



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SIMPLES E NOVO SENSOR PARA FLUTAMIDA À BASE
DE NANOTUBOS DE CARBONO OXIDADO E ÓXIDO DE GRAFENO: APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE URINA ARTIFICIAL E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

JULIANNA SANTOS FARIAS

São Luís – MA

2017

JULIANNA SANTOS FARIAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM SIMPLES E NOVO SENSOR PARA FLUTAMIDA À BASE
DE NANOTUBOS DE CARBONO OXIDADO E ÓXIDO DE GRAFENO: APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE URINA ARTIFICIAL E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. SIRLANE APARECIDA ABREU SANTANA

Universidade Federal do Maranhão

Membro Titular

Profa. Dra. ELIANE RODRIGUES DE SOUSA

Instituto Federal do Maranhão

Membro Titular

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA SILVA LUZ

Universidade Federal do Maranhão

Presidente

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por todo incentivo e amor dedicados a mim ao longo dos anos.

Ao meu padrasto, por todos ensinamentos e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela sua graça e infinito amor.

Á minha orientadora Profa. Dra. Rita Luz, por sua paciência, dedicação, compreensão e ensinamentos valiosos que me fizeram evoluir como pesquisadora e como pessoa. Com certeza levarei comigo seus conselhos, dicas, opiniões e explicações pelo resto da minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Flávio Damos por todo suporte fornecido. Suas colocações contribuíram grandemente para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial, à minha mãe, à minha vó, ao meu pai, ao meu padrasto e ao meu noivo, Augusto, por toda ajuda, carinho e apoio constante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus colegas do Laboratório de Sensores, pelas horas de aprendizado compartilhadas, em especial Sakae Yotsumoto, por toda a ajuda concedida a mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMA, pela oportunidade de fazer parte e dar minha pequena parcela de contribuição à sua história.

Á CAPES, pela bolsa concedida, e também à FAPEMA e o CNPq pelo auxílio financeiro à pesquisa.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um simples e novo sensor eletroquímico para determinação voltamétrica de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras de urina artificial empregando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com nanotubos de carbono oxidado e óxido de grafeno (NCO-OG), o qual foi denominado ECV/NCO-OG. As técnicas microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a Espectroscopia Raman foram utilizadas para a caracterização dos materiais à base de carbono. A resposta eletroquímica do analito frente ao ECV/NCO-OG foi investigada através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ). O sensor exibiu uma alta atividade electrocatalítica para a redução da flutamida em 0,05 V vs Ag/AgCl. Os parâmetros experimentais que influenciam a resposta do eletrodo foram investigados e as condições ótimas foram encontradas para o eletrodo modificado com NCO-OG, em solução tampão Britton-Robinson-BR na concentração de 0,1 mol L⁻¹ (pH 5). O sensor proposto apresentou uma ampla faixa de resposta linear de concentração para a flutamida de 0,1 a 1000 µmol L⁻¹ (ou 27,6 µg L⁻¹ a 0,27 g L⁻¹) para n=15 (R²=0,997), com limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), e sensibilidade de 0,03 µmol L⁻¹, 0,1 µmol L⁻¹, e 0,30 µA µmol⁻¹ L, respectivamente. O ECV/NCO-OG foi aplicado com sucesso para a determinação de flutamida em formulações farmacêuticas utilizadas no tratamento de câncer de próstata e amostras de urina artificial. Os resultados obtidos com o sensor proposto foram comparados com o método descrito na literatura e observou-se um nível de confiança de 95%, demonstrando que não há diferença estatística entre o método de referência e o método proposto. Os estudos de adição e recuperação mostram que o método proposto apresenta uma exatidão satisfatória com valor médio de recuperação de 101% (± 1) % para as amostras fortificadas.

Palavras-chave: *Flutamida, sensor eletroquímico, nanotubos de carbono oxidado, óxido de grafeno, amostras farmacêuticas, amostra de urina*

ABSTRACT

This work describes the development of a simple and novel electrochemical sensor for the voltammetric determination of flutamide in pharmaceutical samples and artificial urine samples employing a glassy carbon electrode (GCE) modified with carbon nanotube oxide and graphene oxide (CNTO-GO), denominated CNTO-GO/GCE. The techniques Scanning Electron Microscopy (SEM) and Raman Spectrum were used to characterize the carbon-based materials. Electrochemical response of the analyte to the CNTO-GO/GCE was investigated by cyclic voltammetry (CV), and square wave voltammetry (SWV) techniques. The sensor exhibits high catalytic activity for flutamide reduction at 0,05 V vs Ag/AgCl. The experimental parameters that influence on the electrode response were investigated and the optimum conditions were found to the modified electrode with CNTO-GO, in 0.1 mol L⁻¹ Britton Robinson buffer solution (pH 5). The proposed sensor presented a wide linear response range of concentration from 0.1 up to 1000 μmol L⁻¹ (or 27.6 μg L⁻¹ up to 0.27 g L⁻¹) for n = 15 (R² = 0.997); , with limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and sensibility of 0.03 μmol L⁻¹, 0.1 μmol L⁻¹, and 0.30 μA μmol⁻¹ L, respectively. The CNTO-GO/GCE was successfully applied for the determination of flutamide in pharmaceutical formulations used in the prostate cancer treatment and urine samples. The results obtained by the proposed sensor were in agreement to those obtained by a comparative method described in the literature and .it was observed at 95% confidence level, there was no statistical difference between the reference and proposed method. The studies of addition and recovery showed that the proposed method has the average recovery for fortified samples was 101% (±1) %.

Key words: *Flutamide; electrochemical sensor, oxidized carbon nanotube; graphene oxide, pharmaceutical samples; urine samples.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química de flutamida.....21
- Figura 2-** Representação esquemática da formação dos nanotubos de carbono. (a) folha de grafeno, (b) e (c) folha de grafeno sendo enrolado e (d) nanotubo de carbono formado.31
- Figura 3:** (a) Representação de um nanotubo de carbono com parede simples e de um nanotubo de carbono com paredes múltiplas(b).31
- Figura 4:** Potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128 N utilizado para as medidas eletroquímicas. Disponível em: <<http://www.metrohmautolab.com/Products/Echem/>>. Acesso em 03 agos. 2016. ..45
- Figura 5:** Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas ER= Eletrodo de referência, ET= Eletrodo de trabalho e EA= Eletrodo Auxiliar.....45
- Figura 6:** Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6330F. Disponível em: <<http://www.labx.com>>. Acesso em 09 agos. 2016.....46
- Figura 7:** Espectrômetro Raman modelo da microsonda Renishaw. Disponível em: <<http://www.renishaw.com.br>>. Acesso em 09 agos. 2016.....46
- Figura 8:** Esquema ilustrativo da modificação da superfície do ECV com o compósito NCO-OG.....48
- Figura 9:** (a) MEV e (b) Espectro Raman do NCO-OG.....55
- Figura 10:** Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de 0,4 mmol L⁻¹ de flutamida sobre: (a) ECV não modificado e (b) ECV/NCO-OG. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$58
- Figura 11:** Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de 0,4 mmol L⁻¹ de flutamida sobre: ECV não modificado (voltamograma em preto) e ECV/NCO-OG (voltamograma vermelho). Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$59
- Figura 12:** Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de 0,4 mmol L⁻¹ de flutamida sobre o ECV/CNO-OG nas faixas de potencial: (a) de -1000 a +400 mV e (b) -200 a +200 mV. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$. Inserção: gráfico de I_p vs [Flutamida].....60
- Figura 13:** Gráfico de I_{pc} versus $v^{1/2}$ para o processo catódico da flutamida sobre o ECV/NCO-OG na presença de diferentes velocidades de varredura (0,01 – 0,1 V s⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão BR (pH 5,0). [flutamida]= 0,4 mmol L⁻¹.61
- Figura 14:** VCs referentes ao processo redox da flutamida sobre o ECV/NCO-OG em diferentes valores de pHs. Inseridos nessa figura estão os gráfico de potenciais

de Epa e Epc. Medidas conduzidas em 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato contendo 0,4 mmol L⁻¹ flutamida. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$63

Figura 15: Influência do tipo de solução tampão na I_p da flutamida empregando a técnica VC. [Flutamida]=0.4 mmol L⁻¹; $v=0.05 \text{ V s}^{-1}$64

Figura 16: (a) Voltamogramas de pulso diferencial para a determinação de flutamida nas concentrações: (1) 4, (2) 8, (3) 12 e (4) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas de pulso diferencial. Medidas conduzidas utilizando o ECV/NCO-OG em condições experimentais otimizadas, em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão BR (pH 5,0). $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e $A_p = 0,025 \text{ V}$66

Figura 17: (a) Voltamogramas de onda quadrada para a determinação de flutamida nas concentrações: (1) 4, (2) 8, (3) 12 e (4) 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas de onda quadrada. Medidas conduzidas utilizando-se o ECV/NCO-OG em condições experimentais otimizadas, em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 5,0). Frequência igual a 10 Hz ($v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$) e $A_p = 0,025 \text{ V s}^{-1}$68

Figura 18: (a) VOQ obtidos em diferentes frequências: (1) 20, (2) 30, (3) 40, (4) 50, (5) 60 e (6) 70 Hz; (b) Gráfico de I_{pc} vs frequência. Medidas conduzidas em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 5,0) utilizando-se o ECV/NCO-OG. $A_p = 0,05 \text{ V}$70

Figura 19: (a) VOQ obtidos em diferentes amplitudes de pulso (1) 20, (2) 30, (3) 40, (4) 50, (5) 70, (6) 80 e (7) 90 mV. (b) Gráfico de I_{pc} vs A_p. Medidas conduzidas utilizando-se o ECV/NCO-OG em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 5,0). $f = 50 \text{ Hz}$72

Figura 20: (a) VOQ para redução da flutamida obtidos em tampão BR, pH 5,0. As concentrações de flutamida na célula eletroquímica corresponderam a: 0,1; 2,4; 4,8; 10,2; 22,0; 31,0; 40,9; 51,0; 58,0; 70,0; 126,0; 265,0; 503,0; 718,0 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Curva analítica obtida a partir dos voltamogramas da figura 19a. $f = 50 \text{ Hz}$ e $A_p = 0,05 \text{ V}$74

Figura 21: Tempo de vida útil do ECV/NCO-OG. Respostas analíticas obtidas em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Medidas obtidas em condições experimentais e operacionais otimizadas.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os nanotubos de carbono de parede única (NCPS) (A) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NCPM) (B)	32
Tabela 2: Comparação entre as sensibilidades obtidas por VPD e VOQ para a determinação de flutamida empregando o ECV/NCO-OG.....	69
Tabela 3: Comparação do desempenho analítico utilizando diferentes eletrodos para determinação de flutamida.	75
Tabela 4: Estudo da adição e recuperação do analito nas amostras farmacêuticas contendo flutamida.	77
Tabela 5: Avaliação da repetibilidade intra-dias das medidas obtidas com o sensor ECV/NCO-OG imerso em 0,1 mol L ⁻¹ solução de tampão BR (pH 5,0) contendo 50 µmol L ⁻¹ de flutamida.....	78
Tabela 6: Avaliação da repetibilidade inter-dia obtida com cinco sensores à base de NCO-OG imerso em 0,1 mol L ⁻¹ solução de tampão fosfato (pH 5,0) contendo 50 µmol L ⁻¹ de flutamida.....	79
Tabela 7: Avaliação da seletividade do sensor proposto em relação a possíveis interferentes. [Flutamida]= 10 µmol L ⁻¹ (n = 3).	80
Tabela 8: Figuras de mérito obtidas com o método analítico proposto.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Coeficiente de transferência de elétrons
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AF	Acetaminofeno
A_p	Amplitude de Pulso
b	Coeficiente de Regressão Angular da Curva Analítica
BR	Britton-Robinson
CAP	Câncer de Próstata
C-DR	Disco Compacto Gravável
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CV	Coeficiente de Variância
CVD	<i>Chemical Vapour Deposition</i>
DA	Dopamina
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
EGPE	Eletrodo de Grafite Pirolítico com o Plano “edge” Eletrodo de Lápis de Grafite
ELG	Potencial de Pico Anódico
E_{pa}	Potencial de Pico Catódico
E_{pc}	Eletrodo de Pasta de Carbono
EPC	Eletrodo Gotejante de Mercúrio
EGM	Frequência
f	<i>Food and Drug Administration</i>
FDA	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ICH	Instituto Nacional de Câncer
INCA	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INMETRO	Corrente de Pico Corrente de Pico Anódica
I_p	

