI et al.<sup>110</sup> e GRANGER e SWAIN<sup>111</sup>, foram os primeiros a relatarem a influência da terminação superficial do eletrodo de BDD em seu comportamento eletroquímico.

No trabalho descrito por YAGI et al.<sup>110</sup> foram comparados os comportamentos eletroquímicos de eletrodos de BDD sem tratamento (como preparado) e com tratamento em plasma de oxigênio. Observou-se que a superfície do eletrodo que é hidrofóbica antes do tratamento (terminação em hidrogênio), torna-se hidrofílica após o tratamento.

De acordo com os autores, houve mudança no comportamento eletroquímico de diferentes pares redox após o tratamento, a transferência de elétrons dos pares redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  e  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$  tornou-se mais lenta para o eletrodo tratado, enquanto que, para o par redox  $\text{Fe}^{3+/2+}$  a transferência de elétrons foi acelerada e ainda, para os pares  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$  e  $\text{Co}(\text{en})_3^{3+/2+}$  não houve mudança no comportamento eletroquímico. Os resultados obtidos indicam, segundo os autores, que há uma diminuição na velocidade de transferência de carga para espécies com cargas negativas quando se utiliza o eletrodo de BDD tratado com plasma de oxigênio (com terminações superficiais em O).

SUFFREDINI et al.<sup>112</sup> utilizando um eletrodo de BDD, estudaram o comportamento da sua resposta eletroquímica após um pré-tratamento catódico ( $-3,0$  V por 30 min em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) da superfície. Os resultados destas investigações demonstraram que a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é extremamente afetada pelo tipo de pré-tratamento aplicado à superfície deste eletrodo, sendo que, esse tratamento catódico promoveu o aumento da atividade eletroquímica do eletrodo. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos pré-tratados anódica e catodicamente confirmaram as diferenças experimentais observadas e salientadas anteriormente. Ademais, segundo os autores, os resultados obtidos sugerem que ocorre uma transformação interna do filme de BDD ou, mais provavelmente, a presença de uma camada ativa responsável pelo comportamento observado.

Em um trabalho realizado por TERASHIMA et al.<sup>113</sup> o eletrodo de BDD pré-tratado anodicamente apresentou voltamogramas bem definidos para

compostos contendo enxofre, os quais são difíceis de oxidar em outros tipos de eletrodos, incluindo o BDD com terminação em hidrogênio. Os autores acreditam que os grupos funcionais oxigenados da superfície do BDD facilitam a atração eletrostática entre a superfície oxigenada e as moléculas carregadas positivamente enquanto que os radicais OH adsorvidos, gerados a partir da descarga de água, facilitam a transferência de oxigênio para o enxofre na molécula.

Adicionalmente, em trabalho realizado por CHAILAPAKUL et al.<sup>114</sup>, o eletrodo de BDD com terminações em grupos oxigenados também apresentaram bons resultados na determinação de homocisteína, enquanto que, os eletrodos de BDD com terminações em hidrogênio não apresentaram sinal de oxidação para o mesmo composto.

Em contrapartida, MEDEIROS et al.<sup>115</sup> relataram que após a realização de um pré-tratamento catódico ( $500 \text{ mA cm}^{-2}$  por 180 s em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ) os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo apresentaram uma melhora significativa da resposta eletroquímica quando comparada ao eletrodo pré-tratados anodicamente (superfície oxigenada).

Em outros trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, eletrodos de BDD pré-tratados catodicamente, também apresentaram melhores desempenhos com relação aos BDD pré-tratados anodicamente na determinação de diversos fármacos<sup>99,116,117</sup> e antioxidantes<sup>118</sup>.

Assim, como discutido e demonstrado por diversos autores, o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD é extremamente dependente das terminações superficiais do eletrodo, podendo estas tanto facilitar quanto inibir diferentes tipos de reação química sobre a superfície do eletrodo de BDD, porém nada ainda foi concluído com relação a interação analito – superfície do eletrodo.

## **2 – OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho de doutorado foi o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea e/ou individual dos anti-helmínticos, albendazol, albendazol sulfóxido, ivermectina e levamisol e dos anti-hipertensivos, hidroclorotiazida e enalapril, empregando-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial e amperométrica de múltiplos pulsos acoplada a um sistema FIA e o eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho.

O objetivo específico foi a avaliação do comportamento eletroquímico de todos os analitos estudados sobre o eletrodo de BDD após a realização de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos neste.

---



### 3 – PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 – Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram executadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 12 ou  $\mu$ Autolab do tipo III (Eco Chemie) interfaciados a microcomputadores e gerenciados pelo programa computacional GPES 4.9.

As balanças analíticas utilizadas para as pesagens foram, Shimadzu (modelo AUW220D) e Mettler (modelo H10).

O banho de ultrassom utilizado foi um UNIQUE, modelo Ultraclean 1400 A.

Para as medidas de pH e nas titulações potenciométricas, utilizou-se um pHmetro Orion, modelo EA 940.

Na titulação potenciométrica foi utilizada uma bureta automática da Schott Gerate, modelo T80/20.

O espectrofotômetro utilizado para o método comparativo foi o da Shimadzu, modelo 2550.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS modelo SPD-M10AVP, coluna  $C_{18}$  Shim-Pack CLC-ODS ( $4,6 \times 150$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) e um injetor manual com alça de amostragem de 50 ou 20  $\mu\text{L}$ .

##### 3.1.1 – Eletrodos

O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas voltamétricas foi o eletrodo Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para as medidas amperométricas foi utilizado o eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) miniaturizado construído como descrito por PEDROTTI et al.<sup>119</sup>.

---

O eletrodo auxiliar empregado nas medidas voltamétricas foi uma placa de platina de 1,0 cm de largura e 1,0 cm de comprimento fixada em um tubo de vidro contendo um fio de cobre. Nas medidas amperométricas foi utilizado um tubo de aço inox acoplado na saída da célula eletroquímica com configuração mista (*wall-jet/camada delgada*).

Os eletrodos de trabalho utilizados para os estudos eletroanalíticos foram de BDD (FIGURA 3.1) com áreas de 0,56 cm<sup>2</sup>, nas determinações voltamétricas e 0,33 cm<sup>2</sup>, nas medidas amperométricas (MPA) realizadas com sistema FIA. Os eletrodos de BDD foram fabricados pelo Adamant Technologies na Suíça, com um teor de boro de 8000 ppm.

O eletrodo de BDD utilizado nas medidas amperométricas era inserido em um adaptador especial (tarugo) de tal forma que estivesse firmemente preso por meio de um anel (*o-ring*) de borracha, resultando em uma área geométrica de 0,33 cm<sup>2</sup>, similar a área exposta na célula eletroquímica com configuração mista. O contato elétrico foi estabelecido por uma placa de cobre pelo lado do substrato recoberto por uma fina camada de ouro. Na FIGURA 3.1 são mostradas as fotografias do eletrodo de BDD utilizado nas medidas voltamétricas e o adaptador para o eletrodo de BDD utilizado nas medidas amperométricas. Essa configuração especial foi necessária porque o eletrodo de BDD precisava ser removido e posteriormente inserido na célula eletroquímica mista para as determinações amperométricas em fluxo.

---

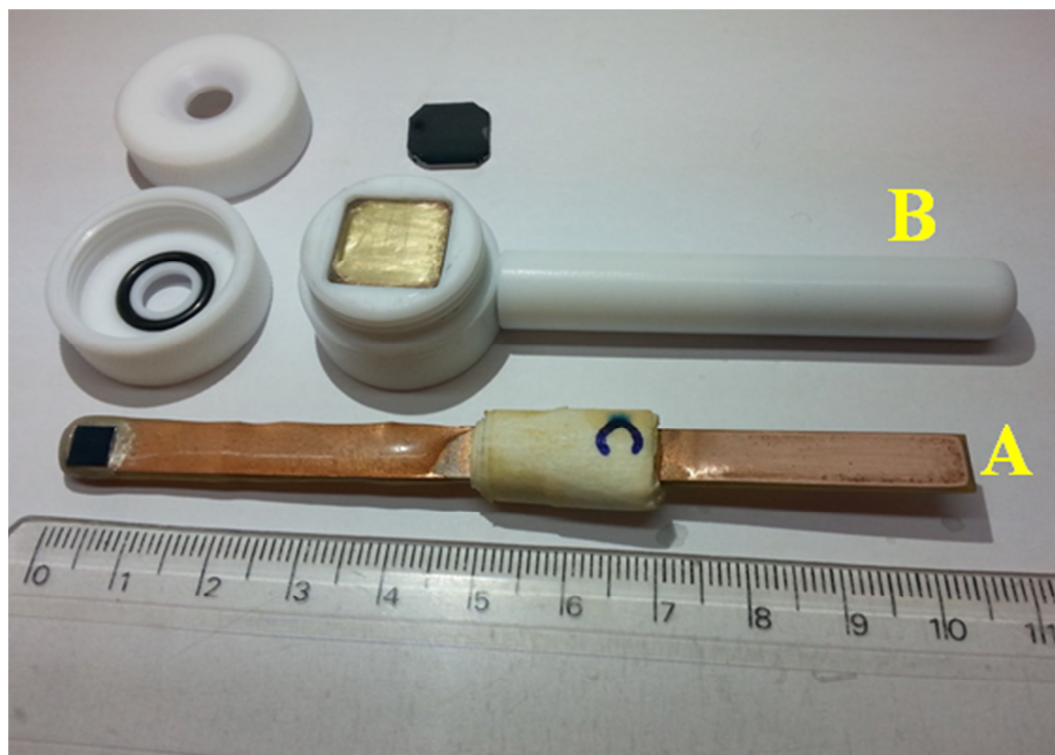


FIGURA 3.1 – (A) Fotografia do eletrodo de BDD com área de  $0,56 \text{ cm}^2$ , utilizado nas medidas voltamétricas. (B) Adaptador para o eletrodo de BDD com área geométrica de  $0,33 \text{ cm}^2$  utilizado nas medidas amperométricas.

### 3.1.2 – Células eletroquímicas

Os experimentos voltamétricos foram realizados em uma célula de compartimento único de 15 mL, confeccionada em vidro Pyrex<sup>®</sup> e equipada com uma tampa de Teflon<sup>®</sup>, contendo orifícios para o posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. Uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte foi sempre adicionada para a realização das medidas voltamétricas.

Outra célula eletroquímica com volume de 50 mL foi utilizada apenas para a realização dos pré-tratamentos anódicos e catódicos no eletrodo de BDD (com a utilização do adaptador mostrado na FIGURA 3.1) que era inserido na célula eletroquímica com configuração mista para as medidas amperométricas em fluxo.

### 3.1.2.1 – Células eletroquímicas para medidas amperométricas

Para a realização das medidas amperométricas acoplada a um sistema FIA foi construída uma célula com configuração mista entre a configuração *wall-jet* e a configuração camada delgada. Este modelo de célula *wall-jet/camada delgada*, foi uma adaptação feita pelo Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade (UFG), baseando-se em um modelo proposto pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Lúcio Angnes (USP-SP)<sup>120</sup>. Na FIGURA 3.2 são apresentadas as fotografias das partes necessárias para a confecção do detector eletroquímico e na FIGURA 3.3 apresenta-se o detector eletroquímico montado.

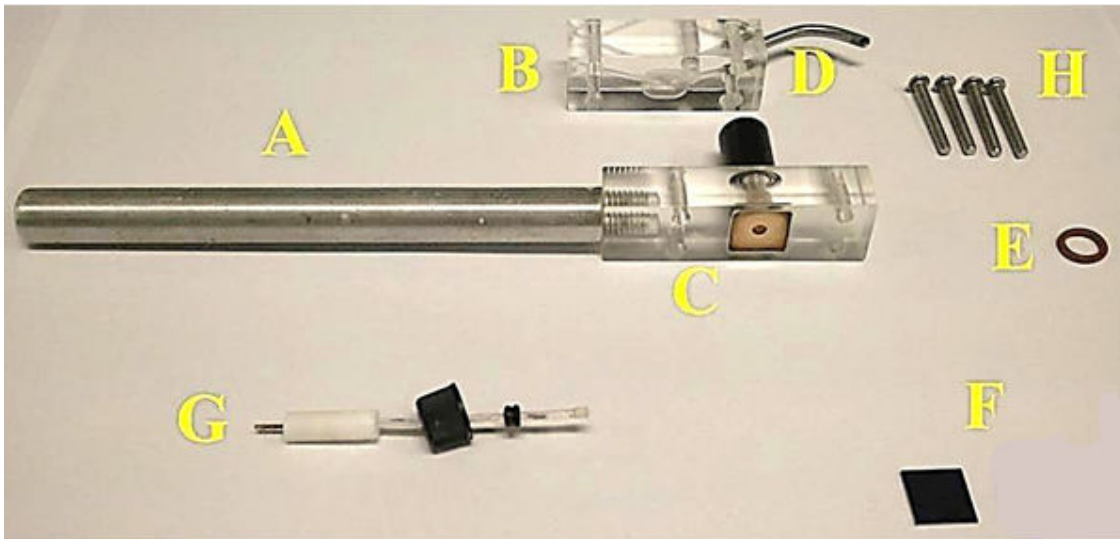


FIGURA 3.2 – Fotografia das partes necessárias para a confecção e montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo: (A) Haste em Al; (B) e (C) suportes em acrílico para acomodação de: (D) tubo em aço inoxidável (contra eletrodo), (E) *o-ring*, (F) eletrodo de BDD, (G) eletrodo de referência de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) miniaturizado e (H) parafusos para acoplamento das partes B e C da célula.

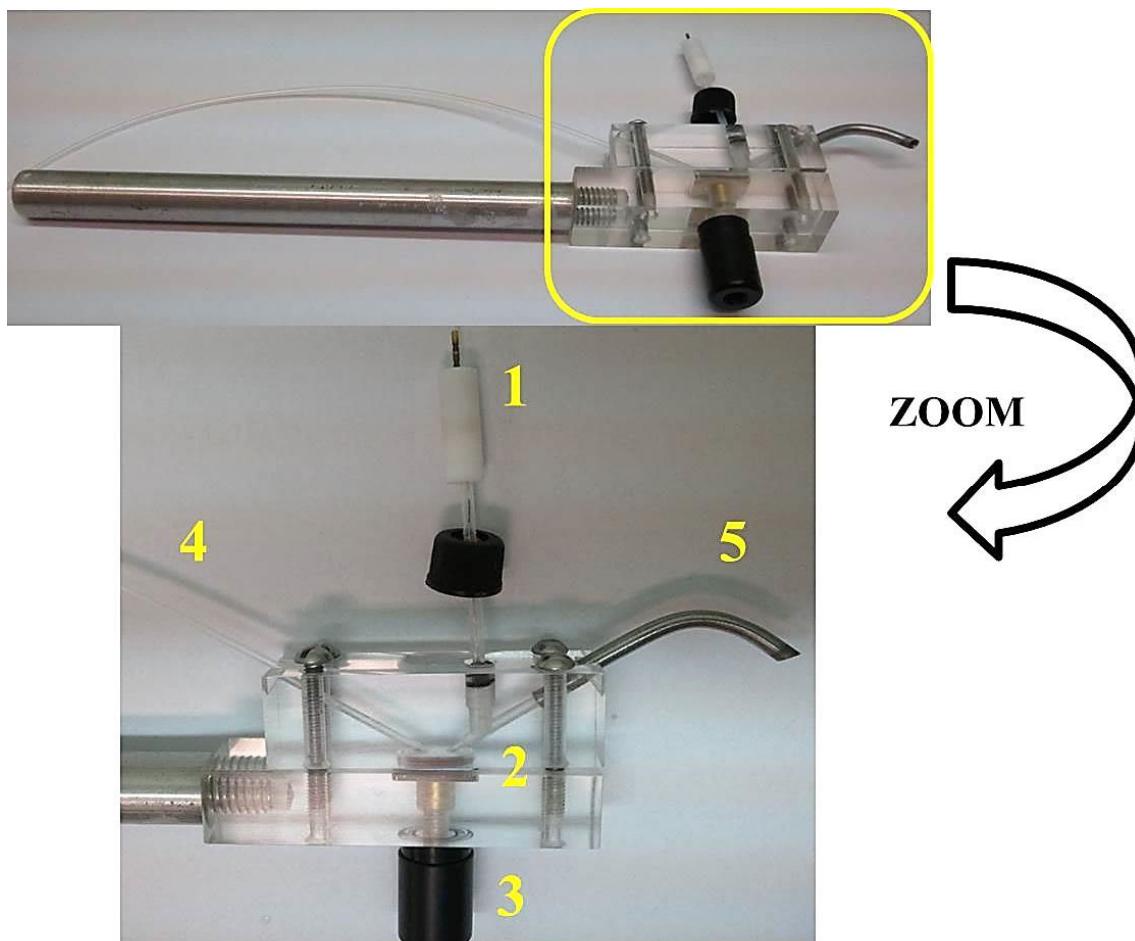


FIGURA 3.3 – Fotografias da célula eletroquímica para análises em fluxo montada: zoom: (1) eletrodo de referência de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) miniaturizado, (2) suporte em acrílico com o eletrodo de trabalho (BDD) acomodado, (3) contato elétrico rosqueado pela parte inferior do detector, (4) entrada da solução carregadora/amostra e (5) saída da solução carregadora/amostra e contra eletrodo.

### 3.1.3 – Sistema FIA

O sistema FIA foi constituído de uma linha única e composto por um sistema propulsor, um injetor, um detector eletroquímico e tubos de polietileno 0,8 mm de diâmetro interno.

O sistema propulsor foi uma bomba peristáltica Ismatec, IPC-8 (com 8 canais). As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema em fluxo utilizando um injetor proporcional de geometria circular, construído em três peças de acrílico e desenvolvido por pesquisadores do CENA/USP<sup>121</sup>. Foram utilizados tubos e conexões de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm, para confecção das bobinas reacionais, alças de amostragem e linhas de condução das soluções. Os tubos de propulsão foram de Tygon<sup>®</sup>. O detector eletroquímico foi a célula eletroquímica com configuração *wall-jet/camada delgada* (FIGURA 3.3) e o eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho. Na FIGURA 3.4 é apresentada uma representação esquemática do sistema FIA utilizado.

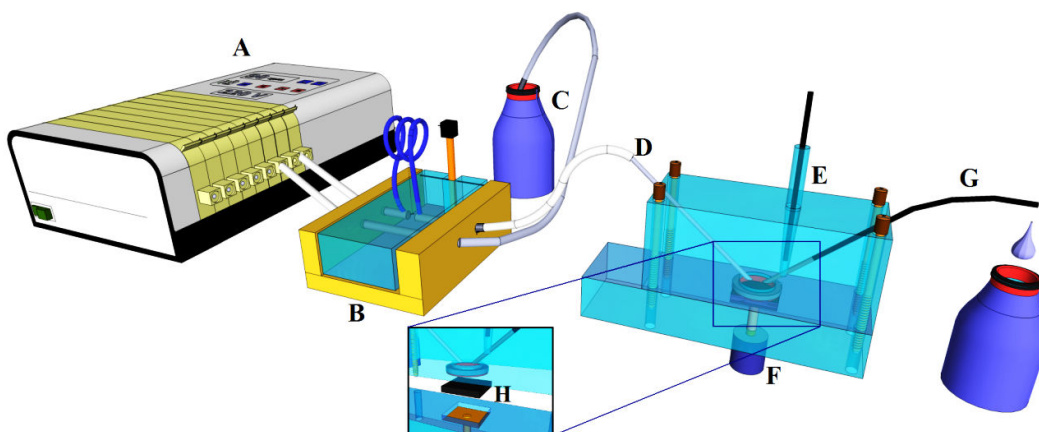


FIGURA 3.4 – Representação esquemática do sistema FIA, acoplado a célula eletroquímica, utilizado para as medidas amperométricas em fluxo. (A) bomba peristáltica; (B) injetor; (C) soluções analisadas; (D) entrada de solução; (E) eletrodo de referência; (F) contato elétrico para o eletrodo de BDD; (G) eletrodo auxiliar (tubo de aço inox) / saída de solução; zoom: (H) eletrodo de BDD.

### 3.2 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (P.A.) e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (Milipore®) com resistividade maior ou igual a 18 MΩ cm.

As soluções de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sigma-Aldrich) utilizadas para o tratamento do eletrodo para os medidas eletroquímicas, foram preparadas pela diluição do ácido concentrado em água, obtendo-se uma concentração final de 0,50 mol L<sup>-1</sup>, sendo as demais soluções de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizadas para as medidas eletroquímicas, obtidas a partir da diluição desta solução estoque.

As soluções estoque dos padrões dos anti-helmínticos ABZ, ABZ-SO, IVM e LVM, adquiridos da Sigma-Aldrich, foram preparadas na concentração de 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, por dissolução das devidas massas em ácido clorídrico (HCl) 0,10 mol L<sup>-1</sup> (ABZ e ABZ-SO), etanol (IVM) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 mol L<sup>-1</sup> (LVM). As soluções estoque dos padrões dos anti-hipertensivos HTZ e ENP, também adquiridos da Sigma-Aldrich, foram preparadas na concentração de 10,0 mmol L<sup>-1</sup> por dissolução das devidas massas em acetona e metanol, respectivamente.

Todas as soluções estoques foram estocadas em geladeira a aproximadamente 4 °C e protegidas da luz. As soluções mais diluídas dos padrões foram preparadas a partir da diluição da solução estoque e diluídas nos eletrólitos suporte selecionados para cada analito.

A solução de KNO<sub>3</sub> 0,10 mol L<sup>-1</sup> foi preparada por dissolução de adequada massa em água e o pH da solução ajustado conforme o interesse, com ácido nítrico 10 % v/v.

As soluções de ácido acético e HCl foram preparadas pela diluição do ácido concentrado em água, obtendo-se uma concentração final de 0,50 mol L<sup>-1</sup> e 0,10 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A solução de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada utilizando-se soluções de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  e o pH final da solução foi ajustado com hidróxido de sódio, de acordo com o pH desejado.

A solução de NaOH, utilizada na titulação potenciométrica foi preparada pela dissolução da massa de interesse do NaOH em água e esta solução foi, posteriormente, padronizada com hidrogenoftalato de potássio empregando-se como indicador a fenolftaleína.

### **3.2.1 – Preparo das amostras**

Todas as formulações farmacêuticas utilizadas neste trabalho foram adquiridas no comércio local de São Carlos - SP.

#### **3.2.1.1 – Amostras comerciais de ABZ**

Para as medidas voltamétricas prepararam-se as soluções das amostras de ABZ macerando-se 10 comprimidos das amostras até a obtenção de um pó fino, e as massas de interesse pesadas em balança analítica. As soluções foram preparadas em HCl e balão volumétrico de 5 mL, alíquotas de interesse destas soluções foram então adicionadas na célula eletroquímica.

#### **3.2.1.2 – Amostras comerciais de IVM**

Para o preparo das amostras sólidas de IVM, foram macerados 10 comprimidos, até a obtenção de um pó fino, e as massas de interesse pesadas em balança analítica e transferidas para um balão volumétrico de 25 mL cujo volume foi completado com etanol. Alíquotas de interesse destas soluções foram

---



então diluídas em um balão volumétrico de 10 mL e então injetadas no sistema em fluxo.

Para as amostras líquidas, os volumes de interesse foram medidos com o auxílio de micropipetas mecânicas monocanal de volume fixo e diluídos em balão volumétrico de 25 mL com etanol. Diluições apropriadas foram feitas em soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  (30% etanol v/v) utilizando balões de 10 mL.

### **3.2.1.3 – Amostra comercial de LVM**

A amostra contendo LVM, na forma de comprimido, foi preparada da mesma forma que as amostras de IVM, macerando-se os comprimidos e pesando-se uma massa adequada. A solução inicial foi preparada em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e balão volumétrico de 10 mL e outras duas subseqüentes diluições foram feitas em balões de 25 e 10 mL com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ .

### **3.2.1.4 – Amostras comerciais de ENP e HTZ**

Para as amostras comerciais contendo HTZ e ENP, o procedimento foi o mesmo que os anteriores, ou seja, maceração dos comprimidos e pesagem das massas de interesse, as soluções foram preparadas em metanol e balão volumétrico de 10 mL; alíquotas de interesse destas soluções foram então diluídas em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em balões volumétricos de 10 e 25 mL, sucessivamente.

### **3.2.1.5 – Urina sintética**

As amostras de urina sintética foram preparadas contendo a maioria dos interferentes presentes em uma amostra real. De acordo com o proposto por

---

LAUBE et al.<sup>122</sup> a urina foi preparada adicionando 2,92 g NaCl, 1,60 g KCl, 1,10 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2,25 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,40 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,00 g de NH<sub>4</sub>Cl e 25,00 g uréia em balão volumétrico de 1,0 L completados com água. A solução foi usada imediatamente após a preparação.

Essas amostras foram dopadas com duas concentrações diferentes dos analitos de interesse e alíquotas de 200 ou 150 µL foram diluídas nos respectivos eletrólitos suporte e, as soluções finais foram injetadas no sistema em fluxo para a quantificação.

### **3.3 – Procedimento experimental**

#### **3.3.1 – Pré-tratamentos aplicados ao eletrodo de BDD**

A fim de observar os diferentes comportamentos eletroquímicos do eletrodo de BDD frente aos analitos, foram feitos dois tipos diferentes de pré-tratamentos eletroquímicos. No estudo do pré-tratamento anódico foi aplicada ao eletrodo uma corrente de 500 mA cm<sup>-2</sup> por 60 s em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 mol L<sup>-1</sup> e no estudo do pré-tratamento catódico -500 mA cm<sup>-2</sup> por 360 s.

Quando selecionado o tratamento catódico para o desenvolvimento do método eletroanalítico, primeiramente, realizou-se o pré-tratamento anódico (500 mA cm<sup>-2</sup> por 30 s), a fim de limpar a superfície do BDD e, em seguida, foi realizado o tratamento catódico (-500 mA cm<sup>-2</sup> por 180 s) para condicionar a superfície do eletrodo em terminação preferencialmente de hidrogênio. Este procedimento foi realizado no início de cada dia de trabalho.

Quando o tratamento anódico foi selecionado para o desenvolvimento do método eletroanalítico, inicialmente fez-se um pré-tratamento catódico (-500 mA cm<sup>-2</sup> por 120 s), a fim de garantir que a superfície do eletrodo estivesse sempre nas mesmas condições, e em seguida, realizou-se o pré-tratamento anódico, utilizando-se uma corrente de 500 mA

cm<sup>-2</sup> por 60 s, para condicionar a superfície do eletrodo em terminação preferencialmente com grupos contendo oxigênio. Este procedimento foi realizado no início de cada dia de trabalho.

Para o pré-tratamento realizado diariamente, o tempo de aplicação de corrente foi diminuído visando um menor desgaste do eletrodo.

### 3.3.2 – Determinação do limite de detecção

Para o método voltamétrico descrito neste trabalho, calculou-se o LD conforme a IUPAC (do inglês - *International Union of Pure and Applied Chemistry*), onde o LD é igual a três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

No caso dos métodos amperométricos descritos, calculou-se o LD utilizando-se o método da relação sinal-ruído.

Para a determinação desta relação sinal-ruído, uma comparação entre a medição dos sinais de uma solução de referência em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco (eletrólito suporte) é realizada. Desta maneira, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. De acordo com a referência utilizada<sup>123</sup>, a relação sinal ruído utilizada pode ser de 3:1 ou 2:1.

### 3.3.3 – Eletrólise em potencial controlado

Para o experimento de eletrólise em potencial controlado, utilizou-se a técnica de cronoamperometria. Assim, alíquotas de soluções padrões dos analitos (LVM ou HTZ) foram adicionadas nos respectivos eletrólitos suporte e então submetidas à eletrólise por 2400 s. Houve agitação da solução durante todo o tempo da eletrólise e o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho foi superior ao potencial de oxidação de cada analito. Os voltamogramas de onda

---

quadrada foram registrados para cada analito, antes e após a eletrólise, assim como a carga obtida durante cada eletrólise.

### **3.3.4 – Tratamento dos dados**

Utilizando-se as ferramentas do software GPES 4.9, os voltamogramas e amperogramas obtidos, tiveram as linhas base corrigidas pelo método da média móvel e os ruídos foram suavizados (smooth) utilizando-se o algoritmo de Savitzky-Golay<sup>124</sup>.

### **3.3.5 – Métodos comparativos**

#### **3.3.5.1 – Métodos cromatográficos**

A cromatografia líquida de alta eficiência foi a técnica selecionada como técnica comparativa para a determinação voltamétrica do ABZ em todas as amostras comerciais e também para a determinação simultânea de ENP e HTZ utilizando um sistema FIA-MPA.

Para a determinação do ABZ, o método comparativo utilizado foi uma adaptação do método descrito por WALDIA et al.<sup>56</sup>. Neste procedimento utilizou-se uma coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack CLC-ODS (4,6 × 150 mm, 5 µm), a fase móvel utilizada foi, acetonitrila/metanol/água (45:35:20 v/v), com eluição isocrática, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 50 µL. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) selecionado no detector UV-Vis foi de 315 nm.

Utilizou-se, como método comparativo para a determinação simultânea de ENP e HTZ, uma adaptação do método descrito por PAWAR et al.<sup>125</sup>. A coluna cromatográfica utilizada foi a C<sub>18</sub> Shim-Pack CLC-ODS (4,6 × 150 mm, 5 µm). A fase móvel foi acetonitrila/metanol/tampão trietilamônio fosfato (50:25:25 v/v - eluição isocrática), na qual o tampão empregado foi

---

preparado com ácido ortofosfórico 0,1 % v/v e teve seu pH ajustado com solução de trietilamina para pH final de 2,5. A vazão do sistema foi de 0,30 mL min<sup>-1</sup>, o volume de injeção de 20 µL e o λ selecionado foi de 210 nm para ambos os compostos.

### **3.3.5.2 – Método espectrofotométrico com absorção no ultravioleta**

O método comparativo, utilizado para comparação dos resultados obtidos na análise das amostras comerciais de IVM, foi um método espectrofotométrico proposto por COSTA et al.<sup>126</sup>

Soluções padrões, em diferentes concentrações de IVM, foram preparadas em metanol para a construção de uma curva analítica e o λ utilizado foi de 245 nm.

As amostras comerciais foram também preparadas em metanol e os valores de absorção obtidos para cada amostra foram, então, substituídos na curva analítica, encontrando-se através de cálculos matemáticos a quantidade de IVM em cada amostra comercial.

### **3.3.5.3 – Titulação potenciométrica**

O método utilizado para a comparação dos resultados obtidos para o LVM com o método proposto foi a titulação potenciométrica, método estabelecido pela Farmacopéia Britânica<sup>127</sup>.

Inicialmente, padronizou-se uma solução de NaOH, com concentração teórica de 0,10 mol L<sup>-1</sup>, e esta solução, foi então utilizada como titulante.

No frasco a ser utilizado na titulação, colocou-se uma massa conhecida da amostra a ser analisada, 30,0 mL de etanol e 5,0 mL de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

---

A partir da relação (fornecida pela Farmacopéia) de que cada 1,0 mL de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (concentração padronizada  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ) gasto na titulação, equivale a 24,08 mg de cloridrato de LVM, os cálculos foram feitos e encontrada a concentração de LVM em cada comprimido da amostra analisada.

---

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 – Determinação dos anti-helmínticos**

Neste trabalho de doutorado, desenvolveram-se diferentes métodos para a determinação individual ou simultânea de diversos anti-helmínticos, utilizando-se as técnicas voltamétrica ou amperométrica acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo. Os resultados obtidos e as discussões relevantes para cada método proposto serão apresentados neste capítulo.

#### **4.1.1 – Determinação voltamétrica de ABZ**

O primeiro método proposto foi a determinação do anti-helmíntico ABZ em formulações farmacêuticas empregando-se a técnica de DPV e um eletrodo de BDD-CPT.

##### **4.1.1.1 – Investigação da resposta eletroquímica do ABZ e diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD**

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando a CV a fim de avaliar o comportamento eletroquímico do ABZ sobre eletrodo de BDD.

Na FIGURA 4.1 são apresentados os voltamogramas cíclicos para a solução do branco ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e para a solução de ABZ ( $99,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Nestas condições, o ABZ apresentou dois picos de oxidação com potenciais em torno de 0,95 e 1,30 V. Desta maneira, selecionou-se o potencial do primeiro pico de oxidação para o desenvolvimento do trabalho, diminuindo-se assim a

---

possibilidade de interferências nas medidas eletroquímicas, considerando que, em potenciais maiores, a possibilidade de haver outras espécies na matriz das amostras que se oxidem é ainda maior.

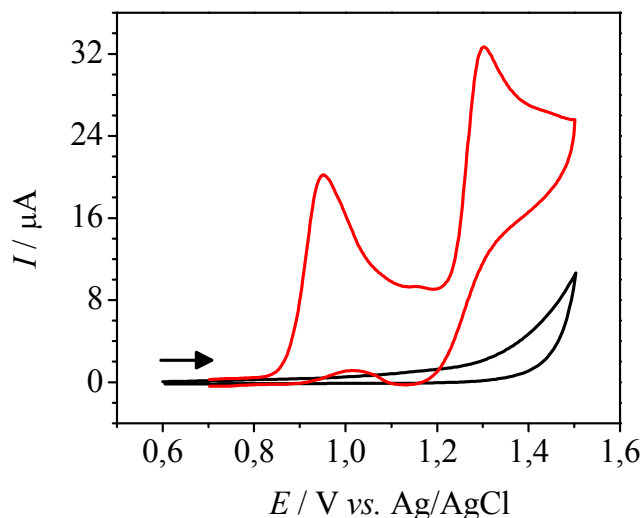


FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de ABZ  $99,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e na ausência de ABZ (branco(—)),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.1.1.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico

Diferentes pré-tratamentos eletroquímicos foram realizados no eletrodo de BDD, aplicando-se uma determinada densidade de corrente (positiva ou negativa) em função de um tempo pré-estabelecido, conforme descrito na seção 3.3.1. A resposta eletroquímica (intensidade do sinal analítico, definição de pico de oxidação e deslocamento do potencial de oxidação) obtida para o ABZ frente ao eletrodo de BDD após os diferentes pré-tratamentos foi então avaliada.

Como pode ser observado na FIGURA 4.2, o tratamento catódico (terminação superficiais predominantemente em hidrogênio) proporcionou um



aumento da magnitude de corrente de pico de aproximadamente três vezes e a diminuição do potencial de pico de oxidação em 100 mV, além de uma melhora na definição do pico de oxidação. Sendo assim, nos estudos posteriores, utilizou-se o eletrodo de BDD-CPT para a determinação do ABZ. Esses resultados são concordantes com os resultados de outros trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa nos quais um eletrodo de BDD-CPT foi utilizado na determinação de diferentes analitos<sup>115,118,128,129</sup>.

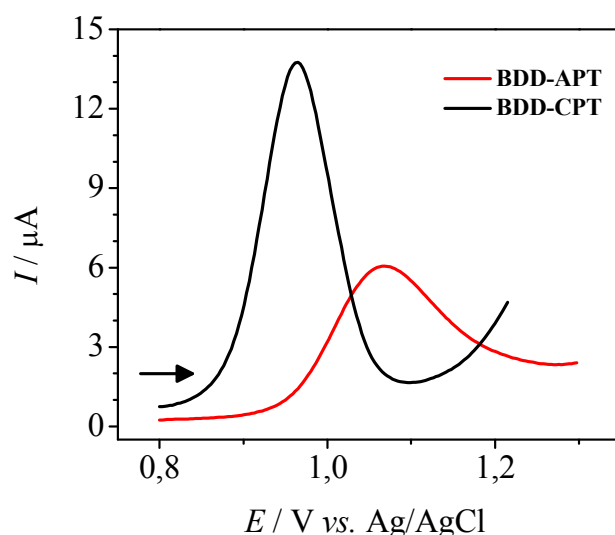


FIGURA 4.2 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ABZ 99,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sobre um eletrodo de BDD-CPT (—) e BDD-APT (—), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

#### 4.1.1.1.2 – Efeito do eletrólito suporte

Estudou-se o comportamento do ABZ em diferentes eletrólitos suporte como  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,10  $\text{mol L}^{-1}$  e 0,50  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{HCl}$  0,10  $\text{mol L}^{-1}$  e tampão BR 0,04  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 2,1) sobre o eletrodo de BDD-CPT utilizando-se para este estudo a CV. Em soluções com pH acima de 4,0 houve a precipitação do ABZ, não sendo possível a sua determinação em valores superiores de pH.

Avaliando-se os resultados obtidos, observou-se que não houve uma diferença significativa quanto à definição e potencial de pico com a utilização dos diferentes eletrólitos (dados não apresentados). Assim, optou-se por trabalhar com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pois este apresentou pequena melhora na intensidade de pico e boa repetibilidade quando comparado com resultados obtidos com os outros eletrólitos.

Após selecionar o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como eletrólito suporte, estudou-se a influência da concentração deste ácido nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,10 e 0,30 mol  $\text{L}^{-1}$  (diferentes  $\text{pH}_{\text{condicional}}$  ( $\text{pH}_{\text{cond}}$ )) sobre o sinal analítico, empregando-se a técnica de CV.

Os resultados obtidos neste estudo (FIGURA 4.3) mostraram que o potencial de pico de oxidação do ABZ é dependente do  $\text{pH}_{\text{cond}}$ , o que está de acordo com a literatura<sup>130</sup>, sendo que quanto maior o valor do  $\text{pH}_{\text{cond}}$ , menor é o potencial de oxidação. De acordo com os resultados obtidos, para os estudos posteriores, escolheu-se como eletrólito suporte o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na concentração 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  ( $\text{pH}_{\text{cond}}$  1,30) por apresentar um potencial de pico de oxidação menor do que aqueles obtidos em outras concentrações e uma boa intensidade de corrente.

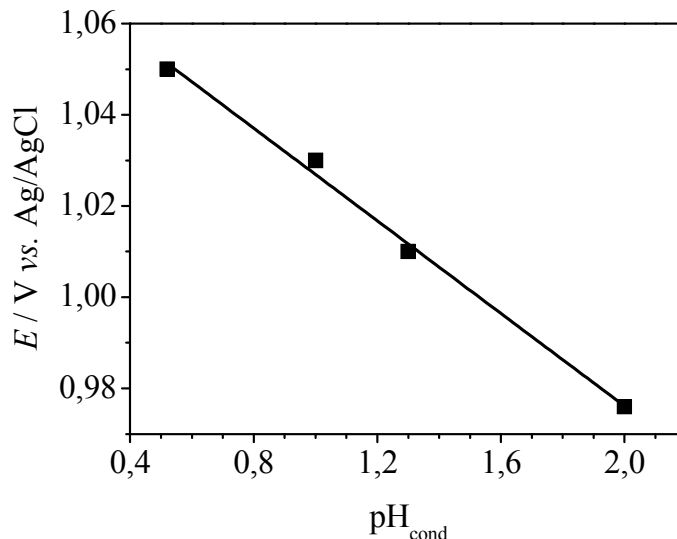


FIGURA 4.3 – Dependência do potencial de pico de oxidação do ABZ (99,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com o  $\text{pH}_{\text{cond}}$  (diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01; 0,05; 0,10 e 0,30  $\text{mol L}^{-1}$ ) do eletrólito suporte utilizando um eletrodo de BDD-CPT. Equação da reta :  $E \text{ (V)} = 1,1 - 0,051 \text{ pH}_{\text{cond}}$

#### 4.1.1.2 – Mecanismo de oxidação do ABZ sobre o eletrodo de BDD-CPT

Em seguida, são apresentados os resultados obtidos na determinação do número de elétrons envolvidos na reação de eletrooxidação do ABZ e o efeito da velocidade de varredura de potencial na voltametria cíclica, empregando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , como eletrólito suporte. A partir dos resultados obtidos nestes estudos, propôs-se um mecanismo de oxidação para a molécula de ABZ sobre o eletrodo de BDD-CPT.

##### 4.1.1.2.1 – Voltametria cíclica

Investigou-se inicialmente, utilizando-se a CV, o efeito de diferentes velocidades de varredura de potencial (10 a 400  $\text{mV s}^{-1}$ ) para ambos

os picos de oxidação do ABZ no eletrodo de BDD-CPT em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (FIGURA 4.4 (A)).

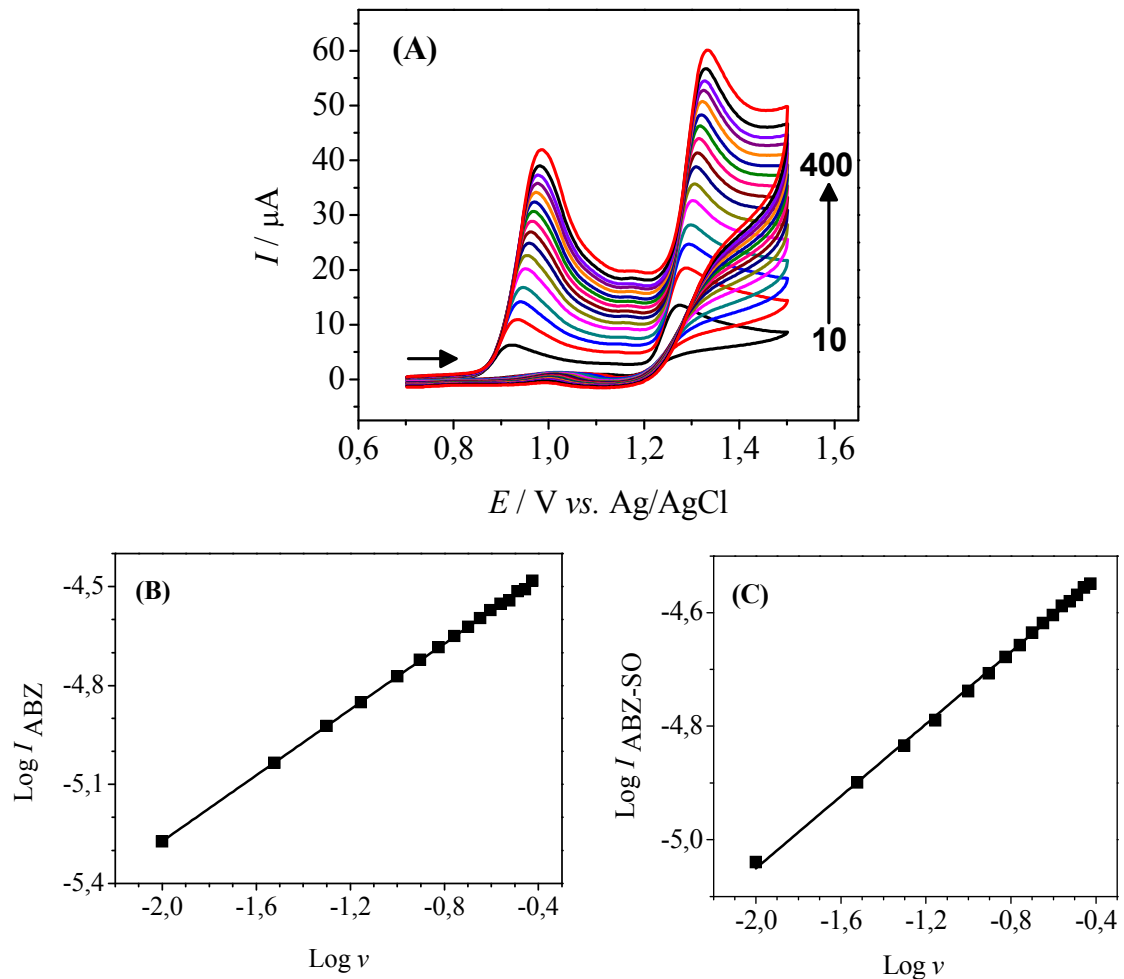


FIGURA 4.4 – Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  contendo ABZ e ABZ-SO. Velocidades de varredura: 10, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400  $\text{mV s}^{-1}$ . (B) e (C) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o ABZ e ABZ-SO, respectivamente. Equações das retas:  $\log I = -4,3 + 0,50 \log \nu$  (ABZ) e  $\log I = -4,4 + 0,32 \log \nu$  (ABZ-SO)

Observou-se neste estudo uma relação linear entre o logaritmo da corrente de pico ( $\log I$ ) e o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log \nu$ ) (gráfico não apresentado), obtendo-se coeficientes angulares de 0,50 e 0,32, para os

respectivos picos de oxidação. Estes valores obtidos, estão próximos ao valor teórico (0,5), indicando que a oxidação do ABZ é um processo controlado por difusão<sup>131</sup>. Este controle difusional também pôde ser confirmado pela relação linear ( $r \geq 0,995$ ) obtida entre a corrente de pico de oxidação (de ambos os picos) e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

De acordo com a teoria de CV, para sistemas irreversíveis<sup>132</sup>, o número de elétrons na oxidação do ABZ pode ser determinado utilizando-se a seguinte equação (Equação 4.1):

$$E_p / \log v = -30 \text{ mV} / \alpha n \quad \text{Eq. 4.1}$$

sendo  $E_p$  o valor do potencial de pico,  $\alpha$  o coeficiente de transferência de carga,  $n$  o número de elétrons transferidos na reação e  $v$  a velocidade de varredura.

Observou-se uma relação linear para  $E$  vs.  $\log v$  para as velocidades de varredura de potencial entre 10 e 150  $\text{mV s}^{-1}$  para ambos os picos (0,95 V e 1,30 V) com coeficientes angulares iguais a 30,7 e 28,0, respectivamente.

Assim, a partir dos coeficientes obtidos no gráfico de  $E$  vs.  $\log v$ , o valor de  $\alpha n$  foi calculado obtendo-se valores de 0,98 e 1,07, para os respectivos picos.

Usando estas informações e assumindo que  $\alpha$  é igual a 0,50 (valor médio normalmente utilizado quando não se tem o valor calculado experimentalmente<sup>133</sup>) e utilizando-se a Equação 4.1, o número de elétrons envolvidos na oxidação do ABZ pode ser calculado.

Desta maneira, os resultados obtidos sugerem que a reação de oxidação do ABZ sobre o BDD-CPT envolvem dois elétrons para o primeiro pico de oxidação e mais dois elétrons para o segundo pico de oxidação, com um total de quatro elétrons envolvidos na reação global.

De acordo com alguns estudos sobre o ABZ e seus metabólitos<sup>130,134</sup> e os resultados aqui obtidos, sugere-se que a eletrooxidação do ABZ sobre o

BDD-CPT em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ocorre pelo mecanismo apresentado na FIGURA 4.5, com a primeira etapa (química) ocorrendo uma protonação, a segunda etapa (eletroquímica) gerando o ABZ-SO e a terceira etapa (eletroquímica) o ABZSO<sub>2</sub>.

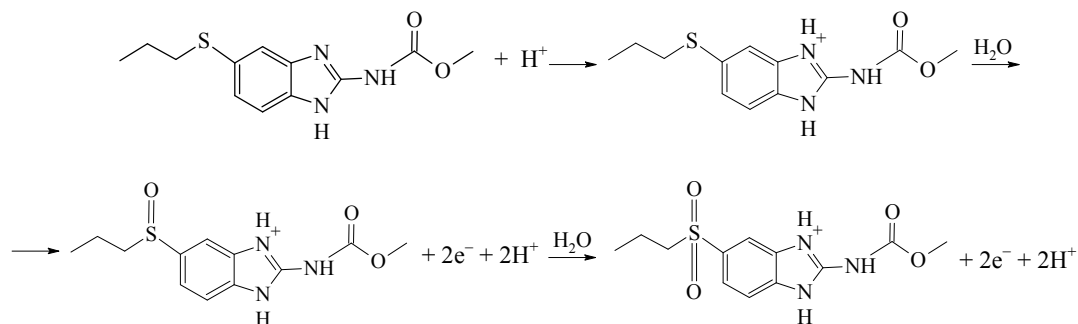


FIGURA 4.5 – Mecanismo de oxidação proposto para ABZ sobre o eletrodo de BDD-CPT em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.1.1.3 – Determinação voltamétrica de ABZ e aplicação do método proposto na determinação de produtos farmacêuticos

Para o desenvolvimento do método proposto, comparou-se inicialmente os resultados obtidos na determinação de ABZ utilizando-se as técnicas de SWV e DPV e selecionou-se então a técnica com os melhores resultados para o desenvolvimento do trabalho. Para ambos os casos, avaliou-se o efeito dos respectivos parâmetros experimentais sobre o potencial de oxidação e a intensidade da corrente de pico na determinação do ABZ.

As TABELA 4.1 e TABELA 4.2 apresentam os parâmetros e intervalo de valores investigados em cada técnica e os valores selecionados.

TABELA 4.1 – Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de ABZ

| <b>Parâmetros</b>                         | <b>Faixa estudada</b> | <b>Valor selecionado</b> |
|---|-----------------------|--------------------------|
| Frequência $f$ ( $s^{-1}$ )               | 10 – 170              | 130                      |
| Amplitude $a$ (mV)                        | 10 – 100              | 50                       |
| Incremento de varredura $\Delta E_s$ (mV) | 1,0 – 6,0             | 4,0                      |

TABELA 4.2 – Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de ABZ

| <b>Parâmetros</b>              | <b>Faixa estudada</b> | <b>Valor selecionado</b> |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Tempo de modulação $t$ (ms)    | 3,0 – 20              | 7,0                      |
| Amplitude $a$ (mV)             | 25 – 125              | 75                       |
| Velocidade $v$ ( $mV s^{-1}$ ) | 1,5 – 30              | 20                       |

Após a otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas de SWV e DPV, compararam-se então os resultados obtidos para a determinação de ABZ (TABELA 4.3). Com os resultados obtidos concluiu-se que é possível a utilização das duas técnicas para a determinação do ABZ, porém, utilizando-se a DPV o pico de oxidação do ABZ apresentou-se um pouco menos alargado (melhor definido), o valor do LD foi menor e a sensibilidade foi um pouco maior. Sendo assim, selecionou-se a técnica DPV para o desenvolvimento do método eletroanalítico.

TABELA 4.3 – Parâmetros analíticos para a determinação de ABZ por DPV e SWV utilizando o eletrodo de BDD-CPT

| Parâmetros   | DPV   | SWV   |
|--|---|---|
| Equações analíticas /<br>( $I_{pa}/\mu\text{A}$ )  | $0,0943 + 0,960 [\text{ABZ}] /$<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | $0,197 + 0,813[\text{ABZ}] /$<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) |
| Limite de detecção /<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | 0,06  | 0,16  |
| Faixa linear /<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )       | 0,08 – 8,36   | 0,20 – 7,41   |
| Coefficiente de<br>correlação, $r$                 | 0,9993  | 0,9996  |

A FIGURA 4.6 (A) apresenta os voltamogramas de pulso diferencial para as diferentes concentrações de ABZ de 0,08 a 8,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a respectiva curva analítica. A equação da reta obtida foi: ( $I_{pa}/\mu\text{A}$ ) = 0,0943 + 0,960 [ABZ] / ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), com um coeficiente de correlação igual a 0,9996.



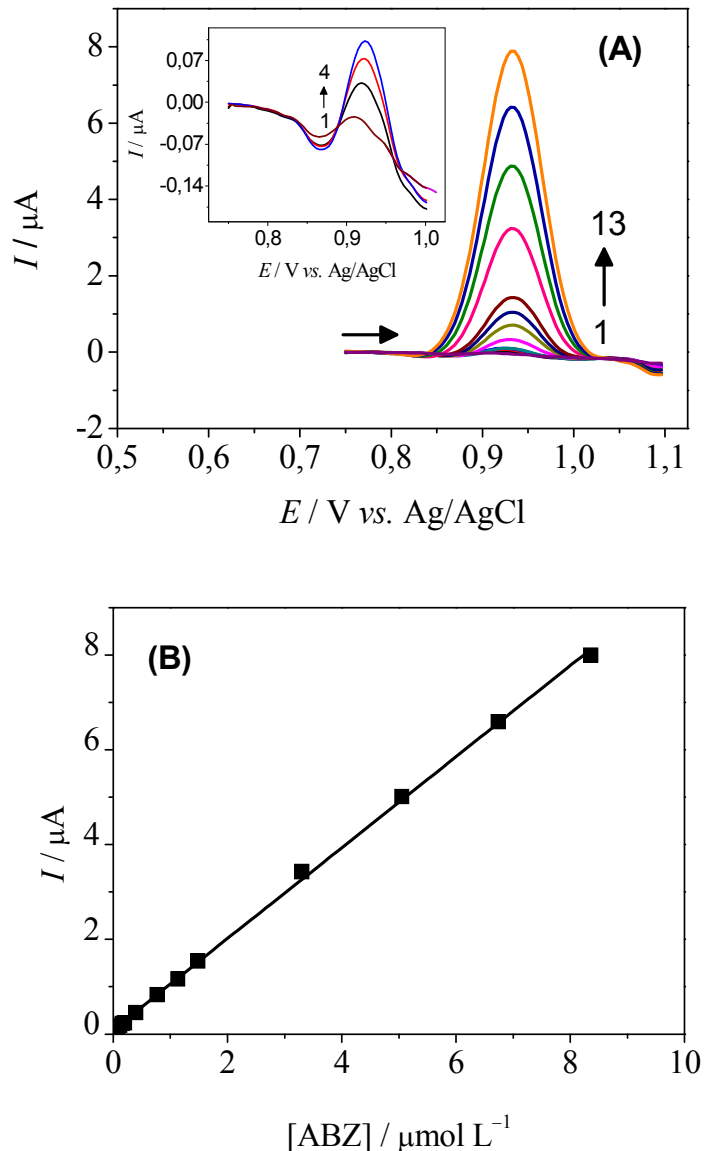


FIGURA 4.6 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de ABZ (1 a 13: (1) Branco, (2) 0,08 ; (3) 0,12; (4) 0,16; (5) 0,20; (6) 0,39; (7) 0,77; (8) 1,13; (9) 1,48; (10) 3,30; (11) 5,05; (12) 6,74; (13) 8,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) a curva analítica em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , ( $t = 4 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ).

O valor de LD calculado, considerando-se três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente linear da curva analítica, foi igual a  $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$  o qual é significativamente mais baixo do que o relatado

por de OLIVEIRA et al.<sup>40</sup> ( $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) utilizando um eletrodo de carbono vítreo e DPV e também menor que o relatado por MSAGATI e NGILA<sup>38</sup> ( $0,33 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (3-metiltiofeno) e SWV. ABU ZUHRI et al.<sup>41</sup> reportaram um LD menor ( $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), porém empregando um método indireto de determinação com um eletrodo de Hg e ainda a solução de ABZ teve que ser completamente desaerada antes das análises (aumentando o tempo de análise), etapa essa não é necessária quando se emprega o eletrodo de BDD por ser este eletrodo insensível ao oxigênio dissolvido na solução da amostra.

Medidas sucessivas utilizando DPV ( $n = 10$ ) em diferentes concentrações de ABZ nas mesmas condições da curva analítica foram realizadas para o estudo da repetibilidade intra-dia. Os desvios padrão relativos (RSDs) obtidos para as concentrações de  $0,29$  e  $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ABZ foram  $4,98 \%$  e  $2,49 \%$ , respectivamente. A repetibilidade inter-dias também foi determinada por medidas com DPV em solução de ABZ  $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$  (preparadas diariamente) por um período de 4 dias ( $n = 4$ ) obtendo-se um RSD de  $2,20 \%$ .

Finalmente, investigou-se o efeito de alguns possíveis interferentes, tais como: sacarina, ácido cítrico, lactose e amido. Para este estudo, adicionou-se os interferentes a uma solução de ABZ  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  (em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nas proporções de concentrações de  $1:1$  e  $1:10$  (solução padrão : interferente). Nenhuma mudança significativa ( $> 10\%$ ) na corrente de pico do ABZ foi observada com adição dos compostos citados anteriormente, demonstrando que os compostos normalmente encontrados nas amostras de formulações farmacêuticas não causam interferência significativa nas medidas voltamétricas.