I_{pa}	Corrente de Pico Catódica
I_{pc}	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
LHRH	Limite de Detecção
LOD	Limite de Quantificação
LOQ	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV	Nanotubos de Carbono
NC	Nanotubos de Carbono Oxidado
NCO	Nanotubos de Carbono Oxidado e Óxido de
NCO-OG	Grafeno
	Nanotubos de Carbono Verticalmente alinhados
NCVA	Nanotubos de Carbono de Parede Única ou Simples
NCPS	Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla Dicloridrato N-(1-Naftil) de Etilenodiamina
NCPM	Polarografia de Corrente Alternada
NEDA	Polarografia de Corrente Direta
PCA	Potencial Hidrogeniônico
PCD	Polarografia de Pulso Normal
pH	Polarografia de Pulso Diferencial
PPN	Coefficiente de Correlação Linear
PPD	Desvio Padrão
R	Saturado
s	Eletrodo saturado de Calomelano
sat	Dodecil Sulfato de Sódio
ESC (SCE)	Velocidade de Varredura
SDS	Voltametria Adsorviva de Redissolução Catódica
v	com Onda Quadrada
VARCOQ	Voltametria Cíclica
	Voltametria de Onda Quadrada
VC	Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ	
VPD	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1.	Flutamida e sua aplicação no combate ao câncer de próstata	21
3.2.	Determinação eletroquímica de flutamida.....	24
3.3.	Nanotubos de Carbono	30
3.3.1.	Propriedades dos Nanotubos de Carbono.....	32
3.3.2.	Sensores eletroquímicos à base de nanotubos de carbono	33
3.4.	Validação de Métodos Analíticos.....	36
4.	PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1.	Reagentes e soluções.....	44
4.2.	Instrumentação.....	45
4.3.	Síntese e Esfoliação do compósito nanotubos de carbono oxidado e óxido de grafeno (NCO-OG).....	47
4.4.	Preparo do eletrodo modificado com o compósito NCO-OG	47
4.5.	Caracterização do compósito NCO-OG	48
4.6.	Estudo do comportamento eletroquímico do ECV/NCO-OG	48
4.7.	Estudos relacionados ao processo de Oxidação/Redução de Flutamida sobre o ECV/NCO-OG.....	49
4.8.	Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais do sistema eletroquímico	49
4.8.1.	Parâmetros experimentais.....	49
4.8.2.	Parâmetros operacionais.....	50
4.9.	Caracterização analítica do sensor para a determinação de flutamida.....	50
4.10.	Preparo das amostras farmacêuticas e urina artificial para as medidas eletroquímicas	50

4.11.	Determinação eletroquímica de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial empregando o ECV/NCO-OG e testes de adição e recuperação.....	51
4.12.	Estudos de Interferentes.....	52
4.13.	Validação do Sensor Proposto.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1.	Caracterização do compósito NCO-OG por MEV e espectroscopia Raman.....	54
5.2.	Comportamento eletroquímico da flutamida sobre o ECV/NCO-OG ...	56
5.3.	Estudo da Influência da velocidade de varredura do sensor à base de NCO-OG sobre a corrente de pico da flutamida	61
5.4.	Otimização dos parâmetros experimentais.....	62
5.4.1.	Estudo da influência do pH e do tipo de solução tampão sobre o processo redox da flutamida.....	62
5.5.	Escolha da técnica voltamétrica para a determinação de flutamida empregando o sensor à base de NCO-OG	65
5.5.1.	Otimização dos parâmetros operacionais da técnica VOQ.	69
5.6.	Caracterização analítica do sensor para a determinação de flutamida	73
5.7.	Determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras de urina artificial e comparação com o método de espectroscopia UV-VIS.....	76
5.8.	Estudo da repetibilidade do sensor.....	78
5.9.	Avaliação do tempo de vida útil do sensor	79
5.10.	Estudo de interferentes.....	80
5.11.	Avaliação das figuras de mérito obtidas com o sensor proposto e considerações finais sobre o ECV/NCO-OG	81
6.	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos métodos analíticos é um dos campos de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse clínico, ambiental, alimentício, farmacêutico, entre outros, que têm levado a uma crescente busca por métodos que conduzam a resultados mais rápidos, exatos e reprodutíveis com o objetivo de substituir ou melhorar os já existentes.

Neste sentido, a análise de fármacos tem se destacado bastante nos últimos anos devido sua fundamental importância no tratamento de inúmeras doenças, tais como no tratamento da tuberculose, Aids e câncer. Esta última tem preocupado milhões de pessoas no mundo inteiro devido a rapidez com que a mesma pode levar a óbito, quando não detectado nos estágios iniciais.

O câncer é uma doença que ocorre como consequência de modificações no DNA de um indivíduo. Ao contrário do que se pode pensar, apenas 5% a 10% dos casos de câncer são tumores hereditários. Isso ocorre, pois as mutações que ocasionam um câncer podem ocorrer em células somáticas ou germinativas, sendo que apenas no segundo caso o câncer poderá ser transmitido para as gerações seguintes (FERREIRA; ROCHA, 2004).

Dentre os vários tipos de câncer existentes no mundo inteiro o câncer de próstata ou cancro da próstata, também chamado de carcinoma da próstata, é um dos que mais mata. Ele decorre de uma massa anormal de tecido glandular, como um resultado do crescimento desordenado das células (SBU, 2015).

A próstata é uma glândula do tamanho de uma noz que só os homens possuem. Fica logo abaixo da bexiga e à frente do reto e uretra, o tubo pela qual a urina é eliminada (INCA, 2016). Esta glândula é responsável por produzir parte do líquido seminal ou sêmen, que protege e nutre os espermatozoides (TONON; SCHOFFEN, 2009).

A maioria dos cânceres de próstata (CAP) é de crescimento lento, no entanto, alguns crescem relativamente rápido. As células cancerosas podem espalhar-se a partir da próstata para outras partes do corpo, particularmente os ossos (SBU, 2015). Inicialmente pode ser assintomático, mas em estágios avançados pode causar dificuldade para urinar, presença de sangue na urina ou dor na pelve, costas ou ao urinar. Os sinais clínicos são muito semelhantes aos da hiperplasia benigna

da próstata. Outros sintomas tardios podem incluir sensação de cansaço devido aos baixos níveis de células vermelhas no sangue e disfunção erétil (INCA, 2016).

Neste sentido, os fármacos são aliados preciosos no tratamento da doença, pois os mesmos correspondem ao princípio ativo de um medicamento, os quais podem promover a cura da doença ou mesmo mantê-la sob controle, como é o caso da flutamida.

A flutamida é um fármaco antiandrógeno não-esteróide, amplamente utilizado para o tratamento do CAP. Ele age no organismo bloqueando o hormônio masculino, a testosterona, que estimula o crescimento de células cancerígenas da próstata, de forma que as mesmas sejam incapazes de crescer. Este fármaco não promove a cura do CAP, mas o seu uso contínuo mantém o câncer sob controle por muitos meses ou anos (AHMADI *et al*, 2015).

O CAP está associado ao crescimento exagerado da próstata, com consequente diminuição do calibre e intensidade do jato urinário, sendo considerada uma das principais causas de doença e morte no mundo (TONON; SCHOFFEN, 2009). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que no ano de 2016 ocorrerão 61.200 novos casos, o que representa uma incidência de 62 casos novos a cada 100 mil homens.

O planejamento terapêutico para pacientes diagnosticados com CAP é feito de acordo com o estágio da doença e o grau de diferenciação histopatológica da neoplasia. Nos tumores localizados, a cura pode ser obtida através de cirurgia radical, denominada prostatectomia, ou radioterapia. Em tumores disseminados, a palição e o controle parcial da doença são conseguidos com o uso de orquiectomia ou hormonoterapia (MARONA; STORTI; NETO, 2004).

A flutamida é um dos principais fármacos usados na hormonoterapia, sendo o primeiro medicamento indicado para o tratamento do CAP avançado a ser comercializado no Brasil. Embora seja um medicamento eficaz para o controle do tumor da próstata e apresentar toxicidade aceitável, o seu uso contínuo pode provocar alguns efeitos adversos, dentre eles, a hepatotoxicidade, uma vez que a flutamida pode causar uma alteração na quantidade de produtos químicos específicos produzidos pelo fígado (VERGARA *et al*, 2000). Apesar desse efeito adverso ser o menos comum, ele é o mais sério, podendo em alguns casos levar a morte (TZANAVARAS; THEMELIS, 2007).

Neste contexto percebe-se que é extremamente importante o controle da dosagem da flutamida em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos. O primeiro caso decorre da importância da concentração do fármaco no medicamento uma vez que doses muito inferiores ou muito superiores de flutamida no organismo do paciente podem comprometer o controle da doença, e, conseqüentemente, acelerar a proliferação de células cancerígenas. O segundo caso baseia-se em verificar através de um fluido biológico, como por exemplo a urina, se o fármaco está realmente sendo absorvido pelo organismo.

Com base nessas informações, se faz necessário o desenvolvimento de um método fácil, sensível e seletivo para a determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras biológicas, visando o controle da dosagem do fármaco nestes tipos de amostras.

A flutamida mostra-se eletroquimicamente redutível em meios aquosos e mistos devido à presença de grupo nitro aromático em sua molécula. Assim, sua detecção e quantificação pode ser avaliada mediante técnicas eletroanalíticas (BRAHMAN; DAR; PITRE, 2012).

Os métodos eletroquímicos têm recebido grande atenção devido às diversas vantagens que apresentam, tais como baixo custo, elevada sensibilidade e seletividade, facilidade de operação e rapidez de análise, pois, na maioria das vezes, permite a análise direta da amostra, sem a necessidade de etapa de separação ou pré-tratamento, potencialidade de miniaturização e automação (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Todavia, o uso de eletrodos convencionais podem apresentar certos problemas, tais como a passivação gradual da superfície do eletrodo e uma lenta cinética de transferência eletrônica de forma a não favorecer o processo de transferência de elétrons entre o composto alvo e o material do eletrodo, prejudicando assim a sensibilidade da técnica (WANG, 1991).

Um outro inconveniente no uso de eletrodos convencionais, é o processo de oxidação ou redução do analito que pode ocorrer em altos potenciais, causando a perda de seletividade porque muitas outras espécies eletroativas também sofrem oxidação/redução em potenciais elevados.

Neste sentido, com a proposta de minimizar estes problemas, surgem então os eletrodos quimicamente modificados cujo objetivo é pré-estabelecer e controlar a

natureza físico-química da interface eletrodo/solução, buscando o melhoramento de sua reatividade, sensibilidade e seletividade (SOUZA *et al*, 1997).

Atualmente, a busca de novos materiais para a modificação de eletrodos tem sido alvo de estudo de diversos pesquisadores em todo mundo. Dentre eles, destacam-se os nanotubos de carbono (NC), por apresentarem características próprias, como propriedade eletrônica (devido à sua rápida transferência de carga), grande resistência mecânica, além de suas propriedades químicas e físicas como o tamanho (diâmetro e comprimento), a pureza, a orientação e funcionalização química.

Devido a essas características, e principalmente por suas propriedades elétricas, os NC se tornaram um dos materiais mais usados para a preparação de eletrodos inertes para as mais diversas aplicações. Neste contexto, um outro tipo de NC que tem chamado muita atenção nos últimos anos são os nanotubos de carbono verticalmente alinhados (NCVA) que são preparados com intuito de atingir o alinhamento vertical perfeito, em que o número de bordas expostas pelo plano é maximizado através da exfoliação da sua extremidade com agentes oxidantes fortes, o que tem permitido a formação de NCVA com pontas contendo óxido de grafeno (SILVA *et al*, 2015).

Poucos trabalhos foram reportados na literatura descrevendo o emprego dos NCVA com óxido de grafeno em sua extremidade. Dentre eles tem-se os trabalhos em que os pesquisadores aplicaram este material para a determinação de um fármaco, a atorvastatina de cálcio, (SILVA *et al*, 2014) e de um metal pesado, o chumbo (Pb^{2+}) (SAITO *et al*, 2014). Os resultados obtidos em ambos os casos mostraram uma melhoria na determinação eletroanalítica destas espécies, com detectabilidade em níveis de concentração nanomolar.

Com base nessas informações, e, considerando a recente aplicação desses materiais em estudos eletroanalíticos, o presente trabalho se baseia na aplicação e validação de um sensor à base de nanotubos de carbono oxidado contendo óxido de grafeno em uma de suas extremidades (representado pela sigla NCO-OG), a fim de se verificar a potencialidade do uso deste recente material na determinação de um fármaco, no caso a flutamida, utilizado no tratamento do CAP e, posteriormente aplicá-lo em amostras de urina e formulações farmacêuticas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver e aplicar uma nova plataforma para estudar o comportamento eletroquímico da flutamida empregando um compósito à base de NCO-OG visando a determinação do analito em amostras de urina e formulações farmacêuticas usadas no tratamento do câncer de próstata. Neste sentido, com intuito de alcançar esse objetivo os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- I. Preparar o sensor à base de NCO-OG;
- II. Caracterizar o compósito por técnicas microscópicas ou espectroscópicas;
- III. Estudar o comportamento eletroquímico do ECV modificado e não modificado na presença de flutamida;
- IV. Otimizar os parâmetros experimentais e operacionais para a determinação de flutamida, tais como, pH do meio e tipo de solução tampão;
- V. Escolher a melhor técnica voltamétrica de pulso a ser utilizada para a determinação da flutamida e realizar a caracterização analítica do sensor proposto;
- VI. Avaliar a repetibilidade de medidas e no preparo do sensor, verificar a estabilidade do mesmo, bem como realizar estudo de possíveis interferentes;
- VII. Aplicar o sensor em amostras de urina artificial e formulações farmacêuticas contendo flutamida, bem como realizar estudos de adição e recuperação do analito nas amostras para avaliar a exatidão do método desenvolvido.

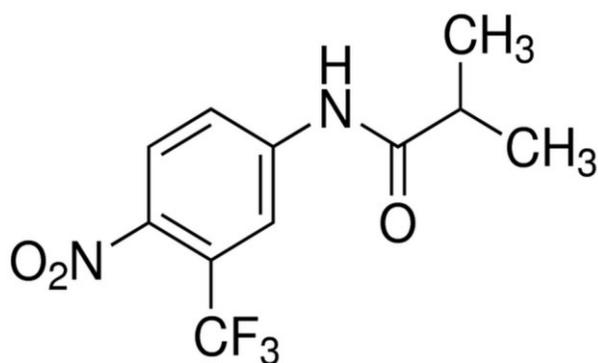
REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Flutamida e sua aplicação no combate ao câncer de próstata

A flutamida, 2-metil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil) fenil]-propanamida, cuja estrutura é apresentada na Figura 1, é um composto antiandrógeno não-esteróide, destituído de atividade hormonal (CHROUSOS *et al*, 2001), sendo sintetizada pela primeira vez por Baker e colaboradores em 1967. Este fármaco foi o primeiro antiandrógeno não-esteróide disponível para uso clínico, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1989 (HELSEN *et al*, 2014). Tem sido utilizado no tratamento de CAP em pacientes não tratados previamente ou naqueles que não responderam ou se tornaram resistentes à tratamentos com hormônios. Também pode ser utilizado como monoterapia ou em combinação com um agonista LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante) (ORNSTEIN *et al*, 1996). O uso deste fármaco pode proporcionar a redução do tamanho do tumor ou bloquear o crescimento do mesmo e com isso aumentar o tempo de sobrevida livre da progressão da doença, assim como a duração média da sobrevida.

Figura 1: Estrutura química de flutamida



FONTE: PRÓPRIO AUTOR

A próstata é uma glândula um pouco maior que uma noz, localizada logo abaixo da bexiga masculina. Sua função é produzir um líquido alcalino que, junto com os espermatozoides, constitui o sêmen e é expelido durante a ejaculação, sendo este líquido o responsável pela movimentação dos espermatozoides. É composta

basicamente por tecido glandular, o qual pode desenvolver o CAP (BERTOLDO; PASQUINI, 2010).

De acordo com o INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), o CAP é a quarta causa de morte por neoplasias no Brasil, correspondendo a 6% do total de óbitos por este grupo nosológico, sendo atualmente, a segunda causa mais comum de morte entre os homens por câncer (ficando atrás apenas do câncer de pele) (INCA, 2016).

A taxa de mortalidade vem apresentando um ritmo de crescimento acentuado, passando de 3,73/100.000 homens em 1979 para 8,93/100.000 homens em 1999, o que representa uma variação percentual relativa de 139%. Para 2016, estima-se a ocorrência de 61.200 casos novos cujo aumento significativo pode ser explicado pela a introdução de novos métodos diagnósticos e o aumento da expectativa de vida da população masculina.

A ocorrência do CAP não tem causas totalmente esclarecidas, porque ainda não há um entendimento de como ocorrem os mecanismos que modificam a maquinaria das células normais da próstata, tornando-as malignas (GOMES *et al*, 2008). Porém, estudos demonstram que existem fatores que aumentam o risco de desenvolvimento do CAP, dentre eles, a idade, já que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos. Outro fator é o histórico familiar, pois se um homem possui um pai ou um irmão que apresentou CAP antes dos 60 anos de idade, o risco do mesmo desenvolver a doença é aumentado de 3 a 10 vezes em relação à população em geral (BRASIL, 2002).

O CAP costuma ser assintomático na fase inicial e somente com o avanço da doença os sintomas aparecem. Na fase avançada, pode provocar dor óssea, sintomas urinários ou, quando mais grave, infecção generalizada ou insuficiência renal. Por tanto, é necessário a realização de exames clínicos conhecidos como toque retal ou toque digital da próstata e o exame de sangue para dosagem do antígeno prostático específico, PSA, para o diagnóstico precoce (BRASIL, 2002).

Existem diferentes tratamentos para o CAP e por falta de ensaios clínicos randomizados, nenhuma opção terapêutica pode ser considerada superior a outra. No entanto, alguns fatores devem ser considerados na escolha do tratamento, tais como, o tamanho e a classificação do tumor e a idade do paciente. Além disso, cada

opção de tratamento que inclui, a radioterapia, prostatectomia radical (remoção cirúrgica da próstata), vigilância ativa ou observação, tratamento local experimental e hormonoterapia apresentam efeitos colaterais (MIÑANA *et al*, 2016).

Quando o CAP se encontra em estágio avançado, o tratamento pode ser realizado pelo decréscimo da produção de androgênio, através da administração de um estrógeno (estrogenoterapia) ou de um análogo do LHRH, como, por exemplo, a leuprolida ou a goserelina, que inibem a atividade testicular por via hipofisária. Emprega-se, também, a administração de um antiandrógeno, como a flutamida, que inibe a penetração ou a ação intracelular de testosterona nas células prostáticas, causando o bloqueio do crescimento do tumor (MARONA; STORTI; NETO, 2004).

O papel da flutamida e seus metabólitos, principalmente a 2-hidróxi-flutamida, no tratamento do CAP, é competir com o hormônio testosterona e seu poderoso metabólito, a di-hidrotestosterona, inibindo a ligação deles aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo, diminuindo assim a proliferação das células em tecidos dependentes de andrógenos. Contudo, estudos demonstram pequena correlação entre a afinidade relativa de ligação do fármaco aos receptores androgênicos e proliferação, o que sugere que seu efeito benéfico não se deve à interação direta com as células tumorais (BROGDEN; CHRISP, 1991)

O tratamento com flutamida pode causar uma variedade de efeitos secundários que dependem da reação de cada organismo para a medicação. A maioria dos efeitos colaterais comuns incluem diarreia, cansaço e impotência (DRUGLINE, 2016).

Um efeito secundário menos comum, porém mais sério, é o mau funcionamento do fígado, uma vez que a flutamida pode, por vezes, causar uma alteração na quantidade de substâncias químicas específicas produzidos pelo fígado (VERGARA *et al*, 2000). Por isso o desenvolvimento de novos métodos analíticos para sua quantificação em formulações farmacêuticas, visando o controle de qualidade, bem como o monitoramento desta em fluidos biológicos é extremamente importante. Neste último, considera-se o fato de que a flutamida, quando administrada no organismo é parcialmente absorvida pelo mesmo, sendo excretada principalmente na urina, (RADWANSKI *et al*, 1989). Sendo assim, um indivíduo que excreta na urina uma grande quantidade de flutamida não está absorvendo o

necessário para tratamento eficiente da doença. Neste sentido, reforça-se que não apenas as análises em formulações farmacêuticas são importantes, mas também as análises em fluidos biológicos, como por exemplo a urina. Após a ingestão de cerca de 250 mg de flutamida no organismo, um indivíduo saudável excreta, após 24 horas, através da urina cerca de 3 a 500 ng L⁻¹ de flutamida (0,01 a 1,8 μmol L⁻¹) (ANJUM *et al*, 1999). Esse resultado nos sugere que grande parte do medicamento é absorvido pelo organismo, justificando assim a importância de se monitorar o analito em fluidos biológicos de forma menos invasiva.

Neste contexto, diferentes métodos analíticos para a determinação de flutamida sob a forma de matéria-prima, em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos são reportados na literatura, incluindo a espectrofotometria (NAGARAJA; SUNITHA; SILWADI, 2000), cromatografia gasosa (SANE *et al*, 1993), cromatografia de alta eficiência (JALALIZADEH *et al*, 2006) e fotoquímica (SORTINO *et al*, 2001). Embora estes métodos apresentem a vantagem de serem sensíveis e precisos, a maior parte deles necessitam de etapas extração ou de pré-concentração, consomem muito tempo e às vezes são caros e requerem operadores treinados.