#### 4.1.1.3.1 – Método comparativo – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O desempenho do procedimento eletroanalítico desenvolvido para a determinação de ABZ foi avaliado comparando-se os resultados obtidos no método eletroanalítico proposto com um método comparativo. Para esta avaliação, adotou-se como método comparativo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)<sup>56</sup>. As condições cromatográficas foram empregadas de acordo com o descrito na parte experimental. Nestas condições, a molécula de ABZ apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 3,0 minutos. Na FIGURA 4.7 é apresentado o cromatograma obtido para o ABZ em um  $\lambda$  315 nm. O gráfico inserido dentro desta figura, corresponde a curva analítica obtida, sendo esta linear no intervalo de concentração para o ABZ de 3,0 a 80,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

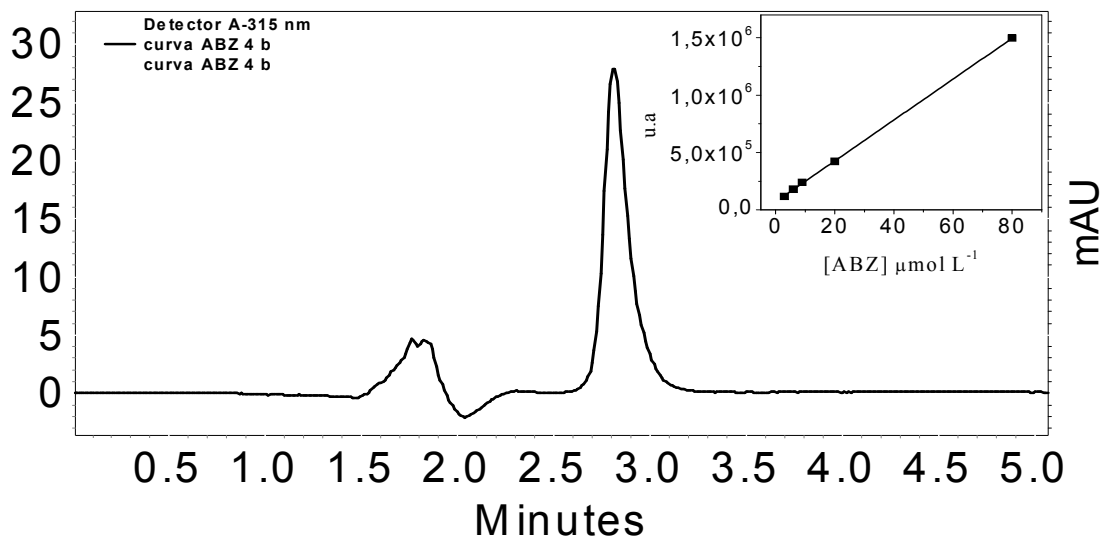


FIGURA 4.7 – Cromatograma obtido para o ABZ  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O gráfico inserido é a respectiva curva analítica obtida em unidades de área para ABZ. Concentrações da curva analítica: 3,0; 6,0; 9,0; 20,0; 80,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/metanol/água (45/35/20, v/v/v) (eluição isocrática), vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção:  $50 \mu\text{L}$  e o  $\lambda$  de 315 nm.

A equação da curva obtida para ABZ foi:

$$A(\text{u.a.}) = 7,03 \times 10^4 + 1,78 \times 10^{10} [\text{ABZ} / (\text{mol L}^{-1})]; (r = 0,9999)$$

Assim, todas as amostras analisadas empregando-se o procedimento voltamétrico proposto foram analisadas também, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de comparar os resultados obtidos e, assim, mostrar o bom desempenho do método eletroanalítico proposto.

O método DPV proposto utilizando um eletrodo BDD-CPT foi aplicado para a análise de três amostras farmacêuticas, e os dados obtidos foram tratados utilizando-se o método da interpolação nas respectivas curvas analíticas, obtidas. Na TABELA 4.4 são apresentados os resultados obtidos nessas análises utilizando-se o método proposto e o comparativo (HPLC).

TABELA 4.4 – Resultados obtidos na determinação de ABZ em amostras de formulações farmacêuticas usando o método de DPV proposto e o método de HPLC comparativo

| Amostras | ABZ / mg          |                  |                       |
|----------|-------------------|------------------|-----------------------|
|          | HPLC <sup>a</sup> | DPV <sup>a</sup> | Erro <sup>b</sup> (%) |
| A        | 545 ± 3           | 533 ± 9          | -2,2                  |
| B        | 537 ± 13          | 546 ± 16         | +1,7                  |
| C        | 541 ± 18          | 525 ± 12         | -3,0                  |

a) n = 3

b) Média do erro (%) =  $100 \times [(\text{valor voltamétrico} - \text{valor de referência}) / \text{valor de referência}]$

Os erros relativos apresentados na TABELA 4.4, indicam que não há diferenças significativas entre os valores obtidos empregando-se o método proposto e aqueles obtidos empregando-se o método de referência (HPLC).

Aplicando-se o teste  $t$ -pareado nos resultados obtidos pelos dois métodos, obteve-se um valor de  $t$  calculado (6,09) menor do que o valor de  $t$  crítico (6,96,  $\alpha = 0,02$ ), indicando que os resultados obtidos empregando-se os dois métodos para a determinação de ABZ nessas três amostras de formulações farmacêuticas são concordantes em um nível de confiança de 98 %.

#### **4.1.2 – Determinação individual de IVM e LVM empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica**

Nesta seção, serão descritos o desenvolvimento de dois procedimentos eletroanalíticos utilizando um sistema FIA com detecção amperométrica empregando-se o eletrodo de BDD para a determinação individual de dois anti-helmínicos, a IVM e o LVM.

Nestes estudos utilizou-se como técnicas de detecção a amperometria convencional acoplada a um sistema FIA.

Optou-se por trabalhar com essa técnica devido ao fato dos analitos a serem estudados apresentarem maior adsorção sobre a superfície do BDD ao se utilizar as técnicas voltamétricas em batelada, dificultando assim a análise, porém, esta adsorção não ocorreu quando o sistema em fluxo foi utilizado.

---

#### **4.1.2.1 – Investigação do comportamento eletroquímico de IVM e LVM e efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD**

Inicialmente realizou-se um estudo do perfil voltamétrico dos analitos IVM e LVM, considerando que, pouquíssimos ou nenhum dado sobre a eletroatividade destes analitos foram encontradas na literatura.

Os resultados experimentais obtidos, utilizando-se a CV, mostraram que ambos os compostos apresentam respostas eletroativas no sentido positivo da varredura de potencial (oxidação) sobre o eletrodo de BDD com a IVM em potencial próximo a 1,33 V (FIGURA 4.8 (A)) e o LVM próximo a 1,77 V (FIGURA 4.8 (B)).

No trabalho desenvolvido por HOLBROOK et al.<sup>71</sup> utilizando polarografia, o cloridrato de tetramisol (mistura racêmica) apresentou dois picos de redução em -1,50 e -1,65 V porém, estes picos de redução não foram observados empregando-se o eletrodo de BDD.

No caso da IVM nada foi encontrado na literatura sobre sua eletroatividade.

---

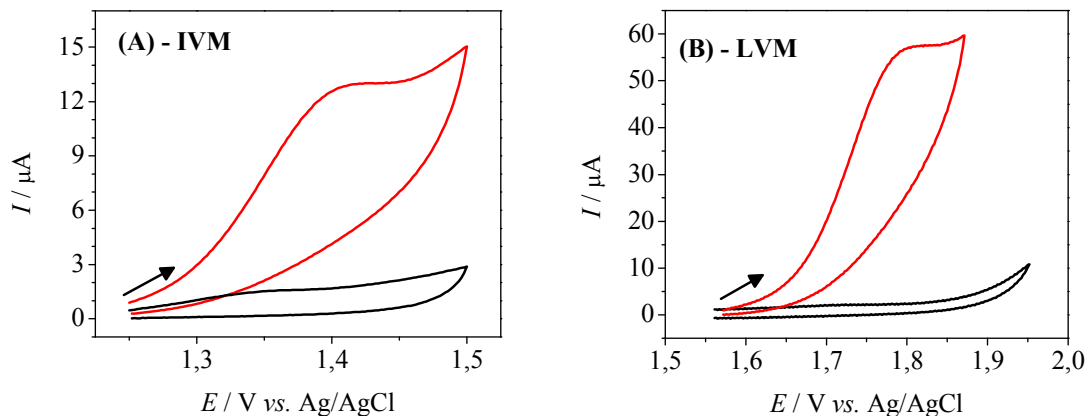


FIGURA 4.8 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (30% de etanol v/v) na presença de IVM  $177,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (–) e na ausência de IVM (branco (–))  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . (B) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando o eletrodo de BDD em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de LVM  $48,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (–) e na ausência de LVM (branco (–)),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.1.2.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico

Realizou-se o estudo do efeito dos dois diferentes pré-tratamentos eletroquímicos, anódico e catódico, com o objetivo de avaliar a diferença na resposta eletroquímica de ambos os analitos. Estes pré-tratamentos foram realizados em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  empregando-se o eletrodo de BDD, como descrito no procedimento experimental (seção 3.3.1). Após cada pré-tratamento foram obtidos os perfis voltamétricos da IVM e do LVM utilizando-se a SWV e como eletrólitos suporte soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em concentrações de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % etanol v/v) para IVM e  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  para LVM, FIGURA 4.9.

Cabe aqui ressaltar, que não foi utilizada a CV para este e para os próximos estudos que serão aqui apresentados, pois os potenciais de oxidação dos compostos são elevados e não foram obtidos perfis ciclovoltagem bem

definidos, assim uma comparação de sinal analítico foi melhor visualizada utilizando-se a SWV.

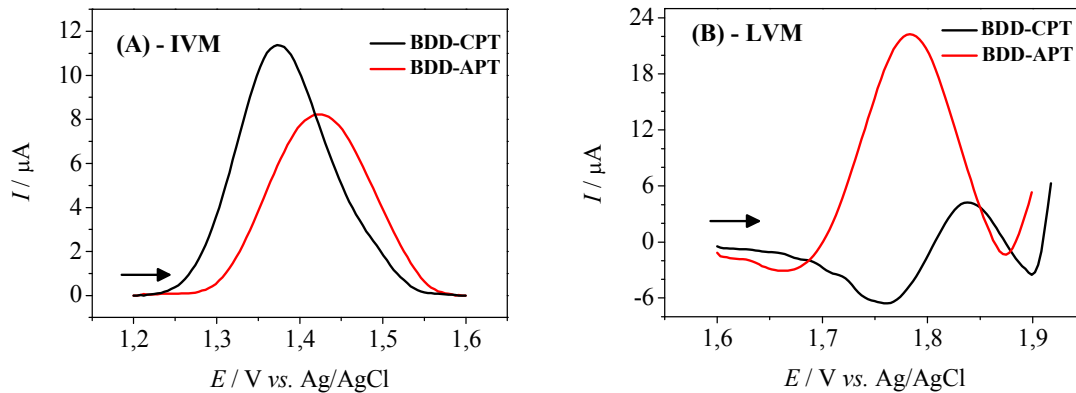


FIGURA 4.9 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos na oxidação de IVM  $180,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % etanol v/v) utilizando um BDD-CPT (—) e BDD-APT (—), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ). (B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos na oxidação de LVM  $48,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando um BDD-CPT (—) e BDD-APT (—), ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

Observando-se a FIGURA 4.9, é possível notar que para a IVM, quando o eletrodo de BDD foi pré-tratado catodicamente, obteve-se uma maior intensidade de corrente e menor potencial de oxidação. Por outro lado, o LVM apresentou uma maior intensidade de corrente e um menor potencial de oxidação quando o eletrodo de BDD foi pré-tratado anodicamente.

De acordo com a literatura e como já citado anteriormente, a superfície dos filmes de BDD recém preparados apresentam terminação em hidrogênio, porém estes hidrogênios podem ser facilmente convertidos a grupos funcionais oxigenados (carboxilas, carbonilas e grupo hidroxilas) utilizando-se polarizações anódicas adequadas e, ainda podem ser novamente re-hidrogenados utilizando polarizações catódicas<sup>135,136</sup>.



Como demonstrado por diversos autores, o comportamento eletroquímico do eletrodo BDD é extremamente dependente das terminações superficiais do eletrodo, desta maneira, as terminações dos filmes de BDD em hidrogênio ou em grupos oxigenados podem facilitar ou inibir as reações de oxirredução sobre a sua superfície<sup>110,112,113,115,118</sup>.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, observou-se que ambos os sistemas redox estudados são sensíveis as terminações superficiais do BDD, sendo que a oxidação da IVM sobre a superfície do eletrodo de BDD é favorecida quando este apresenta terminações em hidrogênio, isto é BDD-CPT. Já, a oxidação do LVM é favorecida quando a superfície do eletrodo de BDD contém terminações com grupos oxigenados, BDD-APT. Conseqüentemente, em todos os experimentos posteriores foram utilizados eletrodos BDD-CPT para a determinação de IVM e BDD-APT para a determinação de LVM.

#### **4.1.2.1.2 – Efeito do eletrólito suporte**

Após o estudo do efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos, estudou-se o comportamento eletroquímico da IVM e do LVM sobre o BDD-CPT e BDD-APT utilizando-se diferentes eletrólitos suporte.

Estudou-se inicialmente a influência de diferentes eletrólitos suporte frente à oxidação eletroquímica da IVM em eletrodo de BDD-CPT. Os eletrólitos estudados foram o ácido acético 0,50 mol L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,10 mol L<sup>-1</sup>, HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e tampão Britton–Robinson 0,04 mol L<sup>-1</sup> (BR) (pH 2,1). Em todas as soluções dos eletrólitos suporte foram utilizados 30 % de etanol (v/v) evitando assim a precipitação da IVM.

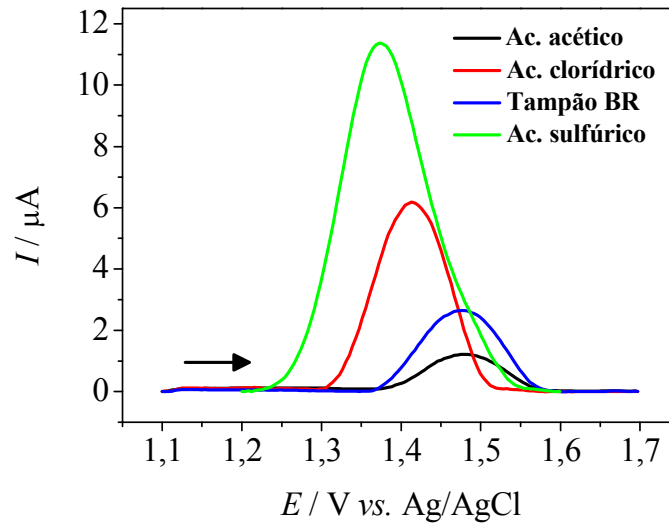


FIGURA 4.10 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de IVM  $180,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes eletrólitos suporte: ácido acético  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  (—);  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (—);  $\text{HCl}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (—) e tampão BR (pH 2,1) (—). ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ ).

Os voltamogramas obtidos para a IVM nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na FIGURA 4.10. O eletrólito que apresentou a melhor resposta quanto à definição de pico, intensidade de corrente e potencial de pico foi o  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .

Em seguida, estudou-se o efeito de diferentes concentrações do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,10$  a  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ), e, a partir dos resultados obtidos (não apresentados) observou-se que o  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou respostas voltamétricas com maior repetibilidade e um maior sinal analítico. Sendo assim, esta concentração do eletrólito suporte foi selecionada para o desenvolvimento do trabalho.

De acordo com a literatura, o LVM apresenta melhor estabilidade em soluções ácidas<sup>137</sup>. Desta forma, o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foi selecionado como eletrólito suporte para a determinação deste fármaco, uma vez que este ácido tem apresentado excelentes resultados como eletrólito suporte para o eletrodo de

BDD, em trabalhos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa<sup>138,139</sup>. A resposta voltamétrica obtida para a LVM em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi bastante satisfatória com um pico de oxidação bem definido e elevada intensidade de pico.

Selecionado o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte para o LVM, fez-se um estudo do efeito de sua concentração, que foi variada entre 0,05 a 0,50 mol L<sup>-1</sup> e avaliado o sinal analítico. Na FIGURA 4.11 são apresentados os voltamogramas obtidos para o LVM nas diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Como não houve diferença significativa na intensidade de corrente para a oxidação do LVM, optou-se por utilizar o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 mol L<sup>-1</sup> nos estudos posteriores.

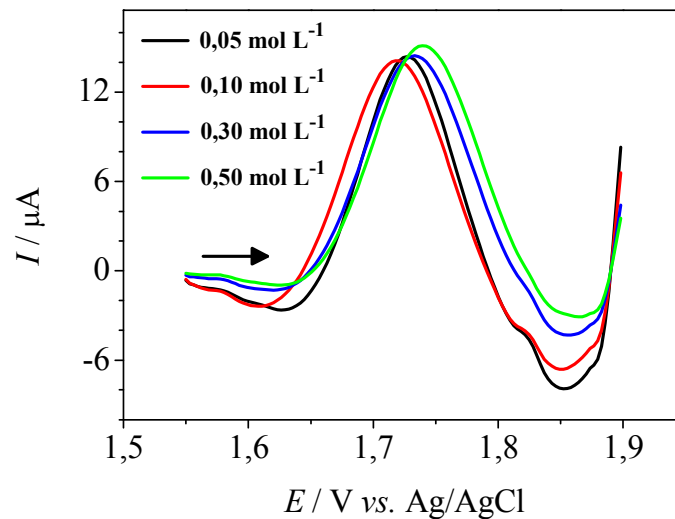


FIGURA 4.11 – Voltamogramas de onda quadrada para o LVM 48,2 μmol L<sup>-1</sup> sobre o eletrodo de BDD-APT e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes concentrações: 0,05 (—); 0,10 (—); 0,30 (—) e 0,50 mol L<sup>-1</sup> (—) ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

#### 4.1.2.2 – Mecanismo de oxidação do LVM sobre o eletrodo de BDD-APT

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na determinação do número de elétrons envolvidos na reação de eletro-oxidação do LVM e o

efeito da velocidade de varredura de potencial na CV, empregando-se o  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte e BDD-APT como eletrodo de trabalho. A partir dos resultados obtidos nestes estudos propôs-se um mecanismo de oxidação para a molécula de LVM.

Para o estudo do mecanismo de oxidação do LVM, inicialmente realizou-se uma eletrólise a potencial controlado e em seguida fez-se um estudo do efeito de diferentes velocidades de varredura utilizando-se CV.

#### **4.1.2.2.1 – Eletrólise em potencial controlado**

A eletrólise do LVM foi realizada aplicando-se um potencial de  $1,75 \text{ V}$  durante  $2400 \text{ s}$ . Após a finalização do experimento a carga registrada foi de  $0,205 \text{ C}$  e, utilizando-se a SWV foi possível calcular a variação do número de mols de LVM ( $\Delta N$ ) presentes no início e ao final da eletrólise. Essa variação do número de mols foi calculada utilizando-se a relação na qual, a corrente de pico obtida antes da eletrólise equivale ao número de mols inicial ( $2,00 \text{ } \mu\text{mols}$ ) e a corrente de pico obtida ao final da eletrólise equivale ao número de mols final ( $0,90 \text{ } \mu\text{mols}$ ), assim  $\Delta N = 1,10 \text{ } \mu\text{mols}$ , FIGURA 4.12.

---

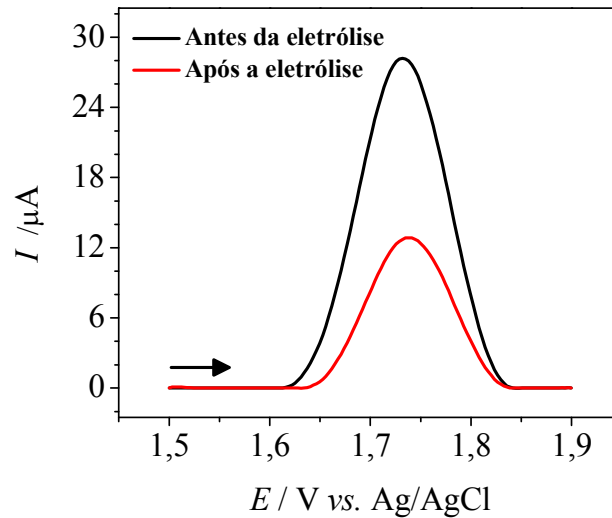


FIGURA 4.12 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos ( $f = 30$  Hz,  $a = 20$  mV,  $E = 3$  mV s<sup>-1</sup>) antes (—) e após (—) a eletrólise do LVM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 mol L<sup>-1</sup> e BDD. Potencial aplicado de 1,75 V por 2400 s.

Assim, o valor de  $n$  (número total de elétrons) foi calculado utilizando-se a equação de Faraday (Equação 4.2)<sup>133</sup>:

$$Q = n \Delta N F \quad \text{Eq. 4.2}$$

sendo  $Q$  igual a carga em coulombs,  $n$  o número de elétrons transferidos na reação,  $\Delta N$  a variação do número de mols durante a eletrólise e  $F$  a constante de Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>).

O valor de  $\Delta N$  (1,10 μmols), de  $Q$  (0,205 C) e de  $F$  foram substituído na Equação 4.2 e desta maneira calculou-se o número de elétrons envolvidos na oxidação do LVM sobre a superfície do BDD. O valor obtido foi de 1,95, o que indica que a oxidação do LVM envolve a transferência de dois elétrons por molécula.

#### 4.1.2.2.2 – Voltametria cíclica

Com a CV foi realizado o estudo em diferentes velocidades de varredura de potencial, 10 a 500  $\text{mV s}^{-1}$ , empregando-se o eletrodo de BDD em solução de LVM 132,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,50  $\text{mol L}^{-1}$ , FIGURA 4.13 (A).

Para avaliar se a oxidação do LVM é controlada por adsorção ou difusão das espécies, construiu-se um gráfico com os valores do logaritmo da variação da intensidade de pico ( $\log I$ ) versus o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log v$ ), FIGURA 4.13 (B). Verificou-se que há uma relação linear entre  $\log I$  e  $\log v$  com um coeficiente angular da reta próximo a 0,50 (valor experimental 0,51). De acordo com a literatura<sup>140</sup> este valor indica que o processo de oxidação do LVM na superfície do BDD é controlado por difusão das espécies. Este controle difusional também pôde ser confirmado pela relação linear ( $r = 0,997$ ) obtida entre a corrente de pico de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura<sup>131</sup> ( $\log I = 4,1 + 0,51 \log v$ ).

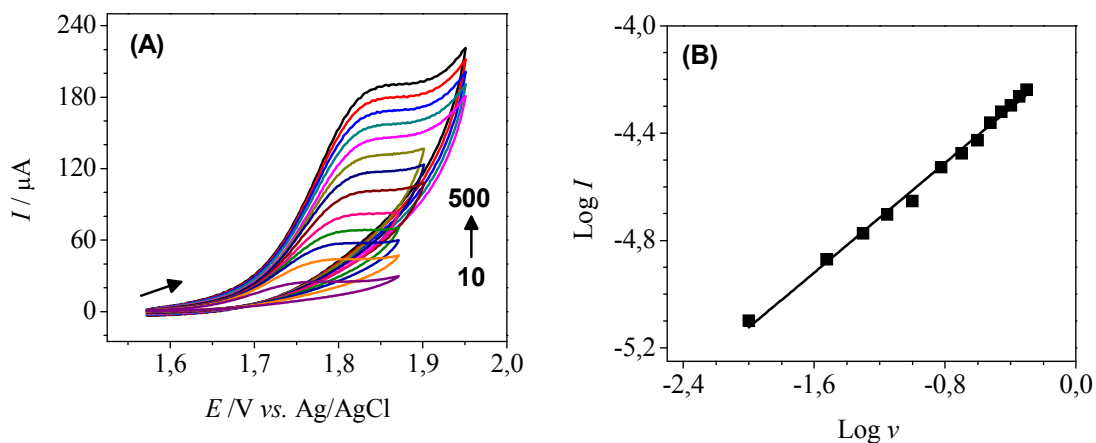


FIGURA 4.13 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD solução de LVM 132,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,50  $\text{mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura: 10, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500  $\text{mVs}^{-1}$ . (B) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para o LVM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,50  $\text{mol L}^{-1}$ .

Aplicando-se equações relacionadas à CV também foi possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do LVM sobre a superfície do BDD.

Utilizando-se os dados obtidos no experimento de CV (variação da velocidade de varredura de potencial), obtiveram-se também as diferenças entre os valores de potencial de pico e potencial de pico de meia onda  $E_p - E_{p_{1/2}}$  (a média dos valores para as diferentes velocidades de varredura de potencial foi de 51 mV) e aplicando-se a Equação 4.3<sup>131</sup>, obteve-se o valor de  $an$  (0,96). Considerando  $\alpha = 0,50$  (valor médio normalmente assumido quando não se tem o valor calculado experimentalmente) o valor encontrado para  $n$  foi de 1,92 ( $\approx 2$ ).

$$|E_p - E_{p_{1/2}}| = \frac{48}{an} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Em ambos os estudos realizados anteriormente, conclui-se que a oxidação do LVM sobre o eletrodo de BDD-CPT envolve a transferência de dois elétrons por molécula oxidada. Considerando-se estes resultados obtidos e estudos prévios encontrados na literatura sobre os principais metabólitos identificados para o LVM<sup>141</sup>, a reação de oxidação proposta para o LVM é apresentado na FIGURA 4.14.

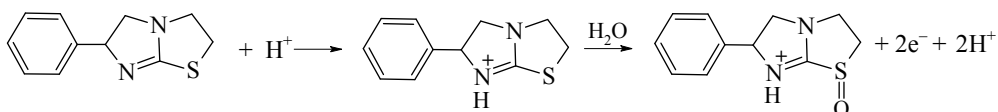


FIGURA 4.14 – Mecanismo de oxidação proposto para o LVM na superfície do BDD em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para a IVM não foi possível realizar as medidas de eletrólise e os estudos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura, já que o

analito apresentou adsorção sobre o eletrodo de BDD, assim houve dificuldade no cálculo do número de elétrons, não sendo proposto neste trabalho um mecanismo de oxidação para a mesma.

Porém, cabe aqui ressaltar que esta adsorção não foi observada nas medidas utilizando-se a detecção amperométrica acoplada ao um sistema FIA, visto que o tempo de contato da amostra e dos produtos da reação redox com a superfície do eletrodo é bem menor quando comparado a sistemas estacionários, permitindo assim, a determinação da IVM, com ótimos resultados os quais serão apresentados a seguir.

#### **4.1.2.3 – Determinação amperométrica de IVM e LVM e aplicação do método proposto na determinação de amostras de formulações farmacêuticas e urina**

##### **4.1.2.3.1 – Otimização dos parâmetros amperométricos e do sistema FIA**

Após a realização de estudos prévios utilizando-se CV e SWV, o eletrodo de BDD foi adaptado a um sistema FIA (detalhado no procedimento experimental).

Voltamogramas hidrodinâmicos da IVM e do LVM foram obtidos a fim de se investigar a resposta amperométrica destes sobre o BDD-CPT e BDD-APT, respectivamente, com a variação do potencial aplicado. Em seguida, estudou-se os parâmetros para a otimização do sistema FIA, tais como: vazão do sistema e volume da alça de amostragem.

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se como eletrólito suporte/solução carregadora o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,50 mol  $\text{L}^{-1}$  (30 % etanol v/v) para a

---



IVM, e para o LVM apenas  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , selecionados em consonância com os estudos previamente apresentados.

Para a obtenção dos voltamogramas hidrodinâmicos utilizou-se a técnica de amperometria, na qual diferentes e sucessivos potenciais positivos próximos aos potenciais de oxidação da IVM ou LVM foram aplicados no eletrodo e as correntes resultantes foram medidas e representadas em função do potencial aplicado (FIGURA 4.15). O intervalo de potenciais estudados para a construção do voltamograma hidrodinâmico para a IVM foi de 1,10 a 1,55 V, e para o LVM foi de 1,45 a 2,05 V.

De acordo os resultados obtidos, observou-se que para a IVM (FIGURA 4.15 (A)) há um aumento de intensidade de sinal até 1,40 V e, após este potencial, a intensidade permanece praticamente constante. Sendo assim, o potencial de 1,40 V foi selecionado para a determinação da IVM. Para o LVM (FIGURA 4.15 (B)), a intensidade da corrente começa a aumentar em potencial de 1,60 V e valores máximos de corrente são obtidos em 1,90 V, sendo este o potencial de trabalho selecionado.

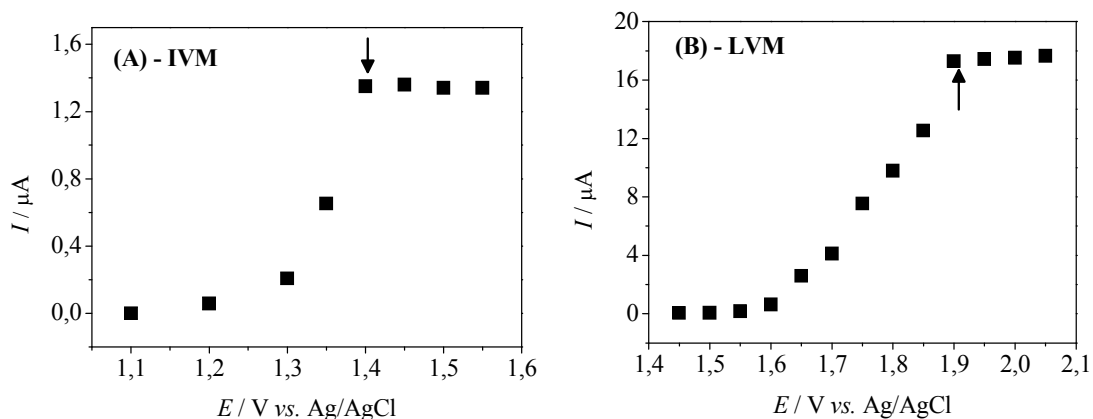


FIGURA 4.15 – (A) Voltamograma hidrodinâmico obtido para IVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (30 % v/v de etanol), volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ . (B) Voltamograma hidrodinâmico obtido para LVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ .

Em seguida, avaliou-se a influência dos parâmetros do sistema FIA como vazão da solução carregadora e volume da alça de amostragem nos resultados obtidos. A variação da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora, foi realizada em um intervalo de 0,9 a 3,5 mL min<sup>-1</sup>, utilizando-se soluções individuais de IVM 50,0 µmol L<sup>-1</sup> e LVM 10,0 µmol L<sup>-1</sup> e potenciais de 1,40 e 1,90 V, respectivamente.

O sinal de corrente obtido para IVM aumentou com o aumento da vazão da solução carregadora de 1,7 mL min<sup>-1</sup> até uma vazão de 2,6 mL min<sup>-1</sup>, diminuindo ou mantendo-se constante em valores de vazões mais elevados. Este comportamento já era esperado, pois a resposta eletroquímica aumenta com o aumento da vazão da solução carregadora, uma vez que aumenta a taxa de transporte de massa para a superfície do eletrodo, diminuindo, conseqüentemente a camada de difusão de Nernst e proporcionando um maior sinal amperométrico. Este aumento de sinal aumenta até determinado valor e depois tende a se manter constante. Assim, a vazão de 2,6 mL min<sup>-1</sup> foi selecionada para os estudos posteriores, FIGURA 4.16 (A).

No caso do LVM houve um aumento do sinal analítico de 1,5 mL min<sup>-1</sup> até a vazão de 3,5 mL min<sup>-1</sup>; FIGURA 4.16 (B). Entretanto, os perfis dos amperogramas obtidos (não apresentados) não ficaram bem definidos em vazões acima de 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Este comportamento sugere que a passagem da solução é muito rápida no detector eletroquímico, havendo assim, uma distorção da resposta amperométrica obtida. Desta maneira, escolheu-se uma vazão de 3,0 mL min<sup>-1</sup> para os estudos posteriores, o qual apresentou um resposta satisfatória.

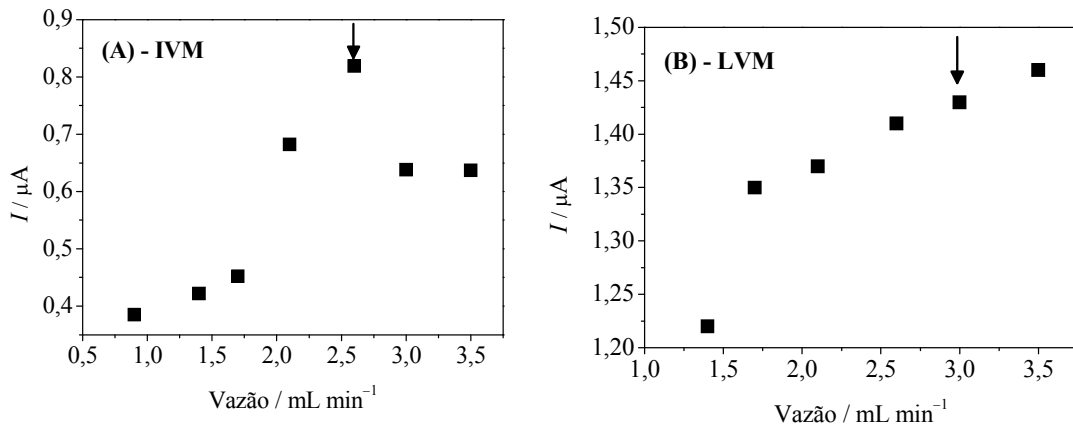


FIGURA 4.16 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora para (A) IVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) LVM  $10,0 \mu\text{mol mol L}^{-1}$ .

Por último, avaliou-se o efeito do volume da alça de amostragem na intensidade do sinal analítico em função dos diferentes volumes empregados para a alça de amostragem. Variou-se o volume de solução padrão ou de amostra injetada (de 50 a 500  $\mu\text{L}$ ) na célula eletroquímica do sistema em fluxo, usando soluções padrões individuais de LVM  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e IVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , FIGURA 4.17.

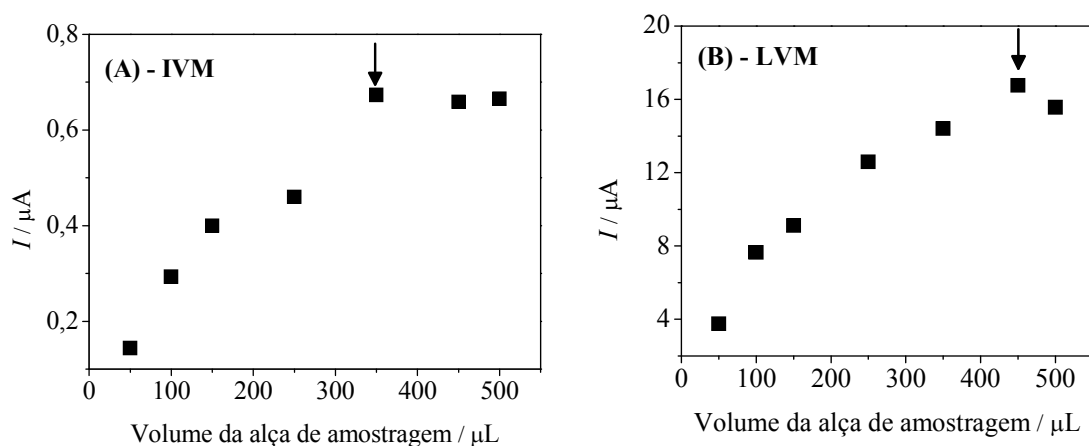


FIGURA 4.17 – Intensidades dos sinais de corrente de IVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e LVM  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) em função do volume da alça de amostragem: 100 a 500  $\mu\text{L}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

De acordo com os dados obtidos (FIGURA 4.17), observou-se um aumento do sinal de corrente com o aumento de volume de injeção, alcançando um valor máximo e permanecendo constante nos valores mais elevados. Este comportamento pode ser explicado pelo efeito de dispersão da amostra entre o injetor e o detector, assim, quanto menor o volume injetado menor a intensidade do sinal, pois a dispersão da amostra pode se estender por toda zona de amostragem. A dispersão é uma característica dos sistemas FIA, sendo causada pelo surgimento de um gradiente de concentração da espécie de interesse nas extremidades da zona da amostra; esta dispersão causará maior efeito de diluição quanto menor for o volume injetado. Desta forma, os volumes das alças de amostragem selecionados para os o desenvolvimento do trabalho foram de 350  $\mu\text{L}$  para IVM e de 450  $\mu\text{L}$  para o LVM.

São apresentados nas FIGURA 4.18 e FIGURA 4.19 os amperogramas obtidos após sucessivas injeções (em triplicata) de soluções padrões de cada anti-helmíntico usando o eletrodo de BDD-CPT ou BDD-APT. As concentrações das soluções injetadas variaram de 0,60; 1,00; 3,00; 5,00; 7,00; 10,0; 30,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para IVM e de 0,01; 0,06; 0,10; 0,30; 0,60; 1,00; 3,00 a 6,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para LVM. Construíram-se então, as respectivas curvas analíticas (insertes da FIGURA 4.18 e FIGURA 4.19) para ambos os anti-helmínticos e as seguintes curvas de analíticas foram obtidas:

$$I_{pa}/\mu\text{A} = 0,0025 + 0,022 ([\text{IVM}] \mu\text{mol L}^{-1}); (r = 0,9994)$$

$$I_{pa}/\mu\text{A} = 0,172 + 0,381 ([\text{LVM}] \mu\text{mol L}^{-1}); (r = 0,9998)$$

O cálculo do LD foi realizado utilizando-se o método da relação sinal-ruído<sup>123,142</sup>. Neste caso a relação utilizada foi de 2 ou 3 vezes o sinal/ruído (2 S/N ou 3 S/N). Desta maneira os LDs obtidos foram de 0,30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (2 S/N) para a IVM e 1,0  $\text{nmol L}^{-1}$  (3 S/N) para o LVM.

Para o LVM, o LD obtido neste trabalho apresentou menor valor ( $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ ) quando comparados aos valores obtidos nos dois métodos eletroanalíticos encontrados na literatura descritos por SADEGHI et al.<sup>72</sup> ( $1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e por HOLBROOK et al.<sup>71</sup> ( $4,0 \text{ nmol L}^{-1}$ ). Ademais, no caso da IVM, não há trabalhos eletroanalíticos para a determinação deste analito.

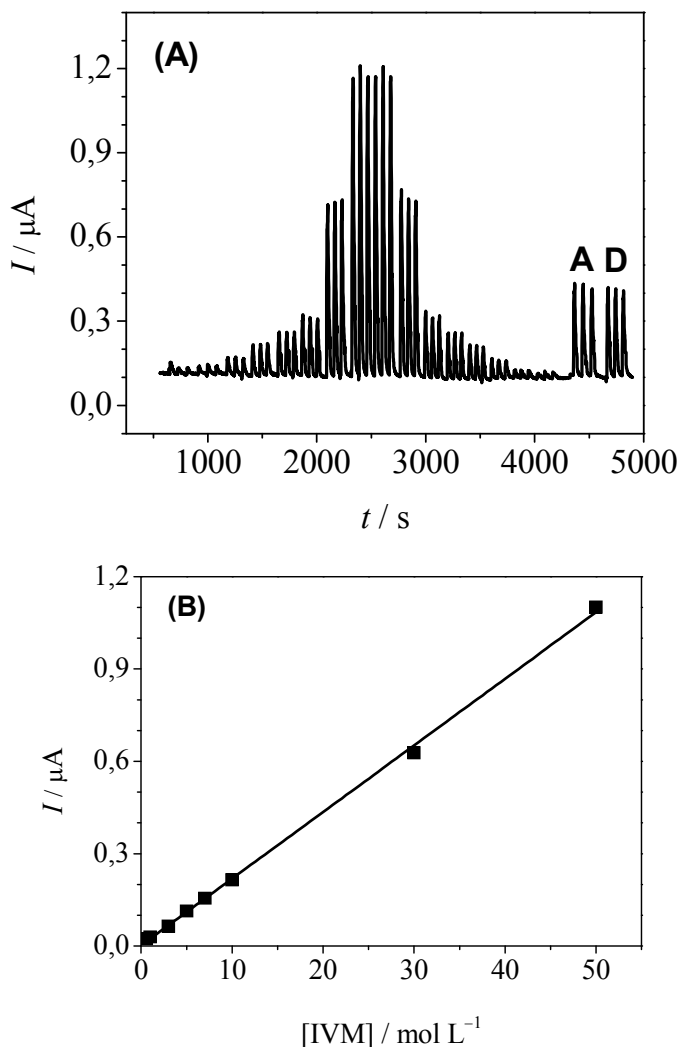


FIGURA 4.18 – (A) Amperograma obtido empregando-se o eletrodo de BDD em solução de IVM em diferentes concentrações: 0,60; 1,00; 3,00; 5,00; 7,00; 10,0; 30,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica obtida para a IVM. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5  $\text{mol L}^{-1}$  (30 % v/v de etanol), volume de injeção: 350  $\mu\text{L}$  e vazão: 2,6  $\text{mL min}^{-1}$ . Os sinais obtidos em A e D (FIGURA A) são correspondentes a duas amostras comerciais.

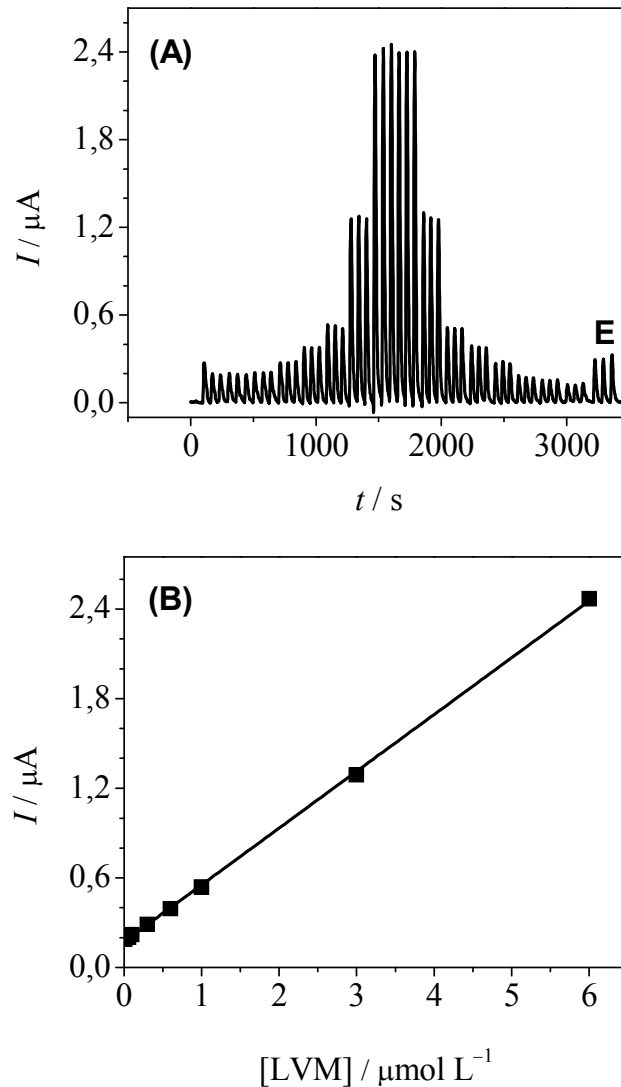


FIGURA 4.19 – (A) Amperograma obtido empregando-se o eletrodo de BDD em solução de LVM em diferentes concentrações: 0,01; 0,06; 0,10; 0,30; 0,60; 1,00; 3,00 e 6,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica obtida para o LVM. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,50  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção: 450  $\mu\text{L}$  e vazão: 3,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Os sinais de corrente obtidos em E (FIGURA A) são correspondentes a uma amostra comercial.

A frequência analítica para cada método foi calculada nas condições anteriormente apresentadas, obtendo-se valores de 48 e 56 determinações por hora para IVM e LVM, respectivamente.

As repetibilidades intra-dia foram determinadas por medidas sucessivas no mesmo dia ( $n = 10$ ), para soluções padrões de IVM e LVM em duas diferentes concentrações. Para o estudo da repetibilidade inter-dias foram utilizados os desvios das correntes de pico obtidas para medidas feitas ao longo de 5 dias ( $n = 5$ ), sendo as soluções padrões preparadas diariamente em duas concentrações diferentes de IVM e LVM. Na TABELA 4.5 são apresentados os RSDs obtidos para as diferentes concentrações de IVM e LVM nos estudos de repetibilidades, com valores satisfatórios abaixo de 5,1 %, indicando uma boa repetibilidade do procedimento desenvolvido.

TABELA 4.5 – Resultados obtidos para os estudos de repetibilidade intra e inter-dias

| Repetibilidade                                 | Intra-dia<br>(RSD %)* | Inter-dias<br>(RSD %)** |
|--|-----------------------|-------------------------|
| <b>IVM (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> |                       |                         |
| 3,00   | 5,05                  | 2,54                    |
| 10,0   | 1,36                  | 3,21                    |
| <b>LVM (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> |                       |                         |
| 0,30   | 3,03                  | 4,09                    |
| 1,00   | 4,75                  | 3,95                    |

\*  $n = 10$ ; \*\*  $n = 5$

Para investigar os possíveis interferentes no método proposto, o comportamento amperométrico dos dois anti-helmínticos (IVM ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e LVM ( $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ )) separadamente e na presença de diversas substâncias como: lactose, amido (1 %), glicerol, propilenoglicol substâncias geralmente presentes nas formulações farmacêuticas e uréia geralmente presente em urina, foram estudadas.

Foram estudadas as razões de concentração do analito:interferente de 1:1 e 1:10, no caso da lactose, amido e uréia. Para o glicerol e o propilenoglicol (estudo feito apenas para a IVM), as razões foram de 1:500 e 1:750 (IVM:interferente), uma vez que estas são as proporções aproximadas nas

amostras analisadas. Com base nos resultados obtidos (não mostrados), foi possível concluir que essas substâncias não interferem de forma significativa na determinação de ambos os analitos, uma vez que os valores em percentagem das interferências obtidas foram menores que  $\pm 10\%$ .

#### **4.1.2.3.2 – Métodos comparativos – absorção espectrofotométrica no ultravioleta visível (UV-Vis) e titulação potenciométrica**

Foram adotados como métodos comparativo, os métodos de absorção espectrofotométrica no UV-Vis<sup>143</sup> para a IVM e a titulação potenciométrica<sup>127</sup> (método da Farmacopéia Britânica) para o LVM com a finalidade de avaliar o desempenho do método eletroanalítico desenvolvido empregando-se amperometria acoplada ao sistema FIA e o eletrodo de BDD na determinação individual de IVM e LVM.

As condições experimentais foram empregadas de acordo com o descrito na parte experimental (seções 3.3.5.2 e 3.3.5.3).

Os espectros de UV obtidos para IVM em  $\lambda$  de 245 nm são apresentados na FIGURA 4.20 em diferentes concentrações de soluções padrão de IVM ( $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e a respectiva curva analítica (inserida).

---



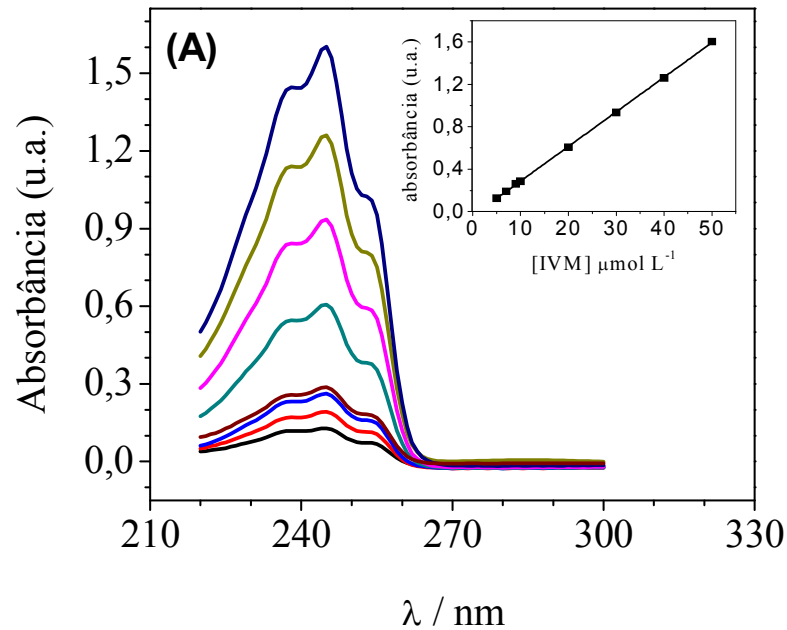


FIGURA 4.20 - Espectros obtidos para diferentes concentrações de solução de IVM ( $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $7,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $9,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em metanol e  $\lambda = 245 \text{ nm}$  e a curva analítica obtida (inserte).

A equação da curva analítica obtida para a IVM foi:

$$\text{Abs / u.a.} = -0,00379 + 3,26 \times 10^4 ([\text{IVM}] \text{ mol L}^{-1}); (r = 0,999)$$

São apresentados na FIGURA 4.21 os resultados obtidos na quantificação da amostra farmacêutica de LVM, utilizando-se a titulação potenciométrica e empregando-se solução padronizada de NaOH  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ . Como pode ser observado nesta figura, dois pontos de inflexão foram obtidos nos volumes de titulante iguais a 0,4 e 3,4 mL, sendo que o primeiro volume de equivalência está relacionado a titulação do  $\text{Cl}^-$  adicionado (HCl inicialmente adicionado à amostra), e o segundo ponto de inflexão está relacionado ao cloridrato da molécula de LVM. A figura inserida é o gráfico da primeira derivada da curva de titulação potenciométrica obtida.

Empregando-se a diferença entre os dois volumes de equivalência obtido nesta titulação, calculou-se o teor de LVM na amostra de acordo com a relação fornecida pela Farmacopéia Britânica<sup>127</sup> de que 1 mL de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> é equivalente a 24,08 mg de cloridrato de LVM.

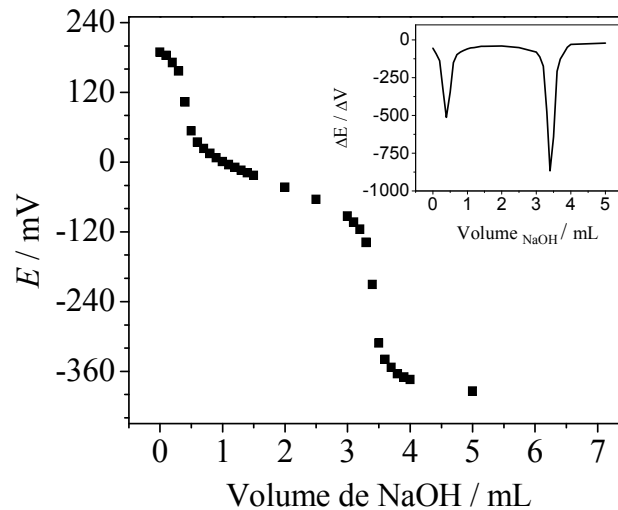


FIGURA 4.21 – Curva da titulação potenciométrica do LVM com o titulante NaOH (0,12 mol L<sup>-1</sup>) e gráfico da primeira derivada da curva de titulação (insete).

Finalmente, a fim de avaliar o procedimento desenvolvido, empregando-se o eletrodo de BDD e a técnica de amperometria acoplada ao sistema FIA para a determinação individual de IVM e LVM, foram analisadas três amostras comerciais farmacêuticas de IVM e uma amostra comercial de LVM.

Na FIGURA 4.18 e FIGURA 4.19, apresentadas anteriormente, também são mostrados os sinais transientes obtidos após injeções em triplicata das soluções de duas amostras farmacêuticas de IVM (A e D) e de uma amostra de LVM (E).

Na TABELA 4.6 são apresentados os resultados obtidos na análise dessas amostras que foram comparados com os resultados obtidos por absorção espectrofotométrica no ultravioleta visível – UV-Vis<sup>143</sup> (para IVM) e por

titulação potenciométrica<sup>127</sup> (para LVM). Para cada amostra calculou-se o desvio padrão de três injeções e as quantidades de IVM e LVM em cada amostra foram determinadas por interpolação nas respectivas curvas analíticas obtidas anteriormente.

TABELA 4.6 – Resultados obtidos na determinação de IVM e LVM em formulações farmacêuticas pelo método amperométrico proposto e pelos métodos comparativos

| Analito | Amostras | Método                   | Método                     | Erro <sup>b</sup> (%) |
|---------|----------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
|         |          | comparativo <sup>a</sup> | amperométrico <sup>a</sup> |                       |
| IVM     | A*       | 1,33 ± 0,01              | 1,47 ± 0,02                | + 10                  |
| IVM     | B*       | 1,17 ± 0,01              | 1,09 ± 0,01                | - 6,8                 |
| IVM     | C*       | 1,13 ± 0,00              | 1,14 ± 0,04                | + 0,88                |
| IVM     | D**      | 15,1 ± 0,1               | 16,4 ± 0,5                 | + 8,6                 |
| LVM     | E**      | 151 ± 3                  | 147 ± 9                    | - 2,6                 |

a) n = 3

b) Média do erro (%) =  $100 \times [(\text{valor amperométrico} - \text{valor comparativo}) / \text{valor comparativo}]$ .

\* (mg/ 100 mL)

\*\* (mg/ comprimido)

Como pode ser observado na TABELA 4.6, os resultados obtidos por amperometria estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se os métodos comparativos.

Aplicou-se o teste *t*-pareado para verificar a concordância dos resultados obtidos empregando-se os métodos descritos. Para a IVM o valor de *t* obtido ( $t_{\text{experimental}} = 1,24$ ) foi inferior ao valor crítico tabelado ( $t_{\text{crítico}} = 3,18$ ,  $\alpha =$

0,05) e, para o LVM, o valor de  $t$  obtido ( $t_{\text{experimental}} = 2,08$ ) foi inferior ao valor crítico tabelado ( $t_{\text{crítico}} = 2,35$ ,  $\alpha = 0,05$ ) indicando que não há diferença significativa entre os teores encontrados em um nível de confiança de 95 %. Ademais, os erros relativos são aceitáveis.

O método proposto também foi utilizado para a determinação de IVM e LVM em amostras de urina sintética dopadas. Os resultados obtidos para as recuperações de IVM e LVM são mostrados na TABELA 4.7. Como pode ser observado, o procedimento amperométrico desenvolvido usando o eletrodo de BDD apresentou valores de recuperação de IVM e LVM bastante satisfatórios, indicando que não há interferência da matriz da amostra e que os métodos desenvolvidos neste trabalho de tese podem ser utilizados para a determinação de ambos os analitos em amostras de urina.

Ademais, considerando os valores de IVM e LVM eliminados via urinária ( $0,32 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a IVM e  $31,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o LVM), os valores obtidos para o LD são satisfatórios para detectar qualquer um dos compostos em amostras de urina.

TABELA 4.7 – Estudos de adição e recuperação de IVM e LVM em amostras de urina

| <b>Método Amperométrico</b> |                          |  |  |                        |
|-----------------------------|--------------------------|--|--|------------------------|
| <b>Analito</b>              | <b>Amostras de urina</b> | <b>Adicionado (mol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Encontrado<sup>a</sup> (mol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
| IVM                         | A                        | $6,0 \times 10^{-6}$                   | $(5,8 \pm 0,1) \times 10^{-6}$                     | 97                     |
| IVM                         | B                        | $1,0 \times 10^{-5}$                   | $(9,5 \pm 0,1) \times 10^{-6}$                     | 95                     |
| LVM                         | C                        | $3,0 \times 10^{-7}$                   | $(3,2 \pm 0,0) \times 10^{-7}$                     | 107                    |
| LVM                         | D                        | $1,5 \times 10^{-6}$                   | $(1,5 \pm 0,0) \times 10^{-6}$                     | 100                    |

a)  $n = 3$

### **4.1.3 – Determinação simultânea de ABZ-SO e LVM utilizando-se um sistema FIA e detecção por amperometria de múltiplos pulsos (MPA)**

Este método foi desenvolvido para a determinação simultânea de dois anti-helmínticos ABZ-SO e LVM utilizando-se um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (FIA-MPA) empregando-se o eletrodo de BDD-APT.

Esta combinação de princípios ativos não é vendida em nenhuma formulação farmacêutica, porém, há estudos que sugerem que o uso da combinação de princípios ativos com mecanismos de ação diferentes pode ser uma medida para melhorar a eficácia de cada princípio ativo isoladamente, até mesmo na prevenção da resistência parasitária, podendo, desta forma, ocorrer a injeção destes fármacos simultaneamente.

Como já citado anteriormente, o ABZ é detectado principalmente na forma de ABZ-SO na urina, por isso o método desenvolvido propõe a determinação de ABZ-SO, ao invés de ABZ, simultaneamente ao LVM.