Assim, existe uma necessidade de se desenvolver métodos que sejam sensíveis, seletivos, precisos, de baixo custo, que apresentem rapidez de análise e sejam de fácil operação. Para este propósito surgem os métodos eletroquímicos que apresentam tais vantagens em relação aos outros métodos analíticos instrumentais. Podendo ser utilizados com eletrodos convencionais, como por exemplo, a polarografia (LUEJE *et al*, 1998) ou através do desenvolvimento de sensores eletroquímicos (BRAHMAN *et al*, 2012), o que possibilitam a eletrocatalise, a não passivação do eletrodo e/ou a prevenção de reações indesejáveis que competem cineticamente com o processo desejado do eletrodo (MURRAY, 1984).

3.2. Determinação eletroquímica de flutamida

O primeiro trabalho que descreveu o uso de um método eletroquímico para determinação de flutamida foi realizado por SNYCERSRI (1989). Este pesquisador utilizou técnicas polarográficas com um eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) como eletrodo de trabalho, com o qual foi feita a determinação da flutamida em um

composto puro e em comprimidos. A redução polarográfica da flutamida em tampão fosfato (pH 7,05) contendo 5% de etanol exibiu curvas polarográficas bem definidas em potenciais de -0,48 V para a técnica de polarografia de corrente direta (PCD), -0,63 V para a polarografia de corrente alternada (PCA), -0,56 V para a polarografia de pulso normal (PPN) e -0,48 V para a polarografia de pulso diferencial (PPD). O processo de redução do EGM foi irreversível e controlado por difusão. O estudo de pH (realizado entre 6,1 e 7,9) mostrou que as correntes de redução polarográficas não dependem do pH. Com o aumento do pH os potenciais de meia onda em PCD e PPN e os potenciais de pico em PCA e PPD deslocaram-se para valores menos negativos. A intensidade de corrente no intervalo de temperatura (19 - 54°C) também foi investigado. O aumento da temperatura deslocou o potencial de redução da flutamida para valores mais positivos. As menores quantidades do composto que foram detectadas pelas diferentes técnicas foram: 500 ng cm⁻³ (PCD); 20 ng cm⁻³ (PPD); 10 ng cm⁻³ (PPN) e 5000 ng cm⁻³ (PCA). O erro padrão para as diferentes técnicas foi de: 0,03 para PCD; 0,14 por PCA; 3,6 para PPD e 4,7 para PPN. A determinação eletroquímica de flutamida em comprimidos foi comparada com o método espectrofotométrico, indicando precisão semelhante para ambos. Os resultados médios para ambas as técnicas foram 244,8 ± 2,0 e 241,3 ± 3,7 mg e as recuperações obtidos foram de 97,9 ± 0,8 e 94,5 ± 1,5%, para o método eletroquímico e espectrofotométrico, respectivamente. Embora este trabalho tenha sido muito importante para o entendimento do comportamento eletroquímico da flutamida em diferentes técnicas polarográficas, muitos outros aspectos não ficaram esclarecidos, tais como o efeito do pH em uma faixa mais abrangente, o mecanismo de redução da flutamida, entre outros. Além disso ressalta-se que o eletrodo de trabalho empregado é um metal de elevada toxicidade, o que, do ponto de vista ambiental não é algo desejável.

O segundo trabalho empregando métodos eletroquímicos para determinação de flutamida em formulações farmacêuticas foi realizado quase dez anos depois por Lueje e colaboradores (1998). O autor usou um método polarográfico com o objetivo de investigar o comportamento eletroquímico da flutamida em uma ampla faixa de pH (2-12) em meios práticos e mistos. Os eletrodos escolhidos para as medições eletroquímicas foram os EGM como eletrodo de trabalho, o fio de platina como

contra eletrodo e o Ag/AgCl como eletrodo de referência. Além disso, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria – UV foram utilizadas como métodos comparativos de análise. Em relação ao estudo de pH em meio prótico ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão Britton-Robinson – BR/etanol 70/30), o mesmo revelou um pico catódico bem definido ($E_{pc} = -350 \text{ mV}$) para o pH 2, um E_{pc} irreversível em -750 mV para o pH 7 e um E_{pc} similar para o pH 12 com pico anódico (E_{pa}) em potencial de -350 mV . Em meio misto foi observado um pico irreversível bem definido em pH 2 similar ao do meio prótico. Já em pH 12, ocorreu um par reversível em -720 mV (E_{pa}) e -790 mV (E_{pc}). No estudo de repetibilidade, o coeficientes de variação de 1,65% (PPD), 0,08% (UV) e 1,04% (CLAE) foram obtidos, mostrando que as técnicas apresentam repetibilidade adequada. No estudo da reprodutibilidade, foram obtidos coeficientes de variação de 1,93%, 0,28% e 1,75% para as técnicas de PPD, UV e CLAE, respectivamente. Para verificar se o método proposto apresentou uma boa seletividade, ensaios de hidrólise (ácida, básica e neutra), fotólise, termólise e oxidação química foram realizados. Com base nos resultados concluiu-se que a flutamida foi termo e fotoresistente, mas, mostrou degradação em hidrólise ácida, básica e oxidação. As técnicas de CLAE e PPD foram capazes de discriminar entre os produtos de degradação e a flutamida, mostrando uma adequada seletividade, porém, esse resultado não foi observado por espectrometria UV. As três técnicas estudadas apresentaram uma precisão e exatidão adequadas e foram utilizadas para determinação de flutamida em comprimidos. Todavia, apesar dos autores proporem o desenvolvimento de um método sensível, seletivo, preciso e exato, nenhuma curva analítica foi mostrada, e a sensibilidade e o LOD não foram determinados.

Alternativamente, um eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com um filme polimérico, o ácido glutâmico, na presença de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi utilizado por Brahman e colaboradores (2012) para determinação voltamétrica de flutamida em formulações farmacêuticas. Primeiramente, os autores compararam o EPC não modificado com o EPC modificado por meio de VC empregando-se $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de flutamida em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato, pH 7,0, e observaram que o eletrodo modificado apresentou atividade eletrocatalítica frente ao analito e que houve um aumento da corrente de pico

significativo comparado com eletrodo limpo. O pico de redução em voltametria de pulso diferencial (VPD) foi obtido em $-0,75$ V (vs Ag/AgCl) em tampão de fosfato $0,3$ mol L⁻¹ (pH 7,0). O efeito da concentração do CTAB também foi estudado, revelando que a corrente do pico de redução aumentou de forma constante com o aumento da concentração de CTAB, atingindo o pico máximo em 1% e depois diminuiu continuamente. O estudo da velocidade de varredura no intervalo de 20-200 mV s⁻¹ mostrou que a corrente de pico anódica é proporcional à velocidade de varredura, o que sugere que a redução da flutamida sobre o EPC modificado é controlada por adsorção com processo irreversível. Verificou-se também que com o aumento do pH, os potenciais de pico foram deslocados para potenciais mais negativos, exercendo influência significativa na eletrorredução da flutamida. O método proposto mostrou uma linearidade no intervalo de concentração de $72,4 \times 10^{-6}$ – 579×10^{-6} mol L⁻¹, uma sensibilidade de $9,08 \times 10^{-3}$ A mol L⁻¹, com um LOD de $0,181$ μmol L⁻¹. Para indicar a precisão do método, os resultados obtidos foram comparados com o método espectrofotométrico UV-Vis, obtendo-se uma porcentagem média de recuperação de $100,2 \pm 0,1$ e $99,1 \pm 0,2$ e o desvio padrão relativo (DPR) de $0,40$ e $1,51$ por VPD e espectrofotometria UV-Vis, respectivamente. Este método foi aplicado para determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e os resultados mostraram uma boa recuperação para a espécie analisada (entre 99,65–101,54%). Os testes de repetibilidade, precisão, seletividade e robustez foram realizados obtendo-se resultados satisfatórios. Contudo, o grande problema no uso de um EPC, é que o mesmo não apresenta uma boa reprodutibilidade nas medidas, pois o preparo da pasta de carbono é algo que deve ser realizado de forma reprodutiva, o que nem sempre é possível.

Ahmadi e colaboradores (2015) modificaram um ECV com p-terc-butilcalix [4] areno e p-tert-butilcalix [6] areno pela deposição de Ag⁺ em um circuito de potencial aberto seguido pela redução eletroquímica da Ag⁺ para detecção de flutamida em formulações farmacêuticas. A presença do calixareno na superfície do eletrodo controla o tamanho das partículas e evita a aglomeração da Ag⁺. A VC foi usada para investigar o comportamento da redução da flutamida na superfície do ECV não modificado e modificado contendo nanopartículas de Ag (nano-Ag). Os resultados mostraram que a redução da flutamida no ECV não modificado ocorre de forma mais

demorada devido a lenta transferência de elétrons, enquanto que no ECV modificado contendo nano-Ag ocorre uma alta atividade catalítica em relação à flutamida. Os E_{pa} do analito no ECV não modificado foi de -0,7 V (vs. SCE) com uma corrente de pico de $-0,55 \mu\text{A}$. Já no ECV modificado com nano-Ag e com p-terc-butilcalix [4] areno e p-tert-butilcalix [6] areno a flutamida foi reduzida em -0,64 e -0,66 V (vs. SCE), respectivamente, com correntes de pico de -2,64 e -1,40 μA , respectivamente. Os parâmetros que influenciam a resposta do eletrodo, como, o efeito da concentração de calixereno, o potencial aplicado para a redução de Ag^+ , velocidade de varredura (v), o número de camadas de calixereno e o valor do pH e espécies interferentes foram investigados, chegando-se à conclusão de que as condições ótimas de trabalhos foram obtidas em tampão fosfato pH 6,0 com três camadas de calixereno numa concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e potencial aplicado ($E_{apl.}$) para a redução de Ag^+ no ECV modificado com calixereno foi de -0,3 V (vs. SCE). O estudo da velocidade na faixa de $10\text{--}200 \text{ mV s}^{-1}$ mostrou que o processo eletroquímico foi controlado por adsorção. Além disso, o potencial de pico da flutamida foi deslocado para valores mais negativos com o aumento velocidade. A técnica de VPD foi usada para quantificação de flutamida obtendo-se uma faixa linear de $10\text{--}1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um LOD de $9,33 \mu\text{mol L}^{-1}$. O eletrodo modificado também foi utilizado para detecção de flutamida em amostras de urina humana com resultados satisfatórios. Contudo, este método apresentou um alto LOD comparado com outros trabalhos (BRAHMAN *et al*, 2012; ENSAFI *et al*, 2016 e TEMERK; IBRAHIM; SCHUHMANN, 2016).

Temerk e colaboradores (2016) desenvolveram um método eletroquímico empregando a voltametria adsortiva de redissolução catódica com onda quadrada (VARCOQ) usando um eletrodo de lápis de grafite (ELG) renovável para a determinação individual e simultânea da flutamida e irinotecano (irino) em fluidos biológicos. Nestes estudos, avaliou-se o efeito do pH para ambas as espécies de forma individual na faixa de 3–11 em tampão BR seguido de pré-concentração por 60 s. Os resultados mostraram que há uma dependência do valor do pH para os analitos analisados individualmente, sendo os pHs 9 e 3 escolhidos para a determinação da flutamida e irino, respectivamente. Já no estudo feito simultaneamente com ambos os analitos o pH 5 mostrou uma melhor separação dos

picos com potencial de redução de -590 mV para a flutamida e - 950 mV para o irino. Um tempo de pré-concentração de 2 minutos com potenciais de pré-concentração de -0,6 V (flutamida) e -0,75 V (irino) foram usados para a determinação da flutamida e irino. A VARCOQ foi usada para a detecção destes fármacos, obtendo-se as seguintes faixas lineares: $3,98 \times 10^{-7} - 6,36 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,94 \times 10^{-8} - 4,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em relação a flutamida e irino, respectivamente. Os LOD obtidos foram $1,55 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (flutamida) e $1,68 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (Irino), já o LOQ foram de $5,16 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para flutamida e $5,63 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o irino. Para a determinação simultânea da mistura flutamida e irino a faixa linear de resposta foi de $1,99 \times 10^{-6} - 5,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com a sensibilidade de $2,9 \times 10^5 \text{ A mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$), LOD de $2,10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e LOQ de $6,89 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a flutamida e a faixa linear de $1,99 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} - 4,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com sensibilidade de $6,90 \times 10^{-6} \text{ A mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$), LOD de $2,17 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e LOQ de $7,25 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o irino. Os fármacos também foram determinados em urina e soro humano de forma simultânea, com recuperação de 98,46% para a flutamida e 97,11% para o irino em amostras de urina humana e uma recuperação de 96,46% (flutamida) e 98,53% (irino) em soro humano.

Outro estudo recente proposto por Ensafi e colaboradores (2016) foi a utilização um ELG modificado com um filme fino de sílica funcionalizada com grupos tióis para determinação eletroquímica de flutamida. Neste estudo, um método de pré-concentração acoplado à técnica eletroquímica (VPD) foi usado como "clean up". A flutamida foi extraída da solução e, em seguida, foi acumulada na superfície do eletrodo modificado revestido com dodecil sulfato de sódio (SDS), formando um par iônico (SDS-flutamida). Após extração, a espécie acumulada foi oxidada na superfície do eletrodo (a 0,20 V vs. Ag/AgCl em VPD). O potencial aplicado na formação do filme, o tempo de deposição na superfície do eletrodo, concentração de SDS e o efeito do pH também foram avaliados. Os resultados demonstraram que o E_{pc} de -1,10 V (vs. Ag/AgCl) e tempo 40 s foram suficientes para a formação do filme fino da sílica. A influência de concentração de SDS na eficiência da extração foi estudada na faixa de 4,0-10,0 mmol L⁻¹ com uma melhor resposta em 8,0 mmol L⁻¹ de SDS. O pH que apresentou a melhor resposta dentre a faixa analisada (2 a 5), tampão BR foi o pH 2,5, pois foi o mais eficiente para formação do par iônico. Outros

parâmetros essenciais para a determinação de flutamida, tais como, o tempo de extração (20 minutos), a velocidade de agitação (100 rpm), o pré-tratamento e potencial eletroquímico (0,25 V vs. Ag/AgCl) foram otimizados. Utilizando a técnica de VPD, obteve-se duas faixas lineares, uma com concentração de flutamida variando de 0,10-100 nmolL⁻¹ com sensibilidade de 0,0124 $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$ (n = 6, R² = 0,9965) e outra com concentração de 0,10-100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com sensibilidade de 0,0043 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ (n = 4, R² = 0,9975) e um LOD de 34 pmol L⁻¹. A técnica foi aplicada com sucesso para a determinação de flutamida em amostras de urina e plasma humano. Apesar do método proposto apresentar um baixo LOD (34 pmol L⁻¹), requer um tratamento prévio da amostra, tornando a determinação da flutamida demorada.

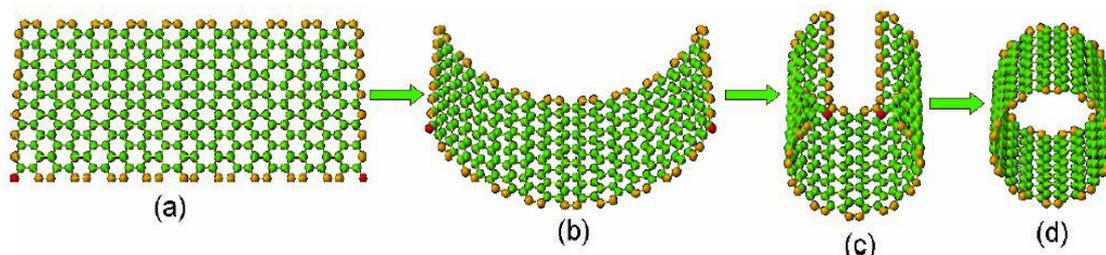
Através dos trabalhos descritos acima, observa-se que muitos deles não apresentam um sistema que permite a determinação da flutamida em baixas concentrações com uma ampla faixa linear, alta sensibilidade, estabilidade e baixos LOQ. Para desenvolver métodos que apresentem tais características, materiais como os nanotubos de carbono que possuem excelentes propriedades físico-químicas que favorecem sua utilização como modificadores em sensores eletroquímicos, torna-se uma alternativa interessante.

3.3. Nanotubos de Carbono

Os NC foram descobertos por Iijima em 1991, descrito como um novo tipo de estrutura finita de carbono em formato cilíndrico com dimensões nanométricas (IIJIMA, 1991). Desde de então, têm sido amplamente estudados por apresentarem características singulares, o que os tornam um material excepcional que pode ser utilizado em diferentes aplicações nas mais diversas áreas da ciência e da tecnologia (CHOU *et al*, 2004; AJAYAN; ZHOU, 2001).

Morfologicamente, um NC é uma molécula oca e alongada formada por paredes de folhas de grafeno enroladas com espessura de um átomo de carbono, que se assemelha à “favos de mel de uma colmeia” por apresentar configuração hexagonal (Figura 2). Os átomos de carbono estão interligados na rede por ligações covalentes do tipo sp² (SALES, 2013).

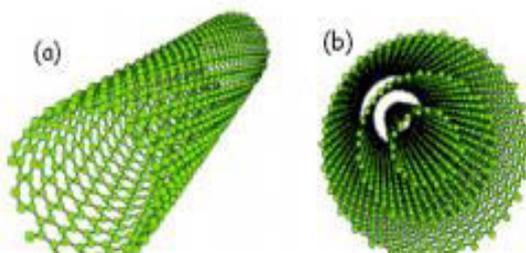
Figura 2- Representação esquemática da formação dos nanotubos de carbono. (a) folha de grafeno, (b) e (c) folha de grafeno sendo enrolado e (d) nanotubo de carbono formado.



FONTE: COUTO, 2006.

Existem duas formas estruturais dos NC, nanotubos de carbono de parede única ou simples (NCPS) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NCPM). Os NCPS (Figura 3(a)) podem ser considerados como uma espessa camada de folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico com diâmetro em torno de 1-2 nm e comprimento de até alguns micrometros. Já os NCPM (Figura 3(b)) compreendem um conjunto de três ou mais nanotubos concêntricos enrolados entre si com espaçamento entre dois nanotubos adjacentes de aproximadamente 3-40 Å, apresentam diâmetros de 10 a 50 nm com comprimentos maiores que 10 micrometros, sendo que suas propriedades estão diretamente ligadas ao número de camadas e ao seu diâmetro interno. (YADAV; SINGH, 2016; ZARBIN, 2007). As estruturas e caracterizações dos NCPS e os NCPM estão resumidos na Tabela 1, de acordo SINGH *et al*, 2012.

Figura 3: (a) Representação de um nanotubo de carbono com parede simples e de um nanotubo de carbono com paredes múltiplas(b).



FONTE: ZARBIN, 2007.

Tabela 1: Comparação entre os nanotubos de carbono de parede única (NCPS) (A) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NCPM) (B)

NCPS	NCPM
Única folha de grafeno	Múltiplas folhas de grafeno
O catalisador é necessária para síntese	Pode ser produzido sem catalisador
Síntese em massa é difícil, pois requer controle adequado sobre o crescimento e condições atmosférica	A síntese em massa é fácil
Há uma maior chance de defeitos durante a funcionalização	Menos defeitos durante a funcionalização, mas quando acontece é difícil de melhorar.
Menos pureza	Alta pureza
Menos acumulação em sua estrutura	Mais acumulação em sua estrutura
Fácil caracterização e avaliação	Difícil caracterização e avaliação, pois possui uma estrutura muito complexa
Facilmente torcido e mais susceptíveis a isso	Difícil de promover a torção

FONTE: Adaptado SINGH *et al*, 2012.

3.3.1. Propriedades dos Nanotubos de Carbono

Os NC são materiais unidimensionais que possuem características diferenciadas por apresentar estrutura incomum. As suas propriedades estão diretamente relacionadas com sua quiralidade, diâmetro e a quantidade de camadas que os nanotubos possuem. Dentre as diversas propriedades do NC, as propriedades eletrônicas se destacam, já que os mesmos podem ser de caráter metálico ou semicondutor dependendo da forma em que a folha de grafeno é enrolada para formação do tubo.

Devido a estrutura unidimensional dos nanotubos, o transporte eletrônico tanto dos NCPS quanto os NCPM metálicos ocorre de forma balística, ou seja, os elétrons são transportados sem qualquer resistência ao longo do tubo, permitindo assim transportar correntes elevadas sem nenhum tipo de aquecimento (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; HEER, 2002).

As propriedades mecânicas diferenciadas dos nanotubos estão relacionadas

às suas ligações carbono-carbono sp^2 as quais apresentam duzentas vezes mais força e cinco vezes mais elasticidade que o aço, sendo um dos materiais mais resistentes e flexíveis que existe, podendo ser tensionado e dobrado sem sofrer nenhum dano a sua estrutura (ZARBIN, 2013; IMTIAZ *et al*, 2016).

Em virtude das propriedades acima destacadas e por apresentar uma alta estabilidade química, os NC podem ser aplicados para os mais diversos fins, incluindo aplicações medicinais como transportadores farmacológicos dispositivos para armazenamento e conversão de energia, aditivos para materiais poliméricos, adsorventes de metais pesados em efluentes e sensores eletroquímicos (HERBST, 2004; LIMA *et al*, 2016). O desenvolvimento de sensores eletroquímicos empregando NC tem permitido amplificação do sinal analítico através do aumento da área superficial e também, em alguns casos, tem promovido uma maior seletividade (SALMANIPOUR *et al*, 2013; HU; HU, 2009).

3.3.2. Sensores eletroquímicos à base de nanotubos de carbono

Um sensor eletroquímico pode ser definido como um dispositivo que tem por finalidade fornecer informações analíticas as quais são obtidas a partir de um sinal elétrico, que resulta da interação química de um analito alvo e a camada de reconhecimento biológico ou químico (receptor) com o componente de detecção (transdutor). Essa informação ocorre em tempo real e em *in situ* (WANG; ROGERS, 1995; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

As propriedades físicas e catalíticas dos NC o tornam um material ideal para utilização em sensores eletroquímicos devido sua elevada condutividade elétrica, ótima estabilidade química e eletroquímica e grande resistência mecânica. Por isso, um grande número de trabalhos são reportados na literatura sobre aplicações de NC como materiais de eletrodo ou modificadores de eletrodos convencionais para diversas finalidades. Com por exemplos, pode-se mencionar a determinação de metais pesados (SUN *et al*, 2007), sensores de gás (VALENTINI *et al*, 2004), detecção de biomoléculas, especialmente glicose (LI *et al*, 2009) e neurotransmissores (SWAMY; VENTON, 2007). Há também muitos artigos que relatam com sucesso a detecção de proteínas (GONG *et al*, 2004), DNA (YAPASAN

et al, 2010), marcadores biológicos (KIM *et al*, 2009), células (SOLANKI *et al*, 2008) e microrganismo (VILLAMIZAR *et al*, 2008). Contudo, neste trabalho, daremos ênfase ao uso de sensores à base de NC para a determinação de substâncias farmacêuticas.