#### **4.1.3.1 – Investigação do comportamento eletroquímico de ABZ-SO e LVM e efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao BDD**

Como já discutido anteriormente, o LVM apresenta boa resposta em  $H_2SO_4$  e seu potencial de pico de oxidação e intensidade de sinal não diferencia muito nas diferentes concentrações do ácido (VER FIGURA 4.11).

O ABZ-SO é o produto da oxidação do ABZ (como descrito na introdução) e o potencial do pico de oxidação varia com o aumento do pH conforme apresentado na FIGURA 4.22. Também pode ser observado nesta

---

figura que o potencial de oxidação e intensidade do sinal analítico diminuem com o aumento de pH.

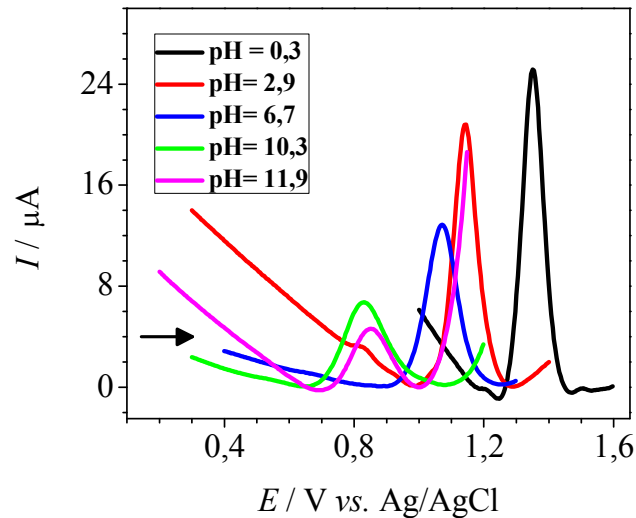


FIGURA 4.22 – Voltamogramas obtidos por SWV para ABZ-SO  $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes valores de pH: 0,3 (—); 2,9 (—); 6,7 (—); 10,3 (—) e 11,9 (—) em solução padrão de tampão BR e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH}_{\text{cond}} 0,30$ ). ( $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

Os valores de  $\text{pH}_{\text{cond}}$  de 0,3 e 2,9 foram os que apresentaram a maior intensidade de corrente para o ABZ-SO. Como o objetivo deste trabalho é a determinação simultânea do ABZ-SO e LVM e considerando-se que o LVM apresenta maior estabilidade em meio ácido e que quanto maior o valor de  $\text{pH}_{\text{cond}}$  mais o pico de oxidação do ABZ-SO está deslocado para valores mais próximo de zero, porém com menor intensidade de sinal analítico, utilizou-se para a determinação simultânea destes anti-helmínticos, como eletrólito suporte/solução carregadora uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}_{\text{cond}} 1,3$ , valor entre 0,3 e 2,9).

#### 4.1.3.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico

No caso do LVM já era conhecido de estudo anterior que o BDD-APT apresenta melhora do sinal analítico na oxidação do LVM, assim, foi avaliado o efeito dos dois pré-tratamentos para o ABZ-SO e os voltamogramas obtidos são apresentados na FIGURA 4.23. De acordo com os resultados obtidos, o valor de intensidade de pico, quando o pré-tratamento anódico foi realizado, foi aproximadamente 1,5 vezes maior que para o pré-tratamento catódico e ainda há uma melhora quanto a definição de pico utilizando-se o BDD-APT. Desta maneira, escolheu-se o BDD-APT para os estudos posteriores na determinação simultânea de ABZ-SO e LVM.

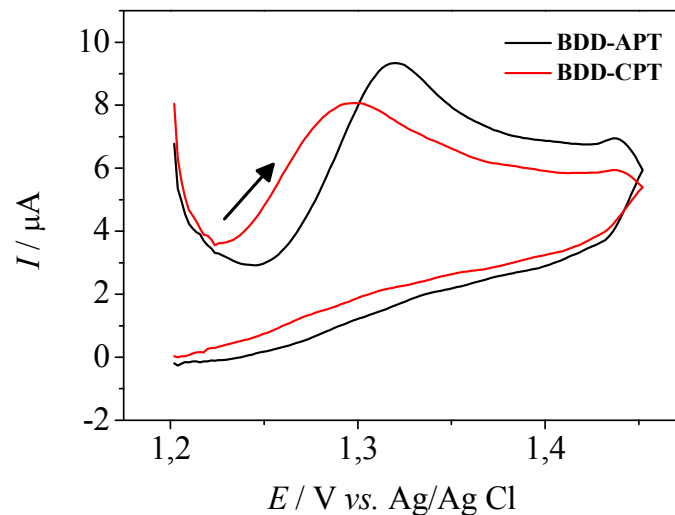


FIGURA 4.23 – Voltamogramas cíclicos obtido na oxidação de ABZ-SO 47,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$  utilizando um BDD-APT (—) e BDD-CPT (—).

### **4.1.3.2 – Determinação amperométrica de ABZ-SO e LVM e aplicação do método proposto na determinação de amostras de urina**

#### **4.1.3.2.1 – Otimização dos parâmetros amperométricos e do sistema FIA-MPA**

Inicialmente realizou-se um estudo da variação do potencial aplicado, em relação a intensidade do sinal analítico obtido para a oxidação de ambos analitos, utilizando-se a técnica de amperometria. Para este estudo, partiu-se do conhecimento adquirido no estudo de CV, feito anteriormente, onde o ABZ-SO e LVM apresentaram picos de oxidação próximos a 1,30 V e 1,75 V, respectivamente.

Os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 4.24, nos quais observou-se um aumento mais acentuado de intensidade de sinal com o aumento do potencial aplicado de 1,25 até 1,40 V para o ABZ-SO  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (FIGURA 4.24 (A)), acima deste potencial a intensidade de sinal continua aumentando, porém, esse aumento é menos acentuado, assim, escolheu-se o potencial de 1,40V para o desenvolvimento do trabalho, uma vez que, em potenciais maiores começa a ocorrer a oxidação do LVM, o que dificultaria a determinação simultânea dos dois compostos.

No caso do LVM (FIGURA 4.24 (B)), a intensidade de sinal aumenta com o aumento do potencial aplicado, atingindo uma estabilidade da intensidade de sinal em potencial próximo a 2,00 V, porém em potenciais acima de 1,95 V houve perda de definição do sinal analítico dos amperogramas (não apresentados), escolhendo-se assim, como potencial de trabalho 1,90 V.

---



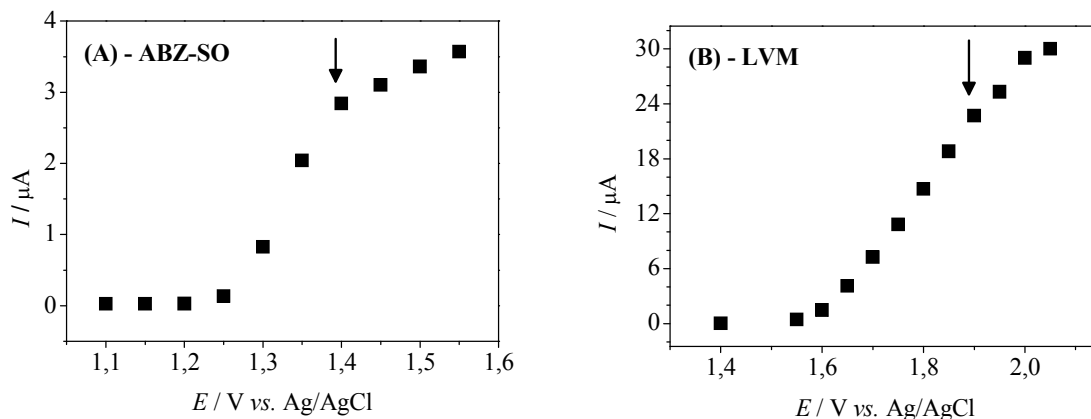


FIGURA 4.24 – (A) Voltamograma hidrodinâmico obtido para ABZ-SO  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Voltamograma hidrodinâmico obtido para LVM  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrólito suporte =  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como a técnica de MPA permite a aplicação de até dez pulsos de potenciais sequenciais (tempo de aplicação de cada pulso na ordem de milissegundos) em função do tempo, o estudo do tempo de aplicação de cada pulso é um parâmetro a ser estudado quando se utiliza a técnica de MPA. Assim, realizou-se este estudo fixando-se os potenciais de trabalho em  $1,40 \text{ V}$  e  $1,90 \text{ V}$  e variando-se o tempo de aplicação do pulso de  $100$  a  $300 \text{ ms}$ .

Os gráficos de magnitude de corrente em função do tempo de aplicação do pulso de potencial são apresentados na FIGURA 4.25. Observou-se que a magnitude de sinal diminuiu consideravelmente com o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial para a detecção do ABZ-SO. Esse comportamento também é observado para o LVM, porém não de forma tão acentuada.

Considerando-se que na técnica de MPA, o tempo de uma mesma análise é proporcional ao tempo de aplicação dos pulsos de potencial (limitação do software utilizado), baixos tempos proporcionam pouco tempo de análise, impossibilitando assim a construção de uma curva analítica e análise das amostras em um mesmo amperograma, além de que, baixos tempos, no caso do

ABZ-SO, apresentaram uma linha base instável. Desta forma, optou-se por utilizar o tempo de aplicação de pulsos de 200 ms para ambos analitos, o qual proporcionou um tempo de análise suficiente e com linha base estável.

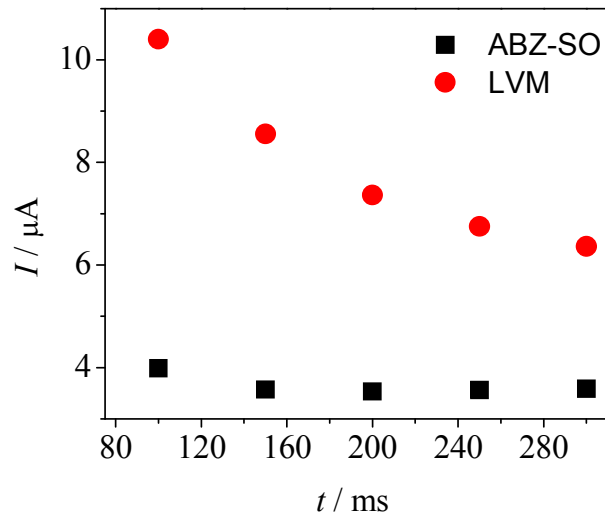


FIGURA 4.25 – Intensidades dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potenciais: (●) ABZ-SO 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 1,40 V e (■) LVM 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial: 1,90 V. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ .

Para a determinação simultânea do ABZ-SO e LVM, nos estudos de vazão do sistema e volume da alça de amostragem, os analitos foram avaliados concomitantemente.

Realizou-se o estudo da vazão da solução carregadora avaliando-se, como a variação da vazão do sistema influencia na intensidade de corrente para soluções padrões de ABZ-SO 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LVM 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Neste estudo, avaliou-se as vazões de 1,4  $\text{mL min}^{-1}$  a 3,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Como já discutido, o sinal analito deve aumentar com o aumento da vazão da solução carregadora.

Observando-se a FIGURA 4.26, nota-se um crescente aumento da intensidade do sinal de corrente até uma vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  para ambos os compostos e, após esta vazão não se observa variações significativas nas intensidades de corrente. Sendo assim, selecionou-se a vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  para os estudos posteriores.

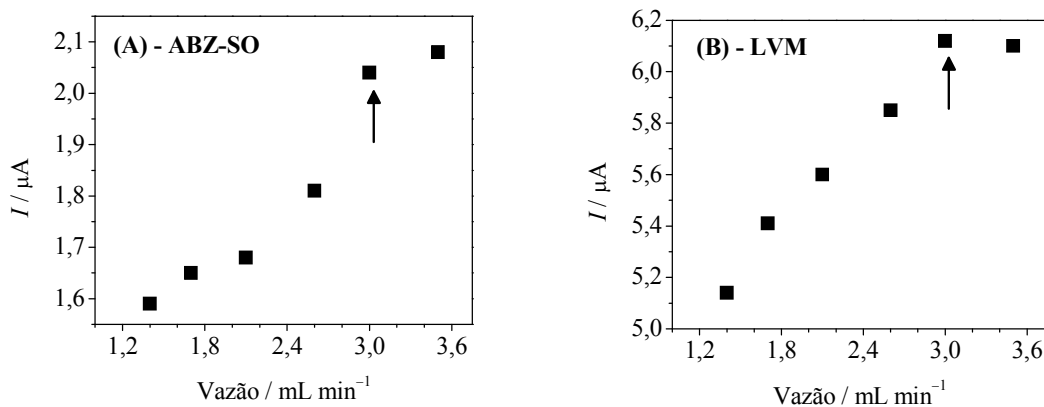


FIGURA 4.26 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) para (A) ABZ-SO  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) LVM  $10,0 \mu\text{mol mol L}^{-1}$ .

O efeito do volume da alça de amostragem, de  $100$  a  $500 \mu\text{L}$ , sobre o sinal analítico do sistema FIA-MPA foi investigado para soluções padrões de ABZ-SO  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e LVM  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução carregadora de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e de vazão  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como já discutido anteriormente, o aumento do volume da alça de amostragem proporciona um aumento da magnitude do sinal analítico até alcançar um valor máximo e permanecendo praticamente constante em volumes maiores. Deste modo, na FIGURA 4.27, observa-se um aumento do sinal analítico até um volume de  $350 \mu\text{L}$  para ambos os compostos e, em volumes superiores, o sinal analítico permaneceu praticamente constante. Assim, o volume da alça de amostragem selecionado foi de  $350 \mu\text{L}$ .

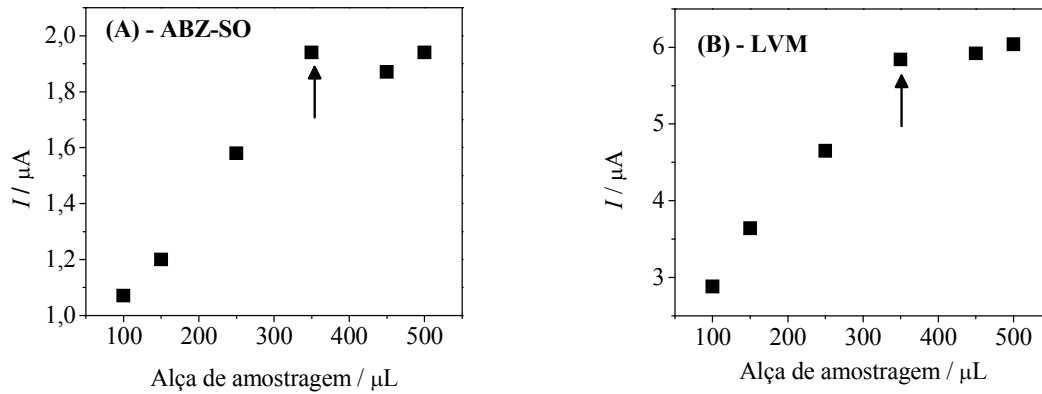


FIGURA 4.27 – Intensidades dos sinais de corrente de ABZ-SO  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e LVM  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) em função do volume da alça de amostragem: 100 a 500  $\mu\text{L}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.1.3.2.2 – Comportamento amperométrico do ABZ-SO e LVM frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial

Após a escolha dos potenciais de trabalho, dos tempos de aplicação dos pulsos e da otimização dos parâmetros do sistema FIA, foi realizada a aplicação de uma sequência de dois pulsos de potencial (1,40 e 1,90 V) em função do tempo para soluções padrões de ABZ-SO e LVM.

São apresentados na FIGURA 4.28 os amperogramas obtidos para este estudo e a sequência de aplicação dos dois pulsos, os quais foram:

1.  $E_{\text{det.1}} = +1,40\text{V} / 200 \text{ ms}$ : pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas do ABZ-SO;
2.  $E_{\text{det.2}} = +1,90\text{V} / 200 \text{ ms}$ : pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (ABZ-SO e LVM).

As soluções foram injetadas em triplicata na ordem: ABZ-SO ( $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); LVM ( $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); e a mistura de ABZ-SO + LVM nas mesmas concentrações.

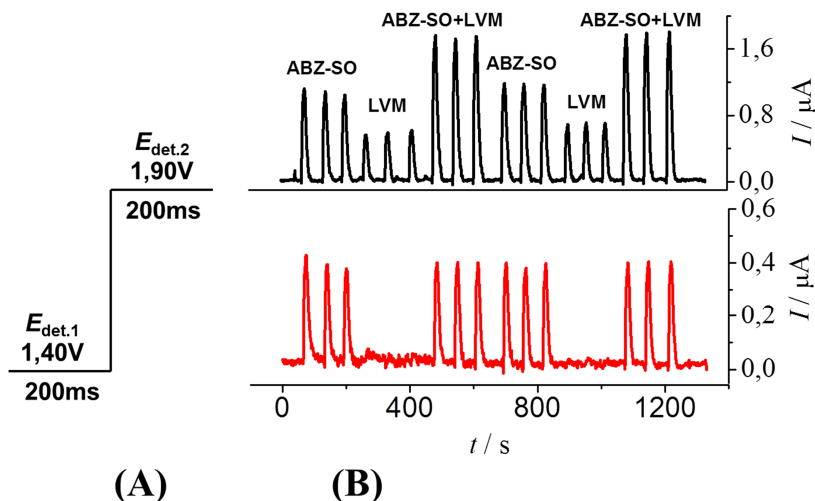


FIGURA 4.28 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT e soluções de ABZ-SO  $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ , LVM  $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ABZ-SO + LVM nas mesmas concentrações. Eletrólito suporte/solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Pode-se observar na FIGURA 4.28 que em  $E_{det.1}$  ( $1,40 \text{ V}$ ) a corrente aumenta apenas ao injetar as soluções contendo apenas ABZ-SO ou a mistura (ABZ-SO + LVM), assim, em ambos os casos o sinal de corrente obtido em  $E_{det.1}$  está relacionado somente com a oxidação do ABZ-SO. Porém, em  $E_{det.2}$  ( $1,90 \text{ V}$ ) observa-se que a intensidade de corrente aumenta ao injetar soluções contendo somente LVM, somente ABZ-SO ou a mistura (ABZ-SO + LVM), isso significa que a intensidade de corrente obtida neste potencial ( $E_{det.2}$ ) está relacionada a oxidação de ambas as espécies.

Desta maneira, o sinal de corrente obtido em  $E_{det.1}$  é proporcional a concentração apenas de ABZ-SO ( $I_{ABZ-SO} = I_{E_{det.1}}$ ) e, o sinal de corrente obtido em  $E_{det.2}$  é proporcional a soma das concentrações de ambos os analitos (ABZ-SO + LVM). Portanto, a quantificação de ABZ-SO pode ser feita de forma direta em  $E_{det.1}$ , enquanto a quantificação do LVM é feita de maneira indireta em

$E_{\text{det.2}}$  sendo necessário a subtração das correntes ( $I_{\text{LVM}} = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}}$ ) para se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de LVM.

No entanto, a amplitude de corrente obtida em  $E_{\text{det.1}}$  para o ABZ-SO não é igual a amplitude de corrente obtida para a mesma concentração de ABZ-SO em  $E_{\text{det.2}}$ , uma vez que o potencial de pulso aplicado é diferente. Assim, a diferença entre estes sinais de corrente pode ser quantificada empregando-se um fator de correção, dividindo-se o valor de corrente obtido para uma solução de ABZ-SO em 1,90 V pela corrente obtida em 1,40 V, ou seja:

$$\text{Fator de correção (FC)} = I_{\text{ABZ-SO } 1,90\text{V}} / I_{\text{ABZ-SO } 1,40\text{V}}$$

O FC foi calculado para diferentes concentrações e a média dos valores encontrados entre todos os pontos foi de  $2,62 \pm 0,07$ . Na TABELA 4.8 são apresentados a variação do FC em função da concentração de ABZ-SO e a média obtida.

TABELA 4.8 – Variação do FC em função da concentração de ABZ-SO e a média dos valores

| Concentração de ABZ-SO<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | FC*  | Média do FC     |
|--|------|-----------------|
| 2,00   | 2,60 |                 |
| 3,00   | 2,48 |                 |
| 6,00   | 2,63 |                 |
| 10,0   | 2,64 |                 |
| 20,0   | 2,55 | $2,62 \pm 0,07$ |
| 40,0   | 2,62 |                 |
| 60,0   | 2,63 |                 |
| 80,0   | 2,69 |                 |
| 100,0  | 2,74 |                 |

\*n = 3

Sendo assim, para se obter a mesma amplitude de corrente para o ABZ-SO em  $E_{\text{det.1}}$  e  $E_{\text{det.2}}$  multiplicou-se  $E_{\text{det.1}}$  por 2,62, e a amplitude de corrente proporcional a concentração de LVM foi  $I_{\text{LVM}} = I_{\text{Edet.2}} - (I_{\text{Edet.1}} \times 2,62)$ .

Em continuação aos estudos, foi realizado um experimento com sucessivas injeções de soluções padrões de ABZ-SO + LVM em concentrações

crescentes. Os amperogramas obtidos para as sucessivas injeções da mistura e as respectivas curvas analíticas obtidas são apresentados na FIGURA 4.29.

As curvas analíticas apresentaram boas linearidades para oABZ-SO e LVM com as seguintes equações de reta:

$$I_{pa}/\mu\text{A} = -0,133 + 0,145 ([\text{ABZ-SO}] \mu\text{mol L}^{-1}); r = 0,9995$$

$$I_{pa}/\mu\text{A} = 0,0313 + 2,40 ([\text{LVM}] \mu\text{mol L}^{-1}); r = 0,9971$$

---

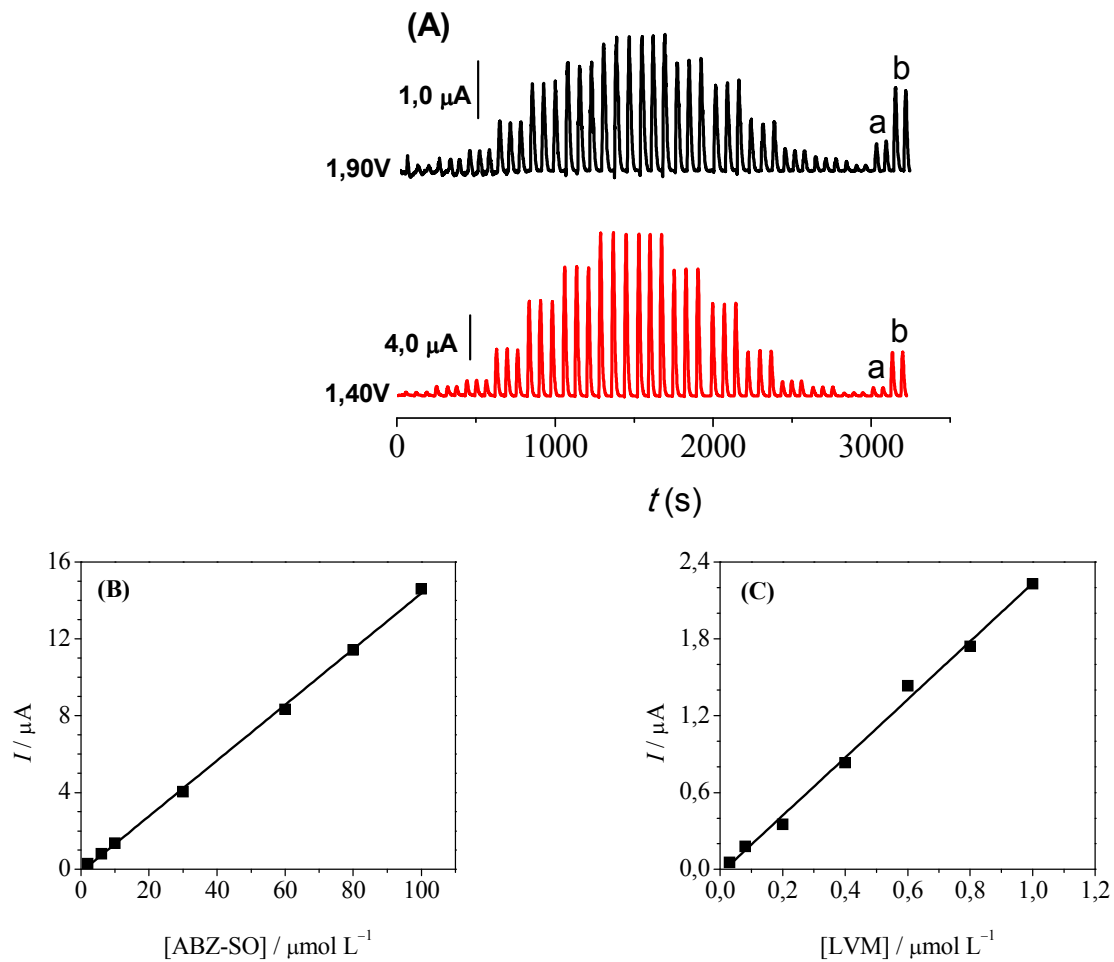


FIGURA 4.29 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo BDD-APT em diferentes concentrações de ABZ-SO (–) e LVM (–). Concentrações de ABZ-SO: 2,00; 6,00; 10,0; 30,0; 60,0; 80,0; 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LVM: 0,03; 0,08; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; e 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) curva analítica obtida para o ABZ-SO e (C) curva analítica obtida para o LVM. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 3,0  $\text{mL min}^{-1}$ , E 1,40 e 1,90 V. Os sinais obtidos em a e b correspondem a duas amostras analisadas.

Os LDs foram determinados utilizando-se o método da relação sinal-ruído<sup>123,142</sup>. Neste caso, a relação utilizada foi de 3 vezes o sinal do ruído (3



S/N). Desta maneira os LD obtidos para ABZ-SO e LVM foram iguais a 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 6,0  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente.

A frequência analítica do método foi calculada nas condições anteriormente apresentadas, obtendo-se um valor de 53 determinações por hora para ABZ-SO e LVM.

A repetibilidade intra-dia foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ( $n = 10$ ), para soluções padrões de ABZ-SO + LVM em duas diferentes concentrações (FIGURA 4.30). Os RSDs obtidos para as diferentes concentrações de ABZ-SO (6,00 e 60,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e LVM (0,08 e 0,60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) são apresentados na TABELA 4.9.

Para o estudo da repetibilidade inter-dias foram realizadas medidas em três diferentes dias ( $n=3$ ) com diferentes soluções padrões de ABZ-SO + LVM em duas diferentes concentrações. Os RSDs obtido para as diferentes concentrações de ABZ-SO e LVM são apresentados na TABELA 4.9.

Os valores obtidos tanto para a repetibilidade intra-dia quanto para a repetibilidade inter-dias, foram satisfatórios apresentando RSDs menores ou igual a 8,90 %, indicando assim uma boa repetibilidade do procedimento desenvolvido.

TABELA 4.9 – Resultados obtidos nos estudos de repetibilidade intra e inter-dias para ABZ-SO e LVM

| Repetibilidade                                    | Intra-dia<br>(RSD %)* | Inter-dias<br>(RSD %)** |
|---|-----------------------|-------------------------|
| <b>ABZ-SO (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> |                       |                         |
| 6,00  | 1,35                  | 2,93                    |
| 60,0  | 0,64                  | 0,97                    |
| <b>LVM (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>    |                       |                         |
| 0,08  | 6,60                  | 6,48                    |
| 0,60  | 6,00                  | 8,89                    |

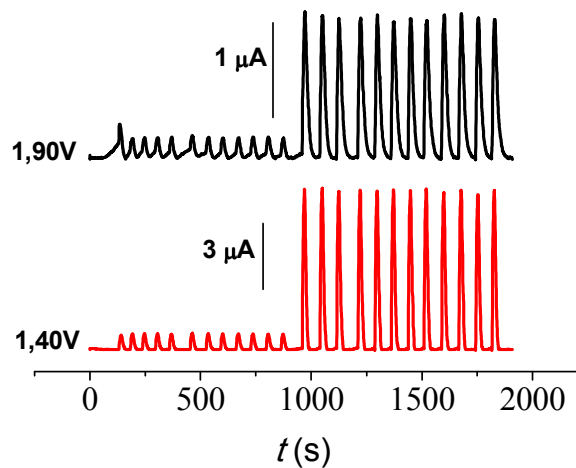
\* $n = 10$  ; \*\* $n = 3$ 

FIGURA 4.30 – Amperogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT em soluções de ABZ-SO + LVM em duas concentrações diferentes de ABZ-SO ( $6,00$  e  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (—) e LVM ( $0,08$  e  $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (—) ( $n = 10$ ). Eletrólito suporte /solução carregadora:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Para investigar a seletividade do método proposto, o comportamento amperométrico da mistura de ambos os compostos na presença de uréia, composto presente em urina, foram estudados.