A primeira aplicação dos NC em eletroquímica foi de Britto e colaboradores (1996), onde um EPC foi construído com NCPM dispersos em bromofórmio para estudar a oxidação da dopamina (DA). O eletrodo à base de NCPM apresentou uma boa resposta eletroquímica para detecção do neurotransmissor cuja oxidação ocorreu em baixo potencial, $E_{pa} = 0,22 \text{ V}$ (vs SCE), com transferência de elétron muito mais rápida do que os observados para os eletrodos de grafite. O estudo da velocidade na faixa de $20\text{--}200 \text{ mV s}^{-1}$ mostrou que o processo eletroquímico foi controlado por difusão. A técnica para a quantificação de DA foi a VPD obtendo-se uma faixa linear de $200 - 1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Este primeiro estudo demonstrou que os NC possuem propriedades eletrocatalíticas iguais ou superiores a muitos outros materiais usados como modificadores.

Um ECV modificado com NCPM também foi empregado para a detecção de nimesulida (Zhang *et al*, 2010), o que resultou em um aumento da sensibilidade de cerca de 7 vezes em comparação ao ECV não modificado. O potencial de pico de redução da nimesulida foi deslocado de $-0,665 \text{ V}$ em um ECV não modificado para $-0,553 \text{ V}$ em um ECV modificado com NCPM. A faixa linear obtida foi de $3,2 \times 10^{-7} - 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9992$) com um LOD de $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O comportamento eletroquímico da nimesulida foi estudado e o coeficiente de transferência de elétrons ($\alpha = 0,45$), número de prótons $nX = 1$) e o número de transferência-eletrônica ($n = 2$) foram determinados. Este método foi usado para determinar o teor de nimesulida em comprimidos. A recuperação obtida variou entre 93,2 a 106,2% por meio de método de adição padrão.

Um eletrodo de grafite pirolítico confeccionado com o plano “edge” (EGPE) modificado com NCPS foi usado para determinação de paracetamol (GOYAL; GUPTA; CHATTERJEE, 2010). Através da VC e VOQ verificou-se que a oxidação do paracetamol na superfície do eletrodo ocorreu de forma quase reversível e fundamentalmente controlada por adsorção. Estes resultados revelam claramente que o NCPS atua como um promotor muito eficaz para melhorar a cinética da

oxidação eletroquímica do paracetamol. Além disso, a sensibilidade do EGPE modificado com NCPS foi duas vezes maior do que o EGPE modificado com NCPM. O EGPE modificado com NCPS apresentou um pico de oxidação para o paracetamol em um potencial de 187 mV, sendo este bem menor comparado ao potencial observado no EGPE modificado com NCPM (259 mV) e EGPE não modificado (372 mV), mostrando assim que os NC exibem eletrocatalise eficiente para a oxidação do paracetamol. Além da atividade eletrocatalítica dos NC frente ao analito estudado, a melhor resposta do EGPE modificado com NCPS em relação ao EGPE modificado com NCPM também pode ser atribuída à diferença na área de superfície de ambos os eletrodos modificados em comparação ao eletrodo não modificado.

Além da determinação individual de espécies, os nanotubos também podem ser utilizados para análises simultâneas, como por exemplo a determinação voltamétrica simultânea de DA e acetaminofeno (AF) usando um ECV modificado com NCPM funcionalizado (NCPM-COOH) (ALOTHMAN *et al*, 2010). Os autores usaram a técnica VC para a caracterização do material modificador e a técnica VDP para a determinação simultânea de DA e o AF em 125 e 307 mV, respectivamente, com grande sensibilidade. Os autores atribuíram os resultados obtidos à grande área superficial dos NCPM funcionalizados e à sua forte capacidade de adsorção de moléculas. Sob as condições experimentais otimizadas a DA e o AF apresentaram faixas lineares de trabalho de 3-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,992$) e 3-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,989$), respectivamente com limites de detecção de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a DA e 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AF. Possíveis interferentes, tais como, ácido ascórbico, ácido úrico e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo na forma reduzida não mostraram nenhuma interferência na determinação simultânea de DA e AF. O método proposto apresentou boa estabilidade, reprodutibilidade, repetibilidade e elevada recuperação dos analitos em formulações farmacêuticas e soro humano.

Felix e colaboradores (2016) utilizou NCPM para modificar a superfície de um eletrodo de ouro feito a partir de um disco compacto gravável (CD-R) o qual foi utilizado para a quantificação amperométrica de terbutalina em produtos farmacêuticos e em regime de fluxo. Os autores obtiveram uma faixa linear para terbutalina de $3,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} (a 0,63 V vs Ag / AgCl). Os LOD e LOQ

encontrados foram de $5,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na análise de amostras de xarope comercial, e todos os resultados foram concordantes com os obtidos por CLAE e espectrometria de massa acoplada a eletroforese capilar

Outro exemplo de desenvolvimento de um sensor para determinação de um fármaco é o uso do ECV modificado com NCPM para quantificação de metildopa (KUTLUAY; ASLANOGLU, 2016). Neste estudo, o comportamento voltamétrico cíclico de metildopa foi melhorado com o aumento da quantidade de NCPM na superfície do eletrodo. Os resultados obtidos por VOQ mostraram que a corrente de pico foi proporcional a concentração de metildopa em uma faixa de concentração de $0,005\text{-}0,388 \text{ mmol L}^{-1}$ e um LOD de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. O método foi aplicado com sucesso para a determinação da metildopa em produtos farmacêuticos.

3.4. Validação de Métodos Analíticos

Segundo Brito e colaboradores (2003), o desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação. Um método só é considerado válido se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Por isso, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação é confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido.

Ribani e colaboradores (2004) ressaltam que a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecido e exigido, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis.

A fundamentação da validação de um método ocorre por meio de estudos sistemáticos realizados em laboratório, que devem ser guiados pelas normas

estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais. No Brasil, há duas agências credenciadoras, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos verificam a competência dos laboratórios de análise, os quais também disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 889, de 25/05/2003 e o documento INMETRO DOQ- CGCRE-008, de julho/2011.

A validação de um procedimento analítico pode ser atestada através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito. Conforme Monteiro e colaboradores (2006) as principais figuras de mérito geralmente utilizados para a validação de métodos analíticos são: seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

A exatidão de um método pode ser definida como sendo a capacidade de um método analítico em dar resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro. O INMETRO, define como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

As principais metodologias para avaliar a exatidão de um método estão disponíveis, como: materiais de referência certificado, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrão (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Ela é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. Também pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as medidas e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003), sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\% \text{Rec.} = \frac{[\text{Concentração média experimental} \times 100]}{[\text{Concentração teórica}]} \quad (1)$$

A exatidão deverá ser estabelecida ao longo de toda a faixa de calibração especificada para o procedimento analítico somente após a precisão e a linearidade terem sido estimadas (ICH, 2005). A ANVISA estabelece que a exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata.

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes obtidos em condições independentes. Ele é normalmente especificado em termos de desvio padrão absoluto (s), ou DPR, também conhecido como coeficiente de variância (CV) (THOMPSON, 2002).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (3)$$

Onde, \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de \bar{x} , a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A ANVISA admite como valor máximo de 5 % para os cálculos de desvio padrão absoluto e DPR. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade ou repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho. As condições de repetitividade são caracterizadas utilizando o mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível (INMETRO, 2011).

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa,

média e alta, com três replicadas cada ou mínimo de seis determinações a 100 % da concentração do teste (Brasil, 2003).

Ribani e colaboradores (2004), destaca que a repetitividade não deve ser confundida com a precisão experimental, que é a medida sequencial da mesma amostra (geralmente 10 repetições), seguida pela área ou altura do pico e determinação da estimativa do DPR.

A precisão intermediária está relacionado à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo uma ou mais condições a variar. Dentre estas condições estão diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (INMETRO, 2011). A ANVISA recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas distintos para a determinação da precisão intermediária.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, ou seja, é a precisão inter-laboratorial (BRASIL, 2003). A reprodutibilidade pode ser conceituada também, para uma amostra, quando esta é analisada por instrumentos diferentes, obtendo-se desvio aceitável e compatível.

A seletividade pode ser definida como a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros (PASCHOAL *et al*, 2008). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

O termo seletividade e especificidade são muitas vezes usados como sinônimos, pois ambos mostram a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Para alguns autores o termo especificidade se refere a um método específico para um único analito, enquanto que a seletividade diz respeito a um método que permite a análise de várias substâncias químicas que podem ou não ser distinguíveis. Porém, são poucos os métodos que respondem a um único analito, por isso, o termo seletividade é mais apropriado (CHASIN *et al*, 1998).

As recomendações do INMETRO para avaliar a seletividade de um método analítico são: analisar um branco de reagentes, analisar o padrão, analisar a amostra com e sem o analito de interesse (placebo). Caso o placebo não seja disponível, fazer acréscimo controlado de padrão sobre a amostra e avaliar a amostra na presença de interferentes, ou seja, introduzir elementos que provoquem “stress”.

Após as análises, deve-se verificar se a presença de interferentes pode levar a uma identificação falsa; a identificação do analito alvo é prejudicada pela presença de um ou mais interferentes ou, a quantificação é notadamente influenciada pela presença de um ou mais interferentes.

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero, ou do ruído de fundo. O LOD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecida (PASCHOAL *et al*, 2008). O LOD pode ser expresso pela equação abaixo:

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{\hat{s}}{b} \quad (4)$$

onde \hat{s} é a estimativa do desvio padrão das respostas do branco e b é a inclinação ou coeficiente de regressão angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LOQ) de um procedimento analítico é classificado como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão adequada (MAPA, 2011). Assim como para o LOD, o LOQ também pode ser obtido utilizando o valor da inclinação da curva de calibração, conforme a expressão:

$$\text{LOQ} = 10 \frac{\hat{s}}{b} \quad (5)$$

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , é linearmente proporcional à sua concentração,

denominada variável independente x_i , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração (RIBEIRO *et al*, 2008).

A ANVISA recomenda que a linearidade seja pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Caso haja relação linear aparente após o exame visual do gráfico, os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos adequados para a determinação do coeficiente de correlação, intersecção com eixo Y, coeficiente angular e a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. Destacando que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação, R, dever ser 0,99.

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (BRITO *et al*, 2003). Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico, expressado como:

$$S = \frac{\partial y}{\partial x} \quad (6)$$

Nos métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido (CURRIE, 1995). A sensibilidade é tanto maior quanto maior for a inclinação da curva analítica construída. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método é considerado robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros analíticos. Sua avaliação deve ser considerada durante o desenvolvimento da metodologia e, constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (RIBANI *et al*, 2004).

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer CV, análise de variância ANOVA e teste *t Student*. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relativamente à sua precisão.

Por fim, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. A lactose mono-hidratada, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio, celulose, amido, glicose, ácido ascórbico, dextrose, talco, vitamina B6, dicloridrato N-(1-Naftil) de etilenodiamina (NEDA), nitrito de sódio, RSL, ácido sulfâmico, HCl, zinco metálico, ácido sulfúrico, flutamida e dimetilformamida (DMF) foram comprados da Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA. O ácido bórico, ácido cítrico, fosfato dissódico e monossódico (Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4), foram adquiridos da Synth, São Paulo, Brasil. A ureia, cloreto de sódio, difosfato de potássio, creatinina, cloreto de cálcio dihidratado e hidróxido de sódio foram comprados da Insofar, Rio de Janeiro, Brasil. O compósito NCO-OG foi sintetizado por Zanin e colaboradores.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em um sistema OS100LXE adquirido da Companhia GEHAKA (Gehaka Ltda., São Paulo, SP, Brasil) com resistividade maior ou igual a 18.2 M Ω . Para medir o pH das soluções-tampão, utilizou-se um pHmetro QUIMIS modelo Q400AS.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente com a diluição adequada das soluções estoque. A solução tampão fosfato foi preparada a partir de Na_2HPO_4 ou NaH_2PO_4 0,1 mol L⁻¹, e o pH ajustado com soluções 0,1 mol L⁻¹ de HCl ou 0,2 mol L⁻¹ de NaOH. A solução tampão BR (0,1 mol L⁻¹) foi preparada por uma mistura do ácido acético, ácido bórico e uma solução de ácido ortofosfórico de forma que a concentração final da solução fosse 0,1 mol L⁻¹ com uma quantidade apropriada de uma solução de NaOH para ajustar o pH. A solução tampão McIlvaine (0,1 mol L⁻¹) foi preparada a partir de Na_2HPO_4 0,1 mol L⁻¹, e o pH foi ajustado com uma solução 1,0 mol L⁻¹ de ácido cítrico.

4.2. Instrumentação

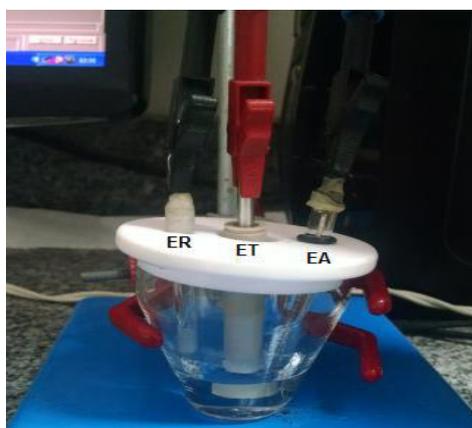
As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab® modelo PGSTAT 128 N da *Echo Chemie* (Utrecht, The Netherlands) (Figura 4), acoplado a um microcomputador com o *software* GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

Figura 4: Potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128 N utilizado para as medidas eletroquímicas. Disponível em: <<http://www.metrohautomolab.com/Products/Echem/>>. Acesso em 03 agos. 2016.



As respostas eletroquímicas de potenciais e correntes de pico foram obtidas pelas técnicas de VC e VOQ. O sistema utilizado para obtenção de medidas foi constituído de uma célula eletroquímica com capacidade de 10,0 mL com entrada para três eletrodos: o eletrodo de Ag/AgCl(sat.), contendo 3 mol L⁻¹ de KCl como eletrodo de referência, um eletrodo de ouro como auxiliar e um ECV (modificado e não modificado) como eletrodo de trabalho (Figura 5).

Figura 5: Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas ER= Eletrodo de referência, ET= Eletrodo de trabalho e EA= Eletrodo Auxiliar.



As imagens de MEV foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da JEOL modelo JSM-6510LV (Figura 6).

Figura 6: Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6330F. Disponível em: <<http://www.labx.com>>. Acesso em 09 agos. 2016.



A caracterização dos materiais à base de carbono foi realizada empregando-se um espectrômetro Raman modelo microsonda Renishaw (Figura 7).

Figura 7: Espectrômetro Raman modelo da microsonda Renishaw. Disponível em: <<http://www.renishaw.com.br>>. Acesso em 09 agos. 2016.



4.3. Síntese e Esfoliação do compósito nanotubos de carbono oxidado e óxido de grafeno (NCO-OG)

O compósito NCO-OG foi preparado de acordo com a Literatura (ZANIN *et al*, 2014; ZANIN *et al*, 2015). Em resumo, os NC em pó foram preparados usando-se uma mistura de cânfora (85%) e ferroceno em um forno por deposição térmica de vapor químico (chemical vapour deposition, CVD). A mistura foi vaporizada a 220°C em uma antecâmara e seus vapores foram carregados por um fluxo de gás nitrogênio para a câmara do forno de CVD numa temperatura de 850°C a pressão atmosférica. Os vapores foram rapidamente inseridos na câmara, onde foram convertidos em pó de NC (Zanin *et al*, 2014). O tempo decorrido durante o processo usado para produzir o NC foi de apenas alguns minutos.

Os NC previamente obtidos foram tratados por plasma de oxigênio por 10 minutos. As amostras funcionalizadas com oxigênio foram denominadas nanotubos de carbono oxidados (NCO). Um tratamento ácido foi utilizado para remover as partículas catalíticas dos NCO em pó. As amostras foram submetidas a um processo de sonicação por 5 h em HCl 10 mol L⁻¹ e em seguida foram lavadas em água e secas. Para incorporar os grupos contendo oxigênio foi empregado um reator de plasma de corrente contínua pulsada a uma pressão de 300 mTorr, -900 V e com frequência de pulso de 20 kHz. O pó de NCO foi oxidado usando uma agitação *in situ* permitindo que o plasma de oxigênio alcançasse tridimensionalmente as amostras. O material foi então denominado NCO-OG (nanotubos de carbono oxidado e óxido de grafeno), o qual foi desaglomerado durante o processo. Este sistema de agitação funciona como um cátodo oco formando um denso plasma de oxigênio em todo o seu volume interno.

4.4. Preparo do eletrodo modificado com o compósito NCO-OG

A modificação da superfície do ECV foi realizada de acordo com o Esquema mostrado na Figura 8. Primeiramente, ECV foi polido com alumina para remoção de qualquer material aderido (BARD, 2001). Em seguida, o ECV foi modificado com 10 µL da suspensão preparada através da mistura de 1,0 mg de NCO-OG e 500 µL

DMF. Esta suspensão foi colocada diretamente sobre a superfície do ECV que foi deixado para secar na estufa a 50 °C durante 20 minutos. O eletrodo modificado foi chamado de ECV/NCO-OG. Por fim, o eletrodo modificado foi lavado cuidadosamente com água destilada para eliminação de quaisquer espécies não adsorvidas e colocado na célula para a realização das medidas eletroquímicas.

Figura 8: Esquema ilustrativo da modificação da superfície do ECV com o compósito NCO-OG.



4.5. Caracterização do compósito NCO-OG

Com o objetivo de caracterizar o compósito, imagens de MEV de 20-30 kV dos NCO-OG foram obtidas, assim como espectros Raman empregando um laser de argônio para a excitação ($\lambda=514,5$ nm) com uma potência de laser de cerca de 6 mW.

4.6. Estudo do comportamento eletroquímico do ECV/NCO-OG

O comportamento eletroquímico do ECV não modificado e modificado com o compósito NCO-OG foi avaliado por VC na presença de flutamida. Todos os

voltamogramas foram obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), a uma velocidade de varredura, v , de 0,05 V s⁻¹.

4.7. Estudos relacionados ao processo de Oxidação/Redução de Flutamida sobre o ECV/NCO-OG

Informações adicionais sobre o processo de oxidação/redução de flutamida na superfície do ECV/NCO-OG foram obtidos através da avaliação de VCs em diferentes velocidades (0,01 – 0,1 V s⁻¹.) utilizando-se 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito de suporte, flutamida na concentração de 0,4 mmol L⁻¹ e o ECV modificado com compósito NCO-OG nas concentração de 2 mg mL⁻¹.

4.8. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais do sistema eletroquímico

Buscando proporcionar um melhor desempenho ao sensor proposto, os parâmetros experimentais e operacionais do sistema que influenciam a sensibilidade da técnica, a estabilidade e o perfil da resposta analítica foram investigados e otimizados.

4.8.1. Parâmetros experimentais

Após verificar o comportamento voltamétrico da flutamida frente ao ECV modificado e não modificado, realizou-se o estudo da influência do pH do meio sobre o processo de oxidação/redução do analito utilizando a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ numa faixa de 4,0 a 7,0 a fim de obter o sistema que apresentasse o melhor perfil voltamétrico. Em seguida, estudou-se o comportamento de flutamida nos tampões McIlvaine, Fosfato, e BR, ambos no mesmo valor otimizado de pH.

4.8.2. Parâmetros operacionais

Para a escolha da melhor técnica de voltametria de pulso a ser utilizada na determinação de flutamida, foram construídas curvas analíticas utilizando a VPD e VOQ a fim de se avaliar qual destas técnicas seria a mais adequada para a construção da curva analítica final para a determinação de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial. Após a escolha da melhor técnica, os parâmetros operacionais foram estudados e otimizados.

4.9. Caracterização analítica do sensor para a determinação de flutamida

A curva analítica final para a determinação de flutamida em amostra farmacêutica e amostras de urina artificial foi construída empregando a técnica de voltametria de pulso mais adequada para esse fim. O gráfico da corrente de pico catódica em função da concentração da flutamida foi obtido em uma ampla faixa linear de trabalho. Os LOD, LOQ e a sensibilidade da curva analítica também foram determinados.

4.10. Preparo das amostras farmacêuticas e urina artificial para as medidas eletroquímicas

Para o preparo das amostras farmacêuticas foram macerados 5 comprimidos até obtenção de um pó fino. Os comprimidos em pó equivalente a 250 mg de flutamida foram pesados com precisão e transferidos para uma proveta de 100 mL e dissolvidos em acetato de etila. A solução foi filtrada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. Uma alíquota de 10 μL de cada amostra foi adicionada à célula eletroquímica contendo 5 mL de uma solução tampão BR numa concentração 0,1 mol L^{-1} , pH 5,0 para análise. O mesmo procedimento foi realizado em triplicata, com as amostras diluídas 500 vezes (10 μL de amostra / 5 mL de eletrólito).

A utilização do método proposto em amostras de urina artificial também foi investigada por análise direta da flutamida em duas diferentes formas de preparo das amostras de urina conforme descrito nos procedimentos a seguir:

Procedimento para a amostra A: A urina artificial foi preparada em água destilada com os seguintes componentes e concentrações finais: ureia $0,33 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de sódio $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, difosfato de potássio $0,016 \text{ mol L}^{-1}$, creatinina $0,007 \text{ mol L}^{-1}$ e monofosfato de sódio $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ (ADLER; HURLEY; STRATHMANN, 2014).

Procedimento para a amostra B: Neste procedimento a amostra de urina artificial foi preparada utilizando-se os seguintes componentes e concentrações finais: ureia $0,411 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de potássio $0,0268 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de sódio, sulfato dissódico $0,0513 \text{ mol L}^{-1}$, fosfato de potássio $0,014 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de amônio $0,0186 \text{ mol L}^{-1}$, de cloreto de cálcio dihidratado $0,0068 \text{ mol L}^{-1}$. (LAUBE *et al*, 2001). Em ambos os procedimentos o pH da amostra foi de $6,6 (\pm 0,1)$.

4.11. Determinação eletroquímica de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial empregando o ECV/NCO-OG e testes de adição e recuperação

A quantidade de flutamida nas amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial foi determinada pelo método de adição padrão, utilizando-se $5,0 \text{ mL}$ de solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) contida na célula eletroquímica, onde foram adicionadas as amostras, com posteriores adições sucessivas do analito ($10,0$, $20,0$, μL) a partir de uma solução padrão estoque de flutamida de concentração 5 mmol L^{-1} . Quantidades conhecidas do analito foram adicionadas em diferentes níveis em uma amostra que continha uma quantidade (desconhecida) da substância. Construiu-se uma curva analítica relacionando as quantidades de flutamida adicionadas à amostra com os respectivos sinais analíticos obtidos. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde ao sinal analítico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada (BERG; MURTA; KUGLES, 1988).