As razões de concentrações entre o analito e os interferentes estudados foram de 1:1 e 1:10 (ABZ-SO/LVM : interferente). Com base nos resultados obtidos (não mostrados), foi possível concluir que a uréia, principal substância contida na urina, não interferiu de forma significativa na determinação de ABZ-SO e LVM ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), uma vez que a percentagem das interferências obtidas foram menores do que  $\pm 10\%$ .

Foram analisadas duas amostras de urina sintética dopadas com ABZ-SO e LVM em diferentes concentrações e os resultados obtidos para as recuperações de cada analito são mostrados na TABELA 4.10. Como pode ser observado, o procedimento FIA-MPA desenvolvido empregando-se o eletrodo de BDD-APT apresentou valores de recuperações bastante satisfatórios para ambos os analitos, indicando que não há interferência significativa da matriz da amostra e que o método proposto pode ser aplicado na determinação de amostras de urina.

Adicionalmente, considerando-se os intervalos lineares de concentrações das curvas analíticas obtidos e as concentrações destes compostos normalmente encontrados na urina é possível determinar ambos analitos simultaneamente nesta matriz biológica.

---

TABELA 4.10 – Estudos de adição e recuperação de ABZ-SO e LVM em amostras de urina sintética

| <b>FIA-MPA</b> |                          |  |   |                        |
|----------------|--------------------------|--|---|------------------------|
| <b>Analito</b> | <b>Amostras de urina</b> | <b>Adicionada (mol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Encontrada* (mol L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
| ABZ-SO         | a                        | $6,0 \times 10^{-6}$                   | $(5,9 \pm 0,3) \times 10^{-6}$          | 98,3                   |
| LVM            | a                        | $1,5 \times 10^{-7}$                   | $(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-7}$          | 100                    |
| ABZ-SO         | b                        | $3,0 \times 10^{-5}$                   | $(2,8 \pm 0,0) \times 10^{-5}$          | 93,3                   |
| LVM            | b                        | $6,0 \times 10^{-7}$                   | $(5,9 \pm 0,3) \times 10^{-7}$          | 98,3                   |

\*n= 3

## 4.2 – Determinação de anti-hipertensivos

Nesta parte do trabalho propôs-se um método para a determinação simultânea de dois anti-hipertensivos HTZ e ENP utilizando-se um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (FIA-MPA) empregando-se um eletrodo de BDD-CPT.

### 4.2.1 – Investigação do comportamento eletroquímico do HTZ e ENP e estudo do efeito de diferentes pré-tratamentos eletroquímicos aplicados ao eletrodo de BDD

Inicialmente foram realizados experimentos de CV a fim de avaliar o comportamento eletroquímico do ENP e HTZ sobre eletrodo de BDD. Os resultados experimentais obtidos são apresentados na FIGURA 4.31 e mostraram que a HTZ e o ENP apresentaram resposta eletroativa no sentido positivo de varredura de potencial (oxidação) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>.

Foi encontrado na literatura apenas um artigo descrevendo-se um método eletroanalítico para a determinação de ENP. Neste trabalho, GUSAKOVA e IVANOVSKAYA<sup>83</sup>, determinaram ENP em soro sanguíneo por voltametria de redissolução anódica utilizando um eletrodo de filme de mercúrio. O ENP apresentou um pico de oxidação próximo a  $-0,90$  V após uma etapa de pré-concentração por 5 min. No entanto, este pico de oxidação para o ENP não foi observado empregando-se o eletrodo de BDD.

No caso da HTZ encontram-se na literatura alguns trabalhos que relatam seu perfil eletroquímico e a sua determinação individual, utilizando-se técnicas eletroanalíticas<sup>85,86</sup>.

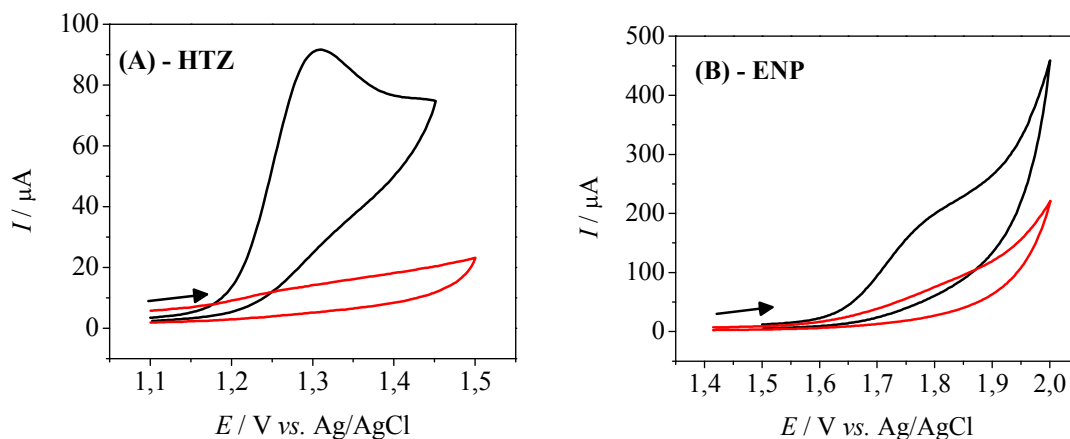


FIGURA 4.31 – Voltamogramas cíclicos (—) obtidos para (A) HTZ  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (—) voltamogramas para a solução do branco ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Como pode ser observado na FIGURA 4.31 A, a HTZ apresenta pico de oxidação próximo a  $1,30$  V e na FIGURA 4.31 B nota-se que o ENP apresenta um potencial de oxidação elevado ( $> 1,70$  V) e consequentemente possui uma corrente de fundo também elevada, obtendo-se deste modo, pico de oxidação com baixa definição. Desta maneira, para melhor comparar os resultados dos estudos com relação ao pré-tratamento, ao eletrólito suporte, utilizou-se a SWV para ambos os analitos.

### 4.2.1.1 – Pré-tratamento eletroquímico

Com o objetivo de avaliar a melhora ou não da resposta voltamétrica do eletrodo de BDD no processo de oxidação da HTZ e do ENP, optou-se por realizar um estudo dos diferentes pré-tratamento (anódico e catódico) do eletrodo de BDD (como descrito na seção 3.3.1). Como pode ser observado na FIGURA 4.32, o tratamento catódico proporcionou um pequeno aumento da magnitude de corrente de pico para ambos os analitos. Assim, nos estudos futuros, foram realizados pré-tratamentos catódicos no eletrodo, previamente as medidas voltamétricas/amperométricas.

Após a seleção do melhor pré-tratamento do eletrodo de BDD, todos os dias eram feitos, antes das determinações voltamétricas, o seguinte pré-tratamento do eletrodo BDD. Inicialmente era realizado o pré-tratamento anódico, objetivando-se limpar o eletrodo por oxidação dos compostos adsorvidos na sua superfície e, em seguida, era realizado o tratamento catódico para condicionar a superfície do mesmo.

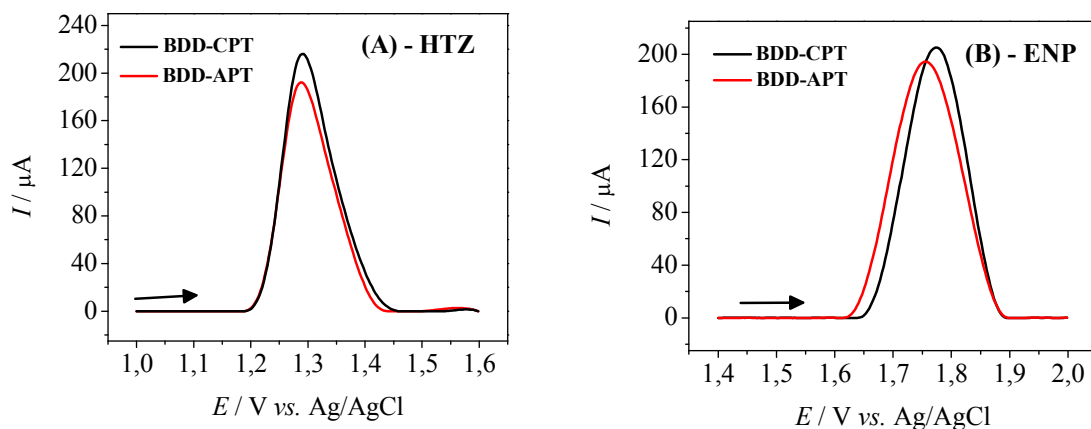


FIGURA 4.32 – Voltamogramas de onda quadrada para (A) HTZ  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  empregando-se o eletrodo de BDD-CPT (—) e BDD-APT (—),  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

#### 4.2.1.2 –Efeito do eletrólito suporte

Experimentos iniciais para HTZ e ENP foram realizados em diferentes eletrólitos suporte como tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 1,80),  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}_{\text{cond}} = 1,30$ ) e nitrato de potássio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,00, ajustado com ácido nítrico).

Os voltamogramas obtidos para HTZ e ENP nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na FIGURA 4.33 (A) e (B). A melhor resposta obtida quanto à definição de pico e intensidade de corrente de pico para a HTZ foi em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e para o ENP o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  não apresentou a melhor intensidade de sinal, porém apresentou a melhor definição de pico (pico menos alargado), sendo assim selecionado como eletrólito suporte.

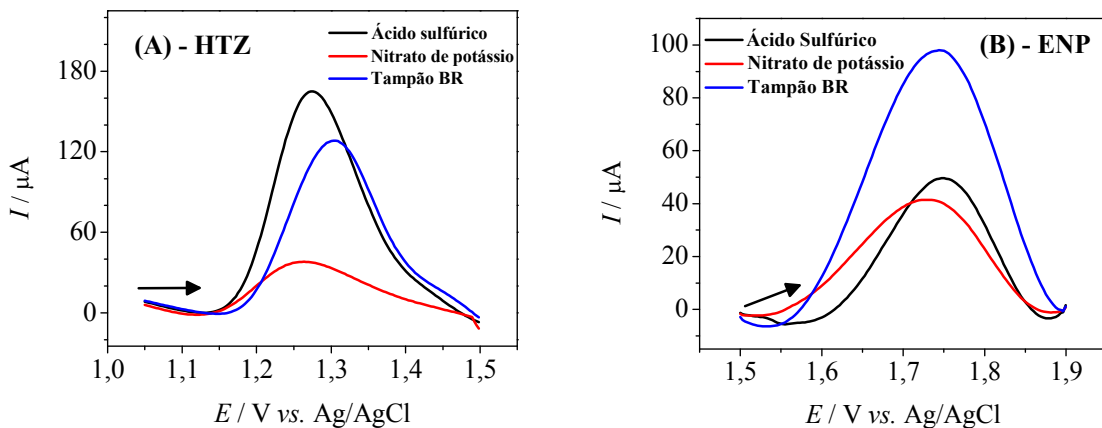


FIGURA 4.33 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de (A) HTZ  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) ENP  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  em diferentes eletrólitos suporte,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (—), nitrato de potássio (—) e tampão BR (—) ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

Em seguida, estudou-se a influência da concentração do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sobre o sinal de corrente de ambos os analitos. Na FIGURA 4.34 (A) e (B) são

apresentados os resultados obtidos para cada um dos analitos em diferentes concentrações de eletrólito suporte que variou entre 0,05 e 0,50 mol L<sup>-1</sup>.

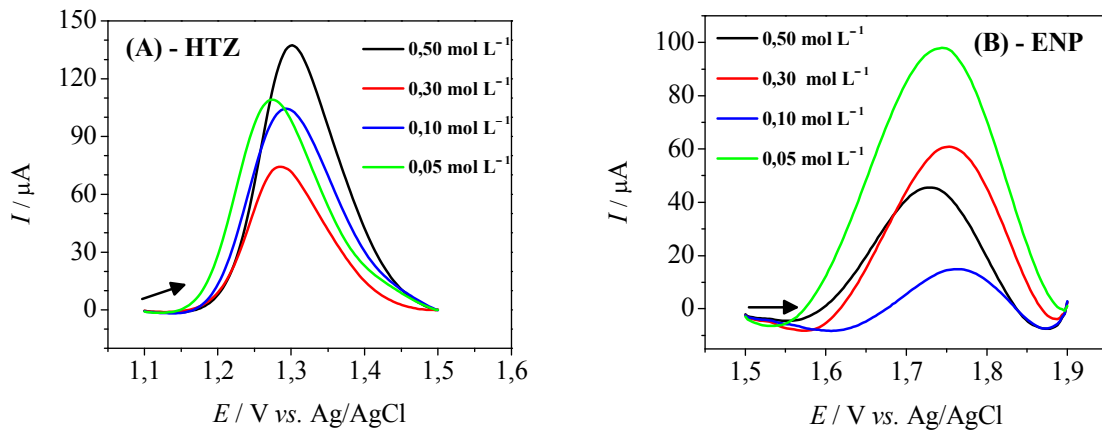


FIGURA 4.34 – Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de HTZ 0,50 mmol L<sup>-1</sup> (A) e ENP 0,50 mmol L<sup>-1</sup> (B) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com diferentes concentrações, 0,50 mol L<sup>-1</sup> (—); 0,30 mol L<sup>-1</sup> (—); 0,10 mol L<sup>-1</sup> (—) e 0,05 mol L<sup>-1</sup> (—); ( $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ ).

Analisando-se os dados da FIGURA 4.34 o HTZ apresentou melhor resposta em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 mol L<sup>-1</sup>, porém o ENP apresentou melhor resposta em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Como a resposta da HTZ em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> também apresentou um bom perfil voltamétrico e alta intensidade de corrente, optou-se por utilizar o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> nos estudos futuros.

#### 4.2.2 – Mecanismo de oxidação do HTZ sobre o eletrodo de BDD-CPT

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na determinação do número de elétrons envolvidos na reação de eletro-oxidação do HTZ e o efeito da velocidade de varredura de potencial da CV, empregando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte, e BDD-CPT como eletrodo de trabalho. A



partir dos resultados obtidos o mecanismo de oxidação da molécula de HTZ foi apresentado.

#### 4.2.2.1 – Voltametria cíclica

Um estudo utilizando-se a CV foi realizado em diferentes velocidades de varredura: 10 a 500  $\text{mV s}^{-1}$ , empregando-se o eletrodo de BDD em solução padrão de HTZ  $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e eletrólito suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , FIGURA 4.35 (A).

Utilizando-se os dados de CV em diferentes velocidades de varredura, construiu-se um gráfico com os valores do logaritmo da variação da intensidade de pico ( $\log I_p$ ) vs. o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log v$ ), FIGURA 4.35 (B).

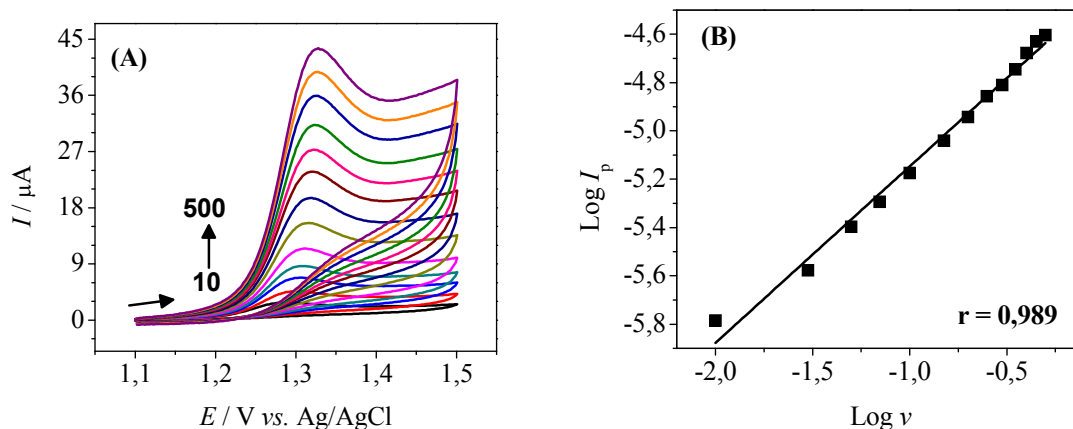


FIGURA 4.35 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-CPT solução de HTZ  $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura: 10; 30; 50; 70; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 e 500  $\text{mVs}^{-1}$ . (B) Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura para a HTZ.

Verificou-se com os dados obtidos, que há uma relação linear entre  $\log I_p$  e  $\log v$  com um coeficiente angular da reta de 0,73 (FIGURA 4.35) (Eq. da reta:  $\text{Log } I_p = -4,4 + 0,73 \text{ Log } v$ ). De acordo com a literatura<sup>131,140</sup> este valor

indica que o processo de oxidação da HTZ na superfície do BDD-CPT pode ser controlado tanto por difusão das espécies, quanto por adsorção, uma vez que o valor obtido (0,73) está entre 0,50 (controlado por difusão) e 1,0 ( controlado por adsorção).

Desta maneira, analisou-se a linearidade entre a relação da corrente de pico ( $I_p$ ) e velocidade de varredura ( $v$ ) e entre corrente de pico ( $I_p$ ) e raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ).

É possível observar na FIGURA 4.36 que para a relação  $I_p$  vs.  $v$  a resposta foi linear e para a relação  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  a resposta não foi linear. De acordo com as teorias de CV, os sistemas são controlados por difusão quando a relação  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  é linear e os sistemas são controlados por adsorção, quando a relação  $I_p$  vs.  $v$  é linear.

Assim, os dados obtidos indicam que o processo da HTZ é controlado por adsorção na superfície do BDD-CPT. Estes resultados foram diferentes dos obtidos por RAZAK<sup>85</sup> utilizando um eletrodo de carbono vítreo e por REZAEI et al.<sup>86</sup> utilizando um eletrodo carbono modificado com nanotubos de carbono onde a HTZ apresentou processo controlado por difusão.

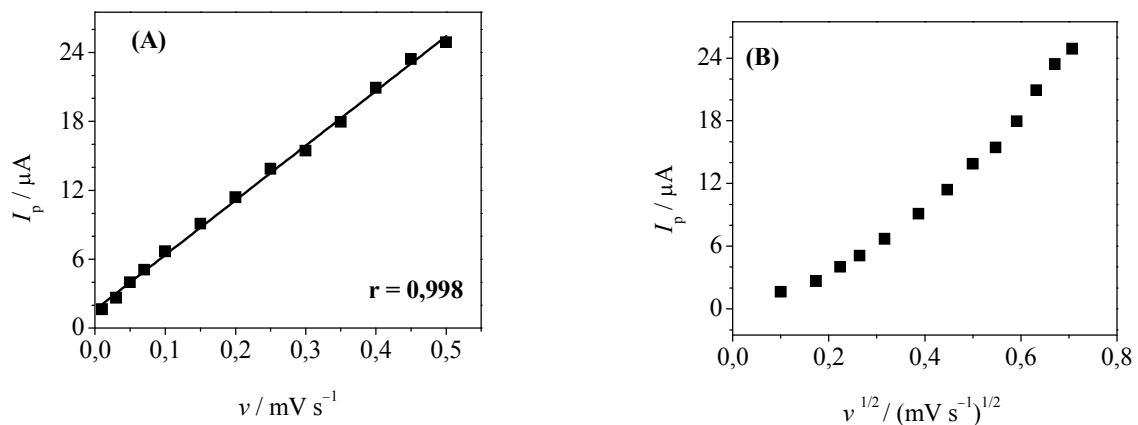


FIGURA 4.36 – (A) Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura para o LVM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e (B) Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para o LVM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$

De acordo com a teoria de CV, como discutido anteriormente, para sistemas irreversíveis<sup>132</sup>, o número de elétrons na oxidação da HTZ pode ser determinado utilizando-se a Equação 4.1 (citada anteriormente):

Observou-se uma relação linear para  $E_p$  vs.  $\log v$  para as velocidades de varredura entre 10 e 150  $\text{mV s}^{-1}$  para ambos os picos com coeficiente angular igual a 27,5 mV.

Assim, a partir do coeficiente obtido no gráfico de  $E_p$  vs.  $\log v$  (não apresentado), o valor de  $an$  foi calculado obtendo-se um valor de 1,09.

Desta maneira, usando estas informações, assumindo que  $\alpha$  é igual a 0,5 (valor médio normalmente assumido quando não se tem o valor calculado experimentalmente<sup>144</sup>) e utilizando-se a Equação 4.1, o número de elétrons para a oxidação da HTZ foi calculado sendo igual a 2 elétrons.

#### 4.2.2.2 – Eletrólise em potencial controlado

A eletrólise da HTZ ( $147,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi estudada aplicando-se um potencial de 1,50 V durante 2400 s. Após a finalização do experimento, a carga registrada foi de 0,205 mC e, utilizando-se a SWV foi possível calcular a variação do número de mols de HTZ ( $\Delta N$ ) presentes no início e no final da eletrólise. Essa variação do número de mols foi calculada como apresentado na seção 4.1.1.2, sendo  $\Delta N$  igual a  $1,35 \mu\text{mols}$ .

Desta maneira, o valor de  $n$  (número de elétrons) foi calculado utilizando-se a equação de Faraday (Equação 4.2) apresentada anteriormente. O valores de  $\Delta N$  ( $1,35 \mu\text{mols}$ ), de  $Q$  (0,205 mC) e de  $F$  foram substituídos na Equação 4.2 e o número de elétrons envolvidos na eletro-oxidação da HTZ sobre a superfície do BDD-CPT foi igual a 1,85, indicando assim que a oxidação da HTZ envolve a transferência de dois elétrons por molécula.

Nos estudos realizados utilizando-se a eletrólise e a CV, conclui-se que a oxidação da HTZ sobre o eletrodo de BDD-CPT em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$

envolve a transferência de dois elétrons por molécula oxidada, FIGURA 4.37. Este resultado é concordante com o mecanismo proposto por RAZAK<sup>85</sup> no estudo da eletro-oxidação da HTZ em eletrodo de carbono vítreo.

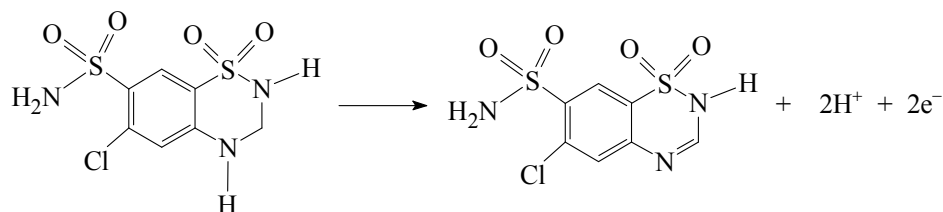


FIGURA 4.37 – Mecanismo de oxidação da HTZ na superfície do BDD-CPT em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como nas medidas de eletrólise do ENP, houve a adsorção deste analito na superfície do eletrodo de BDD, não foi possível calcular o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação, não sendo aqui proposto um mecanismo de oxidação para o mesmo. Porém, cabe aqui ressaltar que igualmente a IVM, a adsorção do ENP não foi observada nas medidas utilizando-se a detecção amperométrica acoplada ao sistema FIA, permitindo assim, a determinação do ENP satisfatoriamente, como serão apresentados a seguir.

### 4.2.3 – Determinação amperométrica de HTZ e ENP e aplicação do método proposto na determinação de amostras farmacêuticas

#### 4.2.3.1 – Otimização dos parâmetros do sistema FIA-MPA

Após os estudos realizados anteriormente de CV, fez-se o estudo da variação do potencial aplicado em relação a intensidade de sinal analítico obtido para a oxidação de ambos analitos, empregando-se a técnica amperométrica,

considerando-se os estudos iniciais para a HTZ e ENP os quais apresentaram picos de oxidação próximos a 1,30V e 1,75V, respectivamente.

Os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos são apresentados na FIGURA 4.38, na qual observa-se que há um aumento de intensidade de sinal com o aumento do potencial para ambos os analitos, porém, em valores acima de 1,50 V ocorre a oxidação tanto do HTZ quanto do ENP e, em valores acima de 1,80 V, há deformação do sinal analítico para o ENP. Portanto, para que fosse possível a determinação simultânea de HTZ e ENP foram empregados os potenciais de 1,50 e 1,80 V, respectivamente, para desenvolvimento do trabalho.

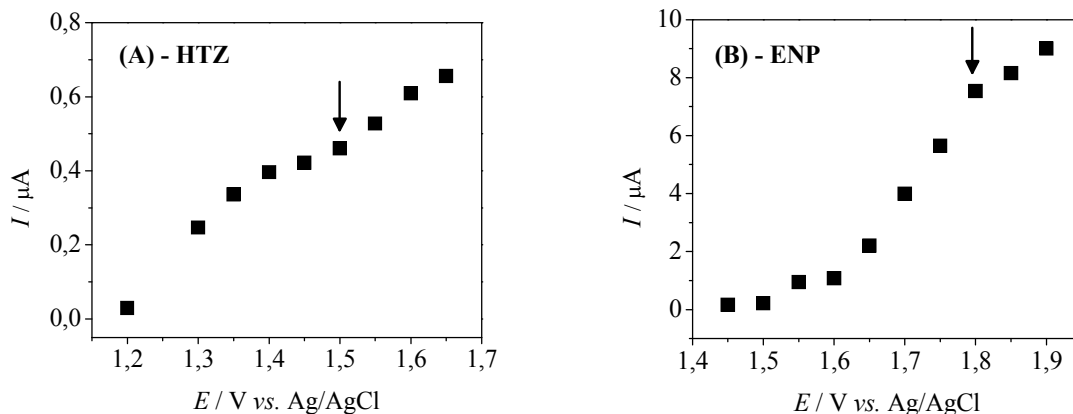


FIGURA 4.38 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para uma concentração de  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de (A) HTZ e (B) para uma concentração de  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ENP. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , volume de injeção =  $350 \mu\text{L}$  e vazão =  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Após otimizar os potenciais de trabalho em 1,50 V e 1,80V, avaliou-se o efeito dos tempos de aplicação destes pulsos de potenciais, que como já mencionado anteriormente, é um parâmetro da técnica de MPA. Desta maneira, esses dois pulsos de potenciais foram aplicados variando-se o tempo de aplicação de 100 a 400 ms.

Os gráficos da amplitude de corrente em função do tempo de aplicação do pulso de potencial são apresentados na FIGURA 4.39. Observa-se

que tanto para o HTZ quanto para o ENP a amplitude de sinal diminuiu significativamente com o aumento do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais.

Como na técnica de MPA, o tempo de obtenção de um amperograma é proporcional ao tempo de aplicação dos pulsos de potencial; baixos tempos proporcionam pouco tempo de análise, impossibilitando a construção de uma curva analítica e análise das amostras em um mesmo amperograma. Desta maneira, optou-se por utilizar o tempo de aplicação de pulso de 150 ms para ambos os compostos, uma vez que utilizando-se o tempo de 100 ms, tempo que apresentou melhor intensidade de sinal analítico para ambos os compostos, o tempo de análise não seria suficiente.

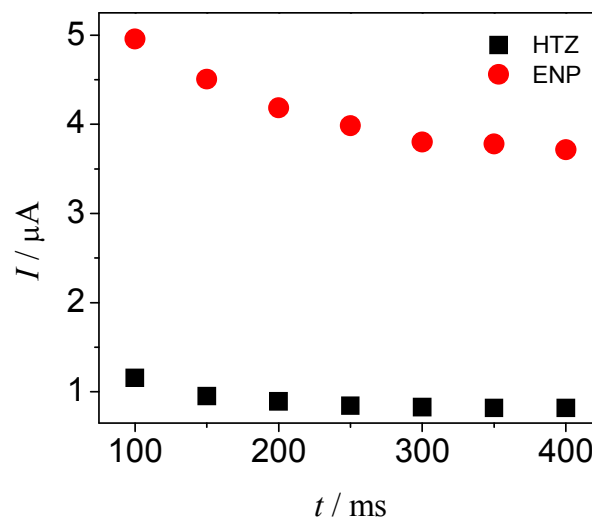


FIGURA 4.39 – Intensidades dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais: (■) HTZ  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial  $1,50 \text{ V}$  e (●) ENP  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pulso de potencial:  $1,80 \text{ V}$ . Eletrólito suporte/solução carregadora  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como a proposta nesta parte do trabalho é a determinação simultânea de HTZ e ENP, nos estudos da vazão do sistema e do volume da alça de amostragem, que serão apresentados a seguir, os analitos foram avaliados concomitantemente utilizando-se MPA.

Avaliou-se como a vazão da solução carregadora afeta a magnitude do sinal de corrente obtido para as soluções padrões de HTZ  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ENP  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . As vazões estudadas variaram entre  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$  e  $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ , FIGURA 4.40.

Observando-se a FIGURA 4.40, nota-se um crescente aumento da intensidade do sinal de corrente até  $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Como a proposta do método de análise por injeção em fluxo é alta frequência analítica e com baixo consumo de reagente, escolheu-se o valor de  $4,5 \text{ mL min}^{-1}$  como máxima vazão para minimizar o gasto de reagentes, desta forma esta vazão foi selecionada para os próximos estudos.

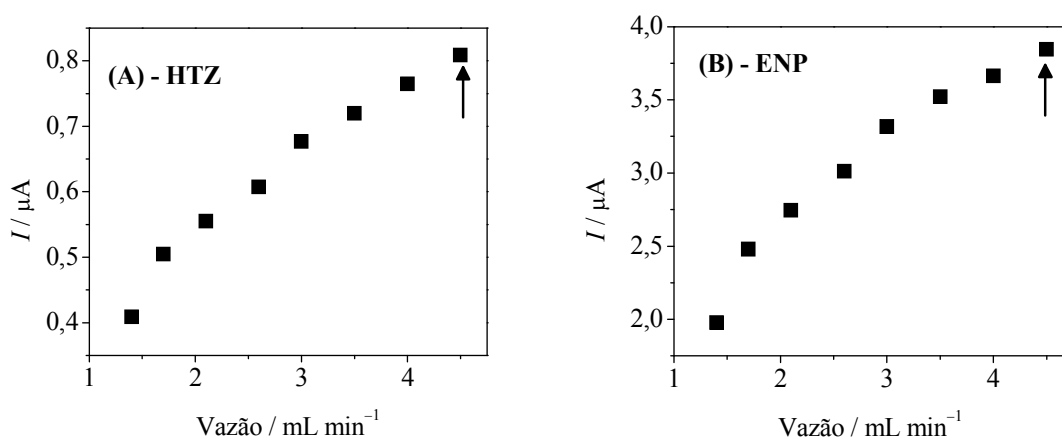


FIGURA 4.40 – Intensidades dos sinais de corrente em função da vazão do eletrólito suporte/solução carregadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) para (A) HTZ  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) ENP  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Foi avaliado para o sistema FIA-MPA a intensidade do sinal de corrente em função do volume da alça de amostragem, para soluções padrões de HTZ  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ENP  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 4.41, observa-se um aumento do sinal analítico até um volume da alça de amostragem de  $350 \mu\text{L}$  para ambos os analitos e, após este volume, o sinal analítico permanece praticamente constante, sendo este o valor selecionado para o desenvolvimento do trabalho.

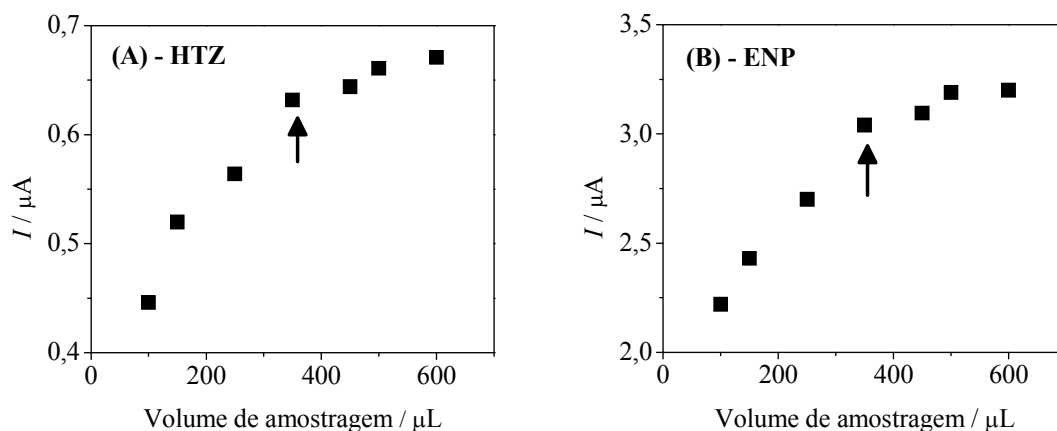


FIGURA 4.41 – Intensidades dos sinais de corrente de HTZ 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e ENP 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (B) em função do volume da alça de amostragem: 100 a 600  $\mu\text{L}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ .

#### 4.2.3.2 – Comportamento amperométrico da HTZ e ENP frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial

Após a escolha dos potenciais de trabalho, dos tempos de aplicação dos pulsos e da otimização dos parâmetros do sistema FIA, foi realizada a aplicação de uma sequência dos dois pulsos de potencial (1,50 e 1,80 V) escolhidos em função do tempo para soluções padrões de HTZ e ENP a fim de avaliar o método e se há alguma interferência de um analito sobre o outro.

Na FIGURA 4.42 são apresentados os amperogramas obtidos para este estudo e a sequência de aplicação dos dois pulsos, nos quais:

1.  $E_{\text{det.1}} = +1,50\text{V} / 150 \text{ ms}$ : pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas do HTZ;
2.  $E_{\text{det.2}} = +1,80\text{V} / 150 \text{ ms}$ : pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (HTZ e ENP).



As soluções foram injetadas em triplicata na ordem: HTZ 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ENP 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e mistura das soluções de HTZ + ENP nas mesmas concentrações.

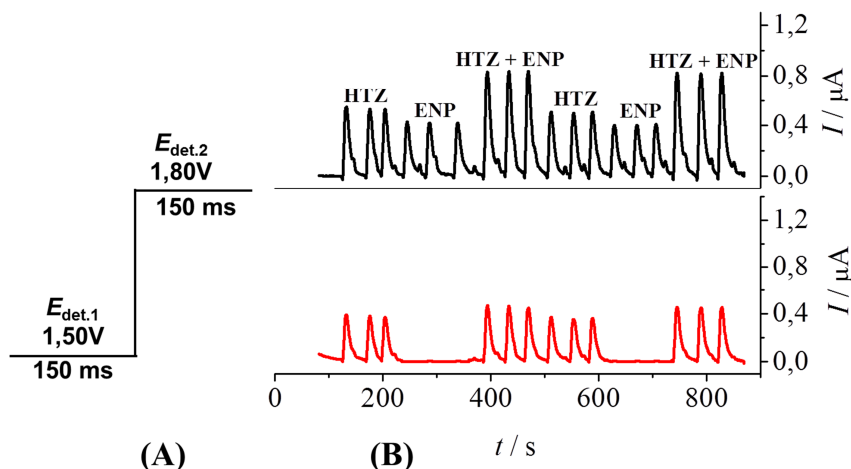


FIGURA 4.42 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo. (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD e soluções de HTZ 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , ENP 5,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e HTZ + ENP nas mesmas concentrações. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 4,5  $\text{mL min}^{-1}$ .

Pode-se observar na FIGURA 4.42, que em  $E_{\text{det.1}}$  (1,50 V) a corrente aumenta apenas ao injetar as soluções contendo apenas HTZ ou a mistura (HTZ + ENP), assim, em ambos os casos o sinal de corrente obtido está relacionado somente com a oxidação da HTZ. Porém, em  $E_{\text{det.2}}$  (1,80 V) a corrente aumenta ao injetar soluções contendo somente ENP ou HTZ ou a mistura (HTZ + ENP), indicando que o sinal analítico obtido é devido a oxidação de ambas as espécies.

Desta maneira, o sinal de corrente obtido em  $E_{\text{det.1}}$  é proporcional a concentração apenas de HTZ ( $I_{\text{HTZ}} = I_{E_{\text{det.1}}}$ ) e, o sinal de corrente obtido em  $E_{\text{det.2}}$  é proporcional a soma das concentrações de ambos os analitos (HTZ + ENP). Portanto, a quantificação de HTZ pode ser feita de forma direta em  $E_{\text{det.1}}$ , e de forma indireta para ENP em  $E_{\text{det.2}}$ , sendo apenas necessário a subtração das

correntes ( $I_{ENP} = I_{E_{det.2}} - I_{E_{det.1}}$ ) para se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de ENP.

No entanto, a amplitude de corrente obtida em  $E_{det.1}$  para a HTZ não é igual a magnitude de corrente obtida para a mesma concentração de HTZ em  $E_{det.2}$ , uma vez que o sinal analítico deste analito continua aumentando entre os dois potenciais aplicados, como discutido anteriormente.

Assim, a diferença entre estes sinais de corrente pode ser quantificada empregando-se um fator de correção, dividindo-se o valor de corrente obtido para uma solução de HTZ em 1,80 V pela corrente obtida em 1,50 V, ou seja:

$$\text{Fator de correção (FC)} = I_{HTZ\ 1,80V} / I_{HTZ\ 1,50V}$$

O FC foi calculado para as diferentes concentrações da curva analítica e a média dos valores encontrados para baixas concentrações (0,20 a 0,90  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi de  $1,94 \pm 0,59$  e para concentrações maiores (2,00 a 8,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi de  $1,08 \pm 0,02$

Na TABELA 4.11 são apresentados a variação do FC para diferentes concentrações de HTZ e a média destes valores.

TABELA 4.11 – Variação do FC em função da concentração de ABZ-SO e a média entre os valores

| Concentração de HTZ<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | FC   | Média do FC     |
|---|------|-----------------|
| 0,20  | 2,61 | $1,94 \pm 0,59$ |
| 0,60  | 1,74 |                 |
| 0,90  | 1,47 |                 |
| 2,00  | 1,10 | $1,08 \pm 0,02$ |
| 4,00  | 1,07 |                 |
| 6,00  | 1,07 |                 |
| 8,00  | 1,07 |                 |

Porém, considerando-se o fator de correção para valores de concentrações mais altos, o valor não foi significativo (variação  $\leq 8\%$ ), não sendo utilizado neste caso o fator de correção, uma vez que as amostras estudadas estão em concentrações mais elevadas.

Em seguida, realizou-se um experimento com sucessivas injeções de soluções padrões de HTZ + ENP em concentrações crescentes e decrescentes. São apresentados na FIGURA 4.43 os amperogramas obtidos para as sucessivas injeções da mistura e as respectivas curvas analíticas obtidas, as quais apresentaram linearidades de 0,40 a 8,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o HTZ e de 0,03 a 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o ENP.

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade e as seguintes equações:

$$I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = 0,0126 + 0,0743 ([\text{HTZ}] \mu\text{mol L}^{-1}); r = 0,9988$$

$$I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = 0,0305 + 0,585 ([\text{ENP}] \mu\text{mol L}^{-1}); r = 0,9962$$

---

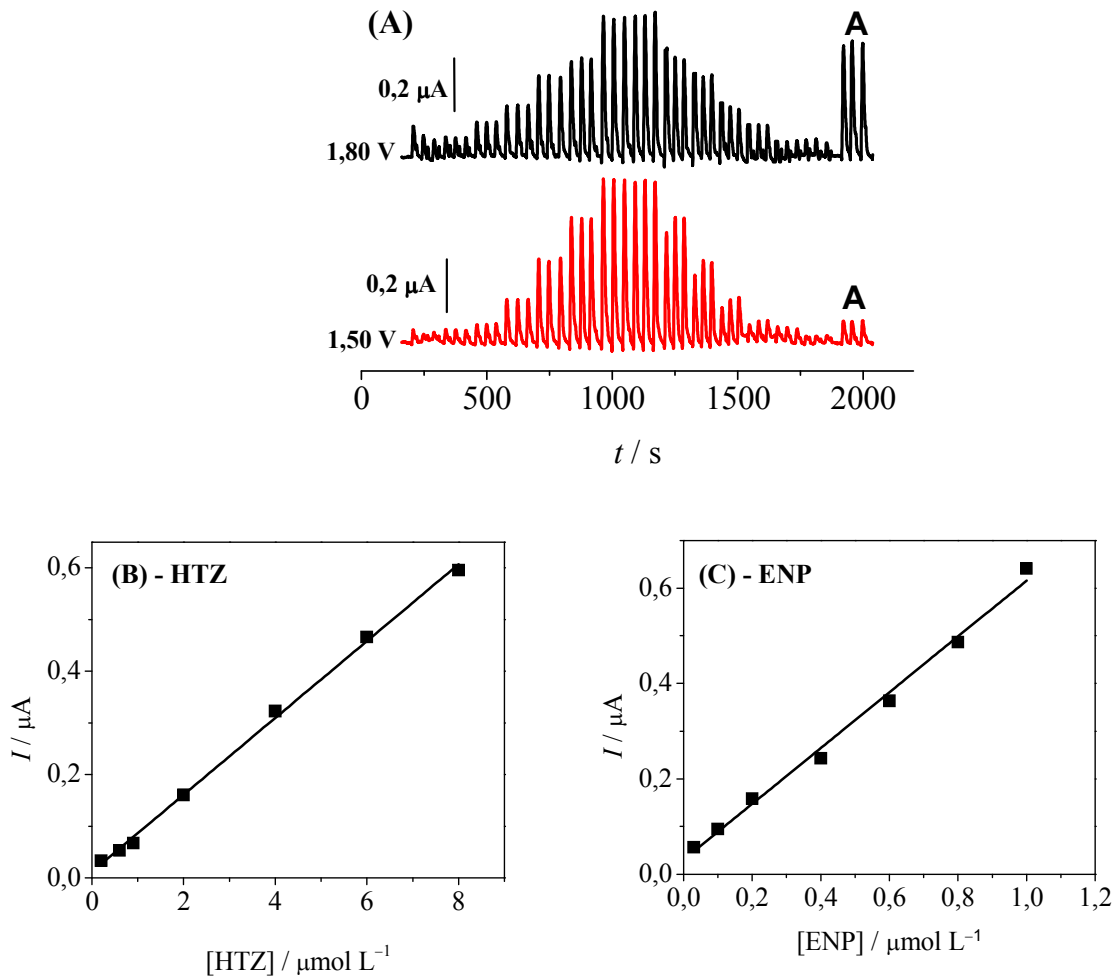


FIGURA 4.43 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-APT em diferentes concentrações de uma mistura de (–) HTZ e (–) ENP. Concentrações de HTZ: 0,40; 0,60; 0,90; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ENP: 0,03; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; e 1,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) curva analítica obtida para o HTZ e (C) curva analítica obtida para o ENP. Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 4,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Os sinais obtidos em A correspondem a uma amostra analisada.

Os LDs foram calculados como 3 vezes o sinal ruído (3 S/N). Desta maneira os LDs obtidos para HTZ e ENP foram de 0,20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Calculou-se a frequência analítica do método nas condições anteriormente apresentadas obtendo-se um valor de 89 determinações por hora.

A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ( $n = 10$ ), para soluções padrões de HTZ + ENP em duas diferentes concentrações (FIGURA 4.44). Para o estudo da repetibilidade inter-dias foram feitas medidas em três diferentes dias ( $n = 3$ ). Os RSDs obtidos nos dois estudos são apresentados na TABELA 4.12.

Os valores obtidos nestes estudos foram satisfatórios, apresentando desvios menores que 4,45 %, indicando uma boa repetibilidade do procedimento desenvolvido.

TABELA 4.12 – Resultados obtidos para os estudos de repetibilidade intra e inter-dias de HTZ e ENP

| <b>Repetibilidade</b>                          | <b>Intra-dia<br/>(RSD %)*</b> | <b>Inter-dias<br/>(RSD %)**</b> |
|--|-------------------------------|---------------------------------|
| <b>HTZ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> |                               |                                 |
| 0,90   | 2,98                          | 2,76                            |
| 6,00   | 1,31                          | 1,40                            |
| <b>ENP (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b> |                               |                                 |
| 0,20   | 4,42                          | 4,01                            |
| 0,80   | 0,97                          | 0,71                            |

\* $n = 10$  ; \*\* $n = 3$

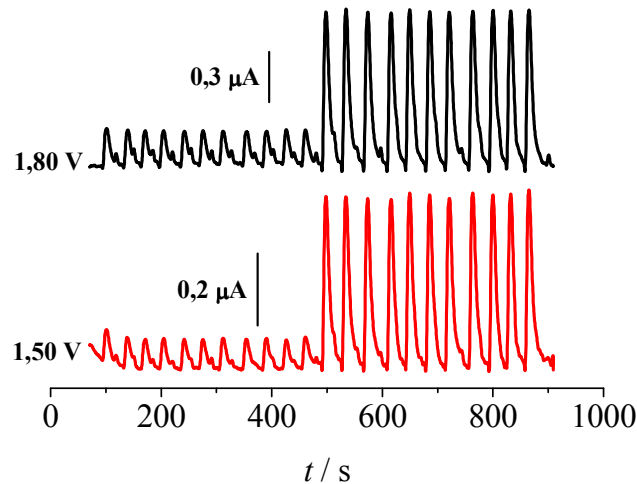


FIGURA 4.44 – Amperogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD-CPT em soluções de HTZ + ENP em duas concentrações diferentes HTZ (0,90 e 6,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (—) e ENP (0,20 e 0,80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (—) ( $n = 10$ ). Eletrólito suporte/solução carregadora =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , volume de injeção = 350  $\mu\text{L}$  e vazão = 3,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

Para investigar a seletividade do método proposto, o comportamento amperométrico dos dois analitos (HTZ e ENP 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), na presença de diversas substâncias geralmente presente nas formulações farmacêuticas foram estudadas. As razões entre as concentrações de analito:interferente estudadas foram de 1:1 e 1:10. Com base nos resultados obtidos (não apresentados), foi possível concluir que essas substâncias não interferem de forma significativa na determinação de ambos os analitos, uma vez que os valores em percentagem das interferências obtidas foram menores do que  $\pm 10\%$ .

#### **4.2.3.3 – Método comparativo – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).**

Para avaliar o desempenho do procedimento eletroanalítico desenvolvido empregando-se MPA- FIA na determinação de HTZ e ENP, foi adotado como método comparativo, a cromatografia líquida de alta eficiência<sup>125</sup>. Nas condições cromatográficas empregadas de acordo como descrito na parte experimental as moléculas de ENP e HTZ apresentaram tempos de retenção de aproximadamente 4,7 e 5,7 minutos, respectivamente. O cromatograma para o ENP e HTZ em  $\lambda$  de 210 nm e fase móvel: acetonitrila/metanol/tampão trietilamônio fosfato pH 2,5 (50/25/25, v/v/v) é apresentado na FIGURA 4.45 (A). As respectivas curvas analíticas nos intervalos de concentrações de 6,00 a 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  são apresentadas na FIGURA 4.45 (B) e (C).

---

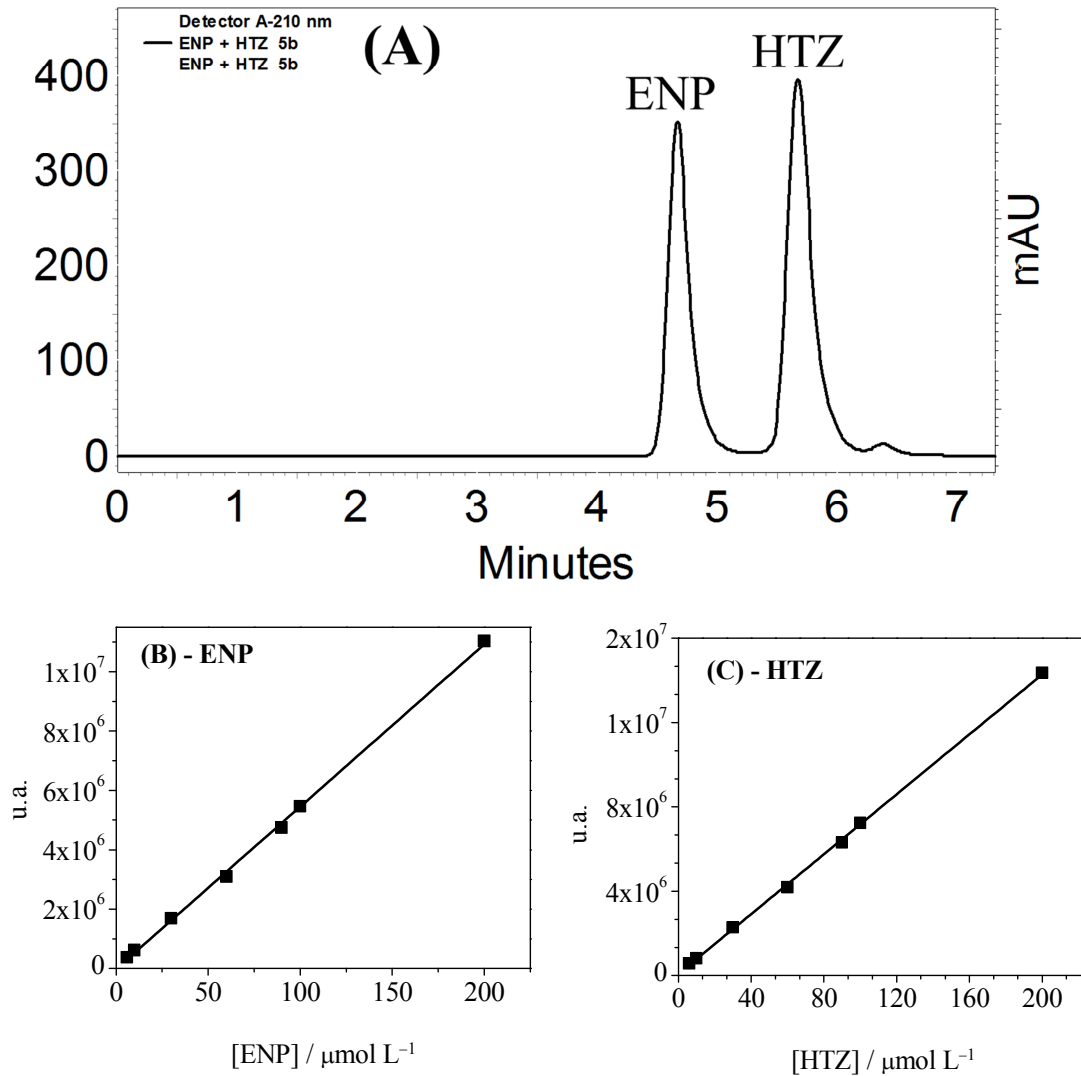


FIGURA 4.45 – (A) Cromatograma obtido para o ENP e HTZ 90,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) e (C) As respectivas curvas analíticas obtidas em unidades de área para HTZ e ENP. Concentrações das curvas analíticas: 6,00; 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 100,0; 200,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/metanol/tampão trietilamônio fosfato pH 2,5 (50/25/25, v/v/v) (eluição isocrática), vazão= 0,3  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção= 20  $\mu\text{L}$  e o  $\lambda$  de 210 nm.

As equações das curvas obtidas foram:

$$A(\text{u.a.}) = -1,96 \times 10^4 + 5,47 \times 10^{10} [\text{ENP} / (\text{mol L}^{-1})]; (r = 0,9989)$$

$$A(\text{u.a.}) = 7,19 \times 10^4 + 7,10 \times 10^{10} [\text{HTZ} / (\text{mol L}^{-1})]; (r = 0,9989)$$



Todas as amostras analisadas empregando-se o procedimento proposto também foram analisadas empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência.

Finalmente, a fim de avaliar o procedimento desenvolvido, empregando-se o eletrodo de BDD-CPT e FIA-MPA para a determinação simultânea de HTZ e ENP, foram analisadas três amostras farmacêuticas comerciais contendo os dois analitos.

Na FIGURA 4.43, apresentada anteriormente, também são mostrados em A os sinais transientes obtidos com injeções em triplicata para uma amostra farmacêutica.

Os resultados obtidos na análise dessas amostras foram comparados com os resultados obtidos utilizando-se o método comparativo de HPLC e estão apresentados na TABELA 4.13. Para cada amostra calculou-se o desvio padrão de três injeções e os teores de HTZ e ENP em cada amostra foram determinadas por interpolação nas respectivas curvas analíticas obtidas anteriormente.

TABELA 4.13 – Teores de HTZ e ENP obtidos empregando-se o método proposto e o método comparativo (HPLC)

| Amostras | HTZ             |          | ENP             |          |                    |                    |
|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|--------------------|--------------------|
|          | (mg/comprimido) |          | (mg/comprimido) |          |                    |                    |
|          | HPLC            | FIA-MPA  | HPLC            | FIA-MPA  | E <sub>1</sub> (%) | E <sub>2</sub> (%) |
| A        | 11,6±0,0        | 11,1±0,4 | 18,3±0,8        | 18,4±0,0 | -4,3               | 0,55               |
| B        | 14,3±0,3        | 15,2±0,7 | 20,9±0,7        | 20,4±0,4 | 6,3                | -2,4               |
| C        | 21,5±0,4        | 22,0±0,8 | 7,7±0,2         | 8,4±0,1  | 2,3                | 9,1                |

n = 3

Média do erro =  $100 \times [(\text{valor voltamétrico} - \text{valor de referência}) / \text{valor de referência}]$

Como pode ser observado na TABELA 4.13, os resultados obtidos empregando-se o método MPA- FIA estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método cromatográfico comparativo. Aplicou-se o teste  $t$ -pareado para verificar a concordância dos resultados obtidos e os valores de  $t$  obtidos,  $t_{\text{experimental}} = 2,00$  para HTZ e  $t_{\text{experimental}} = 2,43$  para ENP, foram inferiores ao valor crítico tabelado ( $t_{\text{crítico}} = 4,30$ ,  $\alpha = 0,05$ ), indicando que não há diferença significativa entre os teores encontrados em um nível de confiança de 95%. Ademais, os erros relativos encontrados estão dentro do aceitável ( $< 10\%$ ).

---

## 5 – CONCLUSÕES

A realização dos diferentes pré-tratamentos, anódico e catódico, na superfície de BDD proporcionaram mudanças no comportamento eletroquímico do eletrodo resultando em mudanças nas respostas voltamétricas obtidas para todos os analitos estudados, tais como mudança nas intensidades de corrente e nos potenciais redox. Estes resultados sugerem que dependendo da terminação (oxigênio ou hidrogênio) da superfície do eletrodo de BDD, haverá uma diferente interação com o analito, proporcionando diferentes respostas analíticas.

Pode-se concluir que o método DPV proposto para a determinação quantitativa de ABZ, pode ser utilizado com vantagens significativas e apresentou resultados concordantes com aqueles obtidos empregando-se o método cromatográfico (comparativo). O LD obtido é significativamente menor que aquele relatado por OLIVEIRA et al.<sup>40</sup> usando DPV e um eletrodo de carbono vítreo e também menor que aquele obtido por MSAGATI et al.<sup>38</sup> empregando-se um eletrodo modificado e SWV.

Os resultados obtidos permitem ainda concluir que o método FIA-amprométrico proposto pode ser utilizado para a determinação quantitativa de IVM e LVM em amostras de formulações farmacêuticas, com resultados concordantes que aqueles obtidos empregando-se os métodos comparativos. Além disso, o método tem a vantagem de ser simples e rápido, com boa precisão e exatidão, além de apresentar também resultados satisfatórios na análise de amostras de urina sintética. Assim, o método proposto pode ser considerado de grande interesse analítico, uma vez que não existe nenhum método eletroanalítico descrito na literatura para a determinação de IVM e há apenas dois métodos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação de LVM.

O eletrodo de BDD-APT e o método FIA-MPA mostraram-se eficazes e com resultados satisfatórios na determinação simultânea de ABZ-SO

---

e LVM em amostras de urina sintética. Ademais, não foram encontrados na literatura procedimentos eletroanalíticos simultânea destes anti-helmínticos.

O método FIA-MPA e o eletrodo de BDD-CPT também se mostrou uma alternativa interessante na determinação de HTZ e ENP, desde que não há métodos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação simultânea destes compostos. Ademais, o método proposto apresentou a possibilidade de detecção simultânea dos dois analitos e com a vantagem de não necessitar de tratamento prévio de amostra ou até mesmo tratamentos quimiométricos dos resultados obtidos

Os procedimentos desenvolvidos empregando a FIA-MPA possuem vantagens relacionadas ao uso do sistema FIA, como por exemplo, menor custo de reagente e maior frequência de amostragem. Além das vantagens apresentadas da técnica FIA-MPA, a utilização do eletrodo de BDD, via de regra, elimina a necessidade da utilização de um potencial para a limpeza do eletrodo, uma vez que uma das características deste eletrodo é a baixa adsorção de moléculas orgânicas.

---

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FOX, R.S.; BARNES, R.D. & RUPPERT, E.E., *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª ed. 2005, Roca: São Paulo. 1160 p.
2. MACEDO, H.S. "Prevalência de Parasitos e Comensais Intestinais em Crianças de Escolas da Rede Pública Municipal de Paracatu (MG)". *Rev. Bras. Anál. Clín.*, **37** (4): 209, 2005.
3. MACEDO, M.D.F.M.; ANDRADE, S.M.S.D.; MARTINS, C.S.; MACEDO, A.R.F.P.; LIMA, L.B.D. & BELÉM, A.C. "Helmintíases em pré-escolares de uma escola pública no município de Manaus, Amazonas, Brasil". *Boletim da Saúde*, **22** (1), 2008.
4. VASCONCELOS, I.A.B.; OLIVEIRA, J.W.; CABRAL, F.R.F.; COUTINHO, H.D.M. & MENEZES, I.R.A. "Prevalência de parasitoses intestinais entre crianças de 4-12 anos no Crato, Estado do Ceará: um problema recorrente de saúde pública". *Acta Scientiarum Health Sciences*, **33** (1): 35, 2011.
5. LUDWIG, K.M.; FREI, F.; ALVARES FILHO, F. & RIBEIRO-PAES, J.T. "Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **32**: 547, 1999.
6. CHIEFFI, P.P. & AMATO NETO, V. "Vermes, verminoses e a saúde pública". *Ciência e Cultura*, **55**: 41, 2003.
7. FONTES, G.; OLIVEIRA, K.K.L.; OLIVEIRA, A.K.L. & ROCHA, E.M.M.D. "Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **36**: 625, 2003.
8. RANA, A.K. & MISRA-BHATTACHARYA, S. "Current drug targets for helminthic diseases". *Parasitol. Res.*, **112** (5): 1819, 2013.
9. BUZZULINI, C., Eficácia Anti-helmíntica Comparativa da Associação Albendazol, Levamisol e Ivermectina à Moxidectina 1% em Ovinos Naturalmente Infectados por Nematódeos Gastrointestinais. Jaboticabal Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias - UNESP, 2006. Dissertação de mestrado, 98 p.
10. MELO, A.C.F.L. & BEVILAQUA, C.M.L. "Resistência anti-helmíntica em nematóides de pequenos ruminantes: uma revisão". *Ciência Animal*, **12** (1): 35, 2002.
11. KAPLAN, R.M. "Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report". *Trends Parasitol.*, **20** (10): 477, 2004.
12. HUTCHINSON, G.W.; DAWSON, K.; FITZGIBBON, C.C. & MARTIN, P.J. "Efficacy of an injectable combination anthelmintic (nitroxynil plus clorsulon plus ivermectin) against early immature *Fasciola hepatica* compared to triclabendazole combination flukicides given orally or topically to cattle". *Vet. Parasitol.*, **162** (3-4): 278, 2009.

13. BONNEAU, S.; MAYNARD, L.; TOMCZUK, K.; KOK, D. & EUN, H.-M. "Anthelmintic efficacies of a tablet formula of ivermectin-praziquantel on horses experimentally infected with three *Strongylus* species". *Parasitol. Res.*, **105** (3): 817, 2009.
  14. BONATO, P.S.; DE OLIVEIRA, A.R.M.; DE SANTANA, F.J.M.; FERNANDES, B.J.D.; LANCHOTE, V.L.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H. & TAKAYANAGUI, O.M. "Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44** (2): 558, 2007.
  15. [http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC\\_RES\\_2000-054.pdf](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC_RES_2000-054.pdf). <20/02/2014>.
  16. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm>. <01/03/2014>.
  17. VAN DEN ENDEN, E. "Pharmacotherapy of helminth infection". *Expert Opin. Pharmacother.*, **10** (3): 435, 2009.
  18. WU, Z.M.; RAZZAK, M.; TUCKER, I.G. & MEDLICOTT, N.J. "Physicochemical characterization of ricobendazole: I. Solubility, lipophilicity, and ionization characteristics". *J. Pharm. Sci.*, **94** (5): 983, 2005.
  19. MIRFAZAELIAN, A.; ROUINI, M.R. & DADASHZADEH, S. "Time dependent pharmacokinetics of albendazole in human". *Biopharm. Drug Dispos.*, **24** (5): 199, 2003.
  20. MARRINER, S.E. & BOGAN, J.A. "Pharmacokinetics of albendazole in sheep". *Am. J. Vet. Res.*, **41** (7): 1126, 1980.
  21. MIRFAZAELIAN, A.; ROUINI, M.R. & DADASHZADEH, S. "Dose dependent pharmacokinetics of albendazole in human". *Biopharm. Drug Dispos.*, **23** (9): 379, 2002.
  22. DAYAN, A.D. "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics". *Acta Trop.*, **86** (2-3): 141, 2003.
  23. DANAHER, M.; DE RUYCK, H.; CROOKS, S.R.H.; DOWLING, G. & O'KEEFFE, M. "Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **845** (1): 1, 2007.
  24. MARRINER, S.E.; MORRIS, D.L.; DICKSON, B. & BOGAN, J.A. "Pharmacokinetics of albendazole in man". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **30** (6): 705, 1986.
  25. DELATOUR, P.; PARISH, R.C. & GYURIK, R.J. "Albendazole - a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites". *Ann. Rech. Vet.*, **12** (2): 159, 1981.
  26. ABDEL-TAWAB, A.M.; BRADLEY, M.; GHAZALY, E.A.; HORTON, J. & EL-SETOUHY, M. "Albendazole and its metabolites in the breast milk of lactating women following a single oral dose of albendazole". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68** (5): 737, 2009.
-

27. TELLA, A.C.; OLABEMIWO, O.M.; MALAWI, M.O. & OBIYENWA, G.K. "Developing a spectrophotometric method for the estimation of albendazole in solid and suspension forms". *Int. J. Phys. Sci.*, **5** (4): 379, 2010.
  28. BELAZ, K.R.A.; CASS, Q.B. & OLIVEIRA, R.V. "Determination of albendazole metabolites by direct injection of bovine plasma and multidimensional achiral-chiral high performance liquid chromatography". *Talanta*, **76** (1): 146, 2008.
  29. GARCIA, J.J.; BOLAS-FERNANDEZ, F. & TORRADO, J.J. "Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **723** (1-2): 265, 1999.
  30. CHEN, X.Y.; ZHAO, L.Y.; XU, H.Y. & ZHONG, D.F. "Simultaneous determination of albendazole and its major active metabolite in human plasma using a sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35** (4): 829, 2004.
  31. BONATO, P.S.; LANCHOTE, V.L. & TAKAYANAGUI, O.M. "Simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **783** (1): 237, 2003.
  32. DE RUYCK, H.; VAN RENTERGHEM, R.; DE RIDDER, H. & DE BRABANDER, D. "Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography". *Food Control*, **11** (3): 165, 2000.
  33. ZHANG, X.; XU, H.; ZHANG, H.; GUO, Y.; DAI, Z. & CHEN, X. "Simultaneous determination of albendazole and its metabolites in fish muscle tissue by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Anal. Bioanal. Chem.*, **401** (2): 727, 2011.
  34. WU, Z.M.; MEDLICOTT, N.J.; RAZZAK, M. & TUCKER, I.G. "Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39** (1-2): 225, 2005.
  35. MSAGATI, T.A.M. & NINDI, M.M. "Determination of benzimidazole anthelmintic compounds by supported liquid membrane extraction and liquid chromatography". *J. Sep. Sci.*, **24** (7): 606, 2001.
  36. SANTALADCHAIYAKIT, Y. & SRIJARANAI, S. "A simplified ultrasound-assisted cloud-point extraction method coupled with high performance liquid chromatography for residue analysis of benzimidazole anthelmintics in water and milk samples". *Anal. Methods*, **4** (11): 3864, 2012.
  37. ATKOSAR, Z. & ALTIOKKA, G. "The determination of albendazole by flow injection analysis method using UV-detection and HPLC method in suspensions". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29** (6): 849, 2006.
  38. MSAGATI, T.A.M. & NGILA, J.C. "Voltammetric determination of a benzimidazole anthelmintic mixture at a poly(3-methylthiophene)-modified glassy carbon electrode". *S. Afr. J. Chem.*, **56**: 5, 2003.
-

39. DE PRADA, A.G.V.; MENA, M.L.; REVIEJO, A.J. & PINGARRON, J.M. "Voltammetric behavior and determination by flow injection with amperometric detection of benzimidazoles". *Anal. Lett.*, **37** (1): 65, 2004.
  40. DE OLIVEIRA, M.F. & STRADIOTTO, N.R. "Voltammetric assay of albendazole in pharmaceutical dosage forms". *Anal. Lett.*, **34** (3): 377, 2001.
  41. ABU ZUHRI, A.Z.; HUSSEIN, A.I.; MUSMAR, M. & YAISH, S. "Adsorptive stripping voltammetric determination of albendazole at a hanging mercury drop electrode". *Anal. Lett.*, **32** (15): 2965, 1999.
  42. CAMPBELL, W.C. & BENZ, G.W. "Ivermectin: a review of efficacy and safety". *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **7** (1): 1, 1984.
  43. CAMPBELL, W.C.; FISHER, M.H.; STAPLEY, E.O.; ALBERSCHONBERG, G. & JACOB, T.A. "Ivermectin - A potent new anti-parasitic agent". *Science*, **221** (4613): 823, 1983.
  44. GONZÁLEZ CANGA, A.; SAHAGÚN PRIETO, A.M.; JOSÉ DIEZ LIÉBANA, M.; MARTÍNEZ, N.F.; VEGA, M.S. & VIEITEZ, J.J.G. "The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species". *Vet. J.*, **179** (1): 25, 2009.
  45. CANGA, A.G.; PRIETO, A.M.S.; LIEBANA, M.J.D.; MARTINEZ, N.F.; VEGA, M.S. & VIEITEZ, J.J.G. "The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans - A mini-review". *AAPS J.*, **10** (1): 42, 2008.
  46. DANAHER, M.; HOWELLS, L.C.; CROOKS, S.R.H.; CERKVENIK-FLAJS, V. & O'KEEFE, M. "Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **844** (2): 175, 2006.
  47. MENEZ, C.; SUTRA, J.F.; PRICHARD, R. & LESPINE, A. "Relative Neurotoxicity of Ivermectin and Moxidectin in Mdr1ab (-/-) Mice and Effects on Mammalian GABA(A) Channel Activity". *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **6** (11), 2012.
  48. SUNG, Y.F.; HUANG, C.T.; FAN, C.K.; LIN, C.H. & LIN, S.P. "Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy". *Clin. Toxicol.*, **47** (7): 686, 2009.
  49. CAMPBELL, W.C. "Ivermectin: An update". *Parasitol. Today*, **1** (1): 10, 1985.
  50. BARRAGRY, T.B. "A review of the pharmacology and clinical uses of ivermectin ". *Can. Vet. J.*, **28** (8): 512, 1987.
  51. CHHAIYA, S.B.; MEHTA, D.S. & KATARIA, B.C. "Ivermectin: pharmacology and therapeutic applications". *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.*, **1** (3): 132, 2012.
  52. INOUE, K.; YOSHIMI, Y.; HINO, T. & OKA, H. "Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS". *J. Sep. Sci.*, **32** (21): 3596, 2009.
  53. KOLBERG, D.I.S.; PRESTA, M.A.; WICKERT, C.; ADAIME, M.B. & ZANELLA, R. "Rapid and Accurate Simultaneous Determination of Abamectin
-



- and Ivermectin in Bovine Milk by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection". *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (7): 1220, 2009.
54. GARCIA-MAYOR, M.A.; GARCINUNO, R.M.; FERNANDEZ-HERNANDO, P. & DURAND-ALEGRIA, J.S. "Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk". *J. Chromatogr. A*, **1122** (1-2): 76, 2006.
55. FISCHER, J.; KELLY, M.T.; SMYTH, M.R. & JANDERA, P. "Determination of Ivermectin in Bovine Plasma by Column-Switching Lc Using Online Solid-Phase Extraction and Trace Enrichment". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11** (3): 217, 1993.
56. WALDIA, A.; GUPTA, S.; ISSARANI, R. & NAGORI, B.P. "Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of albendazole and ivermectin in tablet dosage form". *Indian J. Chem. Technol.*, **15** (6): 617, 2008.
57. YOSHII, K.; ISHIMITSU, S.; TONOGAI, Y.; ARAKAWA, K.; MURATA, H. & MIKAMI, H. "Simultaneous determination of emamectin, its metabolites, milbemectin, ivermectin and abamectin in tomato, Japanese Radish and tea by LC/MS". *J. Health Sci.*, **50** (1): 17, 2004.
58. JIANG, H.Y.; ZHOU, D.G.; LI, H.Y.; XU, F.; LI, C.; SHEN, J.Z.; LI, X.W. & DING, S.Y. "LC-fluorescence detection of abamectin, ivermectin, doramectin, and eprinomectin in rabbit feces". *Chromatographia*, **68** (3-4): 259, 2008.
59. GROSS, S.J.; RYAN, W.G. & PLOEGER, H.W. "Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production". *Vet. Rec.*, **144** (21): 581, 1999.
60. BLOCK, E.; MCDONALD, W.A. & JACKSON, B.A. "Efficacy of levamisole on milk production of dairy cows - a field study". *J. Dairy Sci.*, **70** (5): 1080, 1987.
61. WOLFORD, A.; MCDONALD, T.S.; ENG, H.; HANSEL, S.; CHEN, Y.; BAUMAN, J.; SHARMA, R. & KALGUTKAR, A.S. "Immune-Mediated Agranulocytosis Caused by the Cocaine Adulterant Levamisole: A Case for Reactive Metabolite(s) Involvement". *Drug Metab. Dispos.*, **40** (6): 1067, 2012.
62. SHEA, J.L. "Bioanalytical methods for quantitation of levamisole, a widespread cocaine adulterant". *Clin. Chem. Lab. Med.*, **51** (1): 205, 2013.
63. VAGI, S.J.; SHEIKH, S.; BRACKNEY, M.; SMOLINSKE, S.; WARRICK, B.; REUTER, N. & SCHIER, J.G. "Passive Multistate Surveillance for Neutropenia After Use of Cocaine or Heroin Possibly Contaminated With Levamisole". *Ann. Emerg. Med.*, **61** (4): 468, 2013.
64. AUFFENBERG, C.; ROSENTHAL, L.J. & DRESNER, N. "Levamisole: A Common Cocaine Adulterant with Life-Threatening Side Effects". *Psychosomatics*, **54** (6): 590, 2013.
65. EL-KHOLY, H. & KEMPPAINEN, B.W. "Liquid chromatographic method with ultraviolet absorbance detection for measurement of levamisole in chicken tissues, eggs and plasma". *J. Chromatogr. B*, **796** (2): 371, 2003.
66. REID, J.M.; KOVACH, J.S.; O'CONNELL, M.J.; BAGNIEWSKI, P.G. & MOERTEL, C.G. "Clinical and pharmacokinetic studies of high-dose
-

- levamisole in combination with 5-fluorouracil in patients with advanced cancer". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **41** (6): 477, 1998.
67. GWILT, P.; TEMPERO, M.; KREMER, A.; CONNOLLY, M. & DING, C. "Pharmacokinetics of levamisole in cancer patients treated with 5-fluorouracil". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **45** (3): 247, 2000.
68. LUYCKX, M.; ROUSSEAU, F.; CAZIN, M.; BRUNET, C.; CAZIN, J.C.; HAGUENOER, J.M.; DEVULDER, B.; LESIEUR, I.; LESIEUR, D.; GOSSELIN, P.; ADENIS, L.; CAPPELAERE, P. & DEMAILLE, A. "Pharmacokinetics of Levamisole in healthy subjects and cancer patients". *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **7** (4): 247, 1982.
69. CHOLIFAH, S.; KARTINASARI, W.F. & INDRAYANTO, G. "Simultaneous HPLC determination of levamisole hydrochloride and anhydrous niclosamide in veterinary powders, and its validation". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31** (2): 281, 2008.
70. TREHY, M.L.; BROWN, D.J.; WOODRUFF, J.T.; WESTENBERGER, B.J.; NYCHIS, W.G.; REUTER, N.; SCHIER, J.G.; VAGI, S.J. & HWANG, R.J. "Determination of Levamisole in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *J. Anal. Toxicol.*, **35** (8): 545, 2011.
71. HOLBROOK, A. & SCALES, B. "Polarographic determination of tetramisole hydrochloride in extracts of animal tissue". *Anal. Biochem.*, **18** (1): 46, 1967.
72. SADEGHI, S.; FATHI, F. & ABBASIFAR, J. "Potentiometric sensing of levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymer". *Sens. Actuators, B*, **122** (1): 158, 2007.
73. Ministério da saúde: Cadernos de Atenção Básica - nº 15. 2006.
74. KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.K. & HE, J. "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data". *Lancet*, **365** (9455): 217, 2005.
75. MOTWANI, J.G. "Combining renin-angiotensin-aldosterone system blockade with diuretic therapy for treatment of hypertension". *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, **3** (2): 72, 2002.
76. Jornal brasileiro de nefrologia - VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. 2010.
77. ARAFAT, T.; AWAD, R.; HAMAD, M.; AZZAM, R.; AL-NASAN, A.; JEHANLI, A. & MATALKA, K. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics profiles of enalapril maleate in healthy volunteers following determination of enalapril and enalaprilat by two specific enzyme immunoassays". *J. Clin. Pharm. Ther.*, **30** (4): 319, 2005.
78. DAVIES, R.O.; GOMEZ, H.J.; IRVIN, J.D. & WALKER, J.F. "An overview of the clinical-pharmacology of enalapril". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **18**: S215, 1984.
79. TODD, P.A. & HEEL, R.C. "Enalapril - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use hypertension and congestive-heart-failure". *Drugs*, **31** (3): 198, 1986.
-

80. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. & GILMAN, A.G., *Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed. 2003, McGraw-Hill: Rio de Janeiro. 1647 p.
81. NIEMEYER, C.; HASENFUSS, G.; WAIS, U.; KNAUF, H.; SCHAFFERKORTING, M. & MUTSCHLER, E. "Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in relation to renal-function". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24** (5): 661, 1983.
82. STAS, S.; APPEESH, L. & SOWERS, J. "Metabolic safety of antihypertensive drugs: Myth versus reality". *Curr. Hypertens. Rep.*, **8** (5): 403, 2006.
83. GUSAKOVA, A.M. & IVANOVSKAYA, E.A. "Determination of enalapril by stripping voltammetry at a mercury film electrode". *J. Anal. Chem.*, **60** (5): 436, 2005.
84. KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A.A. & ENSAFI, H.R. "Ferrocenedicarboxylic Acid Modified Carbon Paste Electrode: A Sensor for Electrocatalytic Determination of Hydrochlorothiazide". *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (5): 880, 2009.
85. RAZAK, O.A. "Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34** (2): 433, 2004.
86. REZAEI, B. & DAMIRI, S. "Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode as a Sensor for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide". *IEEE Sens. J.*, **8** (9-10): 1523, 2008.
87. DE DIEGO, M.; MENNICKENT, S.; GODOY, G. & MIRANDA, V. "A Validated Stability-Indicating LC Method for Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Samples". *Curr. Pharm. Anal.*, **7** (4): 248, 2011.
88. CARLUCCI, G.; DIGIUSEPPE, E. & MAZZEO, P. "Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid-chromatography". *Int. J. Pharm.*, **93** (1-3): 245, 1993.
89. ELSEBAEI, F. & ZHU, Y. "Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma and urine". *Talanta*, **85** (1): 123, 2011.
90. GONZALEZ, O.; IRIARTE, G.; RICO, E.; FERREIROS, N.; MAGUREGUI, M.I.; ALONSO, R.M. & JIMENEZ, R.M. "LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **878** (28): 2685, 2010.
91. SKOOG, D.A.H., F. J. & NIEMAN, T. A. , *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. 2002, Bookman: Porto Alegre. 836 p.
-

92. PIO DOS SANTOS, W.T.; GIMENES, D.T.; RICHTER, E.M. & ANGNES, L. "Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications ". *Quim. Nova*, **34** (10): 1753, 2011.
93. DOS SANTOS, W.T.P.; DE ALMEIDA, E.G.N.; FERREIRA, H.E.A.; GIMENES, D.T. & RICHTER, E.M. "Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection". *Electroanalysis*, **20** (17): 1878, 2008.
94. PLESKOV, Y.V. "Electrochemistry of diamond: A review". *Russ. J. Electrochem.*, **38** (12): 1275, 2002.
95. KRAFT, A. "Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material". *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2** (5): 355, 2007.
96. PLESKOV, Y.V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, **55** (11): 1045, 2000.
97. POFERL, D.J.; GARDNER, N.C. & ANGUS, J.C. "Growth of boron-doped diamond seed crystals by vapor deposition". *Journal of Applied Physics*, **44** (4): 1428, 1973.
98. PANIZZA, M. & CERISOLA, G. "Application of diamond electrodes to electrochemical processes". *Electrochim. Acta*, **51** (2): 191, 2005.
99. LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; MAZO, L.H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **78**: 748, 2009.
100. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **76** (3): 685, 2008.
101. ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R.C.; CASS, Q.B. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **12** (13): 1475, 2009.
102. SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-Wave Voltammetric Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations using a Boron-Doped Diamond Electrode without the Need of Previous Alkaline Hydrolysis Step". *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (2): 360, 2009.
103. PECKOVA, K.; MUSILOVA, J. & BAREK, J. "Boron-Doped Diamond Film Electrodes - New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **39** (3): 148, 2009.
104. BABYAK, C. & SMART, R.R. "Electrochemical detection of trace concentrations of cadmium and lead with a boron-doped diamond electrode: Effect of KCl and KNO<sub>3</sub> electrolytes, interferences and measurement in river water". *Electroanalysis*, **16** (3): 175, 2004.
105. DRAGOE, D.; SPATARU, N.; KAWASAKI, R.; MANIVANNAN, A.; SPATARU, T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Detection of trace levels of
-

- Pb<sup>2+</sup> in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry". *Electrochim. Acta*, **51** (12): 2437, 2006.
106. SONG, Y. & SWAIN, G.M. "Development of a method for total inorganic arsenic analysis using anodic stripping voltammetry and a Au-coated, diamond thin-film electrode". *Anal. Chem.*, **79** (6): 2412, 2007.
107. ALFARO, M.A.Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C.A. & VONG, Y.M. "Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment". *J. Braz. Chem. Soc.*, **17** (2): 227, 2006.
108. YU, H.B.; WANG, H.; QUAN, X.; CHEN, S. & ZHANG, Y.B. "Amperometric determination of chemical oxygen demand using boron-doped diamond (BDD) sensor". *Electrochemistry Communications*, **9**: 2280, 2007.
109. YU, H.B.; MA, C.J.; QUAN, X.; CHEN, S. & ZHAO, H.M. "Flow Injection Analysis of Chemical Oxygen Demand (COD) by Using a Boron-Doped Diamond (BDD) Electrode". *Environ. Sci. Technol.*, **43** (6): 1935, 2009.
110. YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **473** (1-2): 173, 1999.
111. GRANGER, M.C. & SWAIN, G.M. "The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes". *J. Electrochem. Soc.*, **146** (12): 4551, 1999.
112. SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment". *Electrochim. Acta*, **49** (22-23): 4021, 2004.
113. TERASHIMA, C.; RAO, T.N.; SARADA, B.V.; KUBOTA, Y. & FUJISHIMA, A. "Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes". *Anal. Chem.*, **75** (7): 1564, 2003.
114. CHAILAPAKUL, O.; SIANGPROH, W.; SARADA, B.V.; TERASHIMA, C.; RAO, T.N.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "The electrochemical oxidation of homocysteine at boron-doped diamond electrodes with application to HPLC amperometric detection". *Analyst*, **127** (9): 1164, 2002.
115. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **97**: 291, 2012.
116. LOURENCAO, B.C.; BACCARIN, M.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Differential pulse voltammetric determination of albendazole in pharmaceutical tablets using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **707** : 15, 2013.
117. 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.
-

118. MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food using a boron-doped diamond electrode". *Food Chem.*, **123** (3): 886, 2010.
119. PEDROTTI, J.J.; ANGNES, L. & GUTZ, I.G.R. "Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions". *Electroanalysis*, **8** (7): 673, 1996.
120. RICHTER, E.M.; JESUS, D.P.D.; NEVES, C.A.; LAGO, C.L.D. & ANGNES, L. "Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis". *Quim. Nova*, **26** (6): 839, 2003.
121. REIS, B.F. & BERGAMIN-FILHO, H. "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo". *Quim. Nova*, **16** (6): 570, 1993.
122. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A. "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth*, **233** (1-2): 367, 2001.
123. ICH - International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
124. SAVITZKY, A. & GOLAY, M.J.E. "Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures". *Anal. Chem.*, **36** (8): 1627, 1964.
125. PAWAR, A.K.M.; RAO, A.B.N.N. & SANKAR, D.G. "Simultaneous Estimation of Enalapril Maleate, Hydrochlorothiazide, Aspirin and Atorvastatin in pure and Its Simulated Dosage form Using Isocratic RP-HPLC". *Der Pharmacia Lettre*, **3** (6): 58, 2011.
126. COSTA, F.M.D. & PEREIRA NETTO, A.D. "Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário". *Quim. Nova*, **35**: 616, 2012.
127. 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*. 1ª ed. 2009, Stationery Office (U.K.): London. 3500 p.
128. ARDILA, J.A.; SARTORI, E.R.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **103** (0): 201, 2013.
129. LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **22** (15): 1717, 2010.
130. GALVÃO DE LIMA, R.; BONATO, P.S. & SANTANA DA SILVA, R. "Analysis of albendazole metabolites by electrospray LC-MS/MS as a probe to elucidate electro-oxidation mechanism of albendazole". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32** (2): 337, 2003.
-

131. GOSSER, D.K., *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993, Wiley-VCH: New York. 154 p.
132. GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L.M.; PLETCHER, D. & ROBINSON, J., eds. *Instrumental methods in electrochemistry*. 1985, Ellis Horwood Limited: Chichester. 443.
133. BARD, A.J. & L.R., F., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2<sup>a</sup> ed. 2001, John Wiley & Sons: New York. 833 p.
134. JUNG, H.; MEDINA, L.; GARCÍA, L.; FUENTES, I. & MORENO-ESPARZA, R. "Biopharmaceutics: Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide". *J Pharm Pharmacol*, **50** (1): 43, 1998.
135. GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLERN, M. & ETCHEBERRY, A. "Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes". *Diamond Relat. Mater.*, **16** (2): 316, 2007.
136. GOETING, C.H.; MARKEN, F.; GUTIERREZ-SOSA, A.; COMPTON, R.G. & FOORD, J.S. "Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray photoelectron spectroscopy study". *Diamond Relat. Mater.*, **9** (3-6): 390, 2000.
137. CHIADMI, F.; IYER, A.; CISTERNINO, S.; TOLEDANO, A.; SCHLATTER, J.; RATINEY, R. & FONTAN, J.E. "Stability of levamisole oral solutions prepared from tablets and powder". *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **8** (2): 322, 2005.
138. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Voltammetric determination of sodium cyclamate in dietary products using a boron-doped diamond electrode". *Quim. Nova*, **31** (6): 1405, 2008.
139. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **99**: 883, 2012.
140. KISSINGER, P.T. & HEINEMAN, W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. 2<sup>a</sup> ed. 1996, Marcel Dekker, Inc.: New York.
141. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations.
142. RIBEIRO, F.A.D.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.D. & SCHNEIDER, R.P. "Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados". *Quim. Nova*, **31**: 164, 2008.
143. DA COSTA, F.M. & PEREIRA NETTO, A.D. "Development and application of methods for the determination of ivermectin in veterinarian medications". *Quim. Nova*, **35** (3): 616, 2012.
144. O'DEA, J.J.; RIBES, A. & OSTERYOUNG, J.G. "Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate". *J. Electroanal. Chem.*, **345** (1-2): 287, 1993.
-