A porcentagem de recuperação foi dada pela razão entre a concentração de flutamida total de flutamida encontrada (amostra + padrão adicionado) e a concentração total esperada multiplicada por 100. Os testes de adição e recuperação foram realizados em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

É importante ressaltar que todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente.

4.12. Estudos de Interferentes

A interferência de espécies químicas como lactose mono-hidratado, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, celulose, amido, glicose, ácido ascórbico, dextrose, talco e vitamina B6, que podem ser encontradas em formulações farmacêuticas tais como as analisadas, ou mesmo em fluidos biológicos, foi verificada através da medida da intensidade de sinal analítico para uma solução de flutamida de concentração conhecida, com posterior comparação desse sinal com outro obtido em solução analito: interferente na proporção 1:1. O estudo foi realizado nas condições experimentais e operacionais otimizadas e as medidas foram realizadas em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

4.13. Validação do Sensor Proposto

Os parâmetros requeridos para validação do sensor proposto foram feitos com base nas seguintes figuras de mérito: exatidão, precisão, seletividade, LOD, LOQ e linearidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

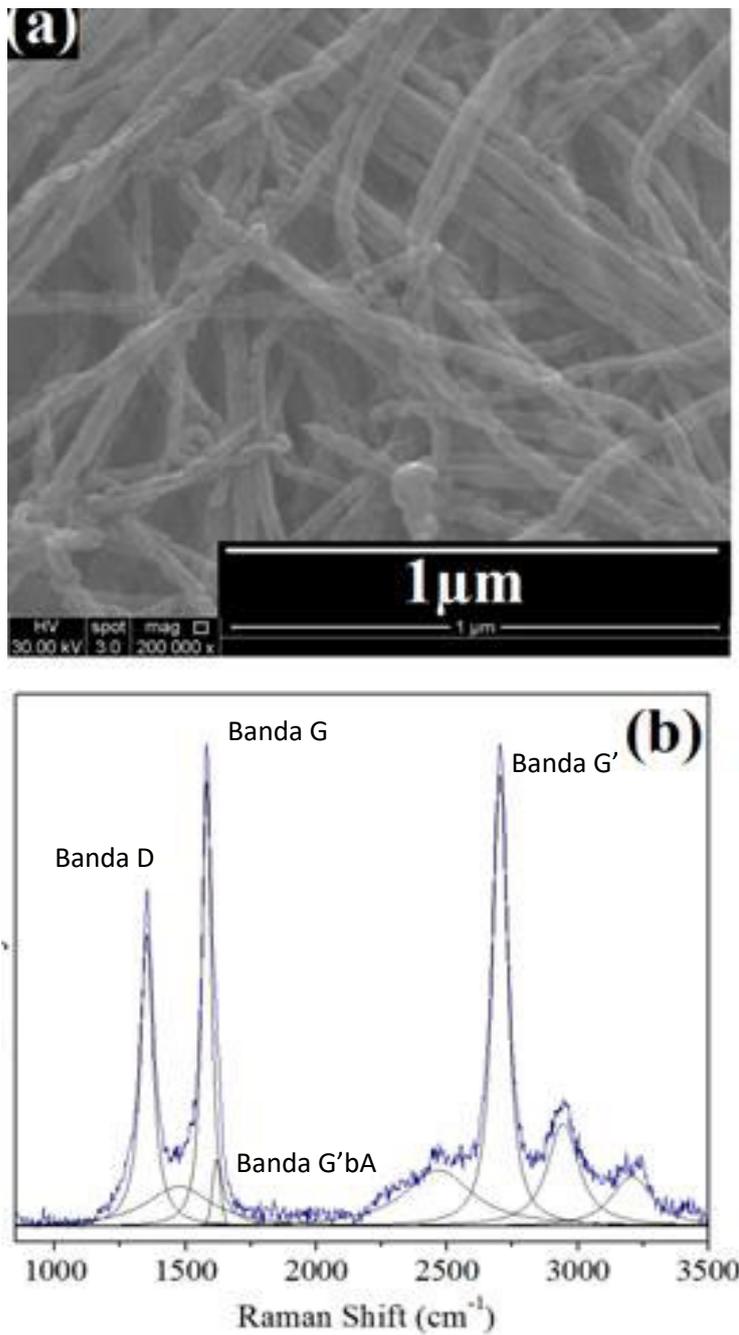
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do compósito NCO-OG por MEV e espectroscopia Raman

Os detalhes da caracterização do compósito NCO-OG foram muito bem discutidos em outros trabalhos (ZANIN *et al*, 2014; MOREIRA *et al*, 2016). Resumidamente neste trabalho, a Figura 9 (a) mostra a caracterização morfológica de NCO-OG realizada por MEV. Pode-se observar que o plasma de oxigênio modificou as paredes dos nanotubos pela introdução de grupos funcionais contendo oxigênio.

A Figura 9 (b) mostra os espectros Raman de primeira e segunda ordem da amostra NCO-OG. A simulação da curva foi realizada usando-se a função Lorentzianas para as bandas D (1350 cm^{-1}) e G (1580 cm^{-1}) e 1618 cm^{-1} (ombro D'), e função gaussianas para a banda larga em torno de 1480 cm^{-1} , que é atribuída aos grupos polares ligados à paredes dos NC. A banda D provém de um processo duplo de ressonância envolvendo fônons e defeitos. A banda G é atribuída a um dos dois modos E_{2g} correspondente aos estiramentos vibracionais no plano basal (domínio sp²) do cristal simples de grafeno ou grafite nonocristalina. A banda G' (2700 cm^{-1}) é derivada de sua harmônica (2D) de segunda ordem. Quanto maior a intensidade da banda G' maior será a cristalinidade do carbono sp². Nos espectros Raman (dados não apresentados) (ZANIN *et al*, 2014; MOREIRA *et al*, 2016), após tratamento com plasma de oxigênio, as curvas C 1s foram deconvoluídas em seis picos, em torno de 284,1, 285,4, 287,1, 288,7, 290,1 e 291,6 eV. Os picos correspondem a carbonos alifáticos (hibridação sp²), defeitos, átomos de carbono com C-O, -C = O, carbonatos e transições π - π^* , respectivamente. A partir das curvas C 1s observamos o aumento da quantidade e defeitos dos grupos contendo oxigênio, de acordo com os espectros de Raman. Isto infere a formação de fortes ligações C-O a partir dos grupos contendo oxigênio que estão situados ao longo dos NC. Os dados obtidos com XPS (dados não mostrados) mostram que três picos deconvoluídas em cerca de 535, 534 e 531 eV correspondem aos grupos C-O, COOH e C-OH.

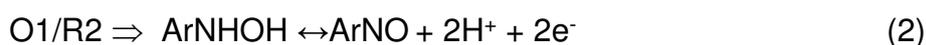
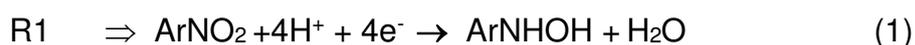
Figura 9: (a) MEV e (b) Espectro Raman do NCO-OG.



5.2. Comportamento eletroquímico da flutamida sobre o ECV/NCO-OG

Inicialmente, buscando-se conhecer o comportamento voltamétrico da flutamida sobre o ECV não modificado (Figura 10a) e sobre o ECV/NCO-OG (Figura 10b) utilizou-se uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, contendo 0,4 mmol L⁻¹ de flutamida, com a qual fez-se varreduras de potencial num intervalo de -1 a 0,5 V vs Ag/AgCl numa velocidade de varredura (ν) de 0,05 V s⁻¹.

Sendo assim, numa primeira etapa, para compreender melhor o perfil voltamétrico da flutamida sobre o ECV não modificado (Figura 10a) realizou-se VCs na direção anódica (curvas 1 e 2: primeiro e segundo ciclos, respectivamente) e na direção catódica (curvas 3 e 4: primeiro e segundo ciclos, respectivamente). Notou-se em ambos os casos um par de pico redox bem definido, onde o pico de oxidação (O1) surge em +120 mV vs Ag/AgCl e o pico de redução (R2) em -140 mV vs Ag/AgCl o que proporciona uma diferença de potencial entre eles de +260 mV vs Ag/AgCl, enquanto que o pico R1 aparece em -600 mV vs Ag/AgCl. O pico R1 ocorre devido à redução do grupo nitro (-NO₂) da flutamida na superfície do eletrodo à hidroxilamina (-NHOH) via 4 elétrons (REDDY *et al*, 2011). O par redox R2/O1 ocorre devido à reversível oxidação/redução de dois elétrons do grupo hidroxilamina (-NHOH) ao grupo nitroso (-NO) (REDDY *et al*, 2011):



Por outro lado, os VCs do ECV/NCO-OG da Figura 10b (curvas 1-4) mostram o pico O1 em -34 mV vs Ag/AgCl e o pico R2 em -89 mV vs Ag/AgCl com uma diferença de potencial de pico entre eles de apenas 55 mV vs Ag/AgCl, enquanto que o pico R1 aparece em -60 mV vs Ag/AgCl. A partir do segundo ciclo e sob as mesmas condições, se as varreduras anódica e catódica ocorrerem antes de -60 mV (localização do pico R1), por exemplo entre -400 mV e 400 mV vs Ag/AgCl, o par redox (O1/R2 ou R2/O1) desaparecerá. Estes resultados sugerem que este par redox resulta da redução eletroquímica do pico R1, sendo, portanto, necessário ativar o grupo NO₂, realizando-se uma varredura de potencial de -1000 mV vs

Ag/AgCl para +400 mV vs Ag/AgCl (direção anódica) ou de +400 mV vs Ag/AgCl para -1000 mV vs Ag/AgCl (direção catódica).

Na Figura 10b, as curvas 1 e 2, referentes à primeira e segunda varreduras de potencial realizadas no sentido anódico apresentam os mesmos valores de corrente, demonstrando que já a partir do primeiro ciclo o sensor apresenta grande estabilidade. Porém, este comportamento não é observado nas curvas 3 e 4, para as quais fez-se varredura de potencial no sentido catódico. Neste caso, observa-se que as correntes faradaicas foram bem diferentes sugerindo que a varredura anódica é mais apropriada para as análises da flutamida. Portanto, utilizou-se a varredura anódica de potencial para os demais estudos.

A Figura 11 mostra a comparação entre os VCs da flutamida obtidos com o ECV não modificado (curva 1) e ECV modificado com NCO-OG (curva 2), ambos realizados nas mesmas condições experimentais das Figuras 10a e 10b. Os voltamogramas mostram que a redução da flutamida é mais eficiente quando o eletrodo é modificado com o compósito NCO-OG. As correntes de pico observadas para o par redox O1/R2 na Figura 11, curva 2, são quase três vezes maiores que as correntes observadas no ECV não modificado (Figura 11, curva 1). Estes resultados sugerem que os nanotubos de carbono oxidados funcionalizados com o óxido de grafeno promovem uma menor resistência à transferência de carga para a flutamida promovendo uma melhor eficiência no seu processo redox.

Figura 10: Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de flutamida sobre: (a) ECV não modificado e (b) ECV/NCO-OG. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$.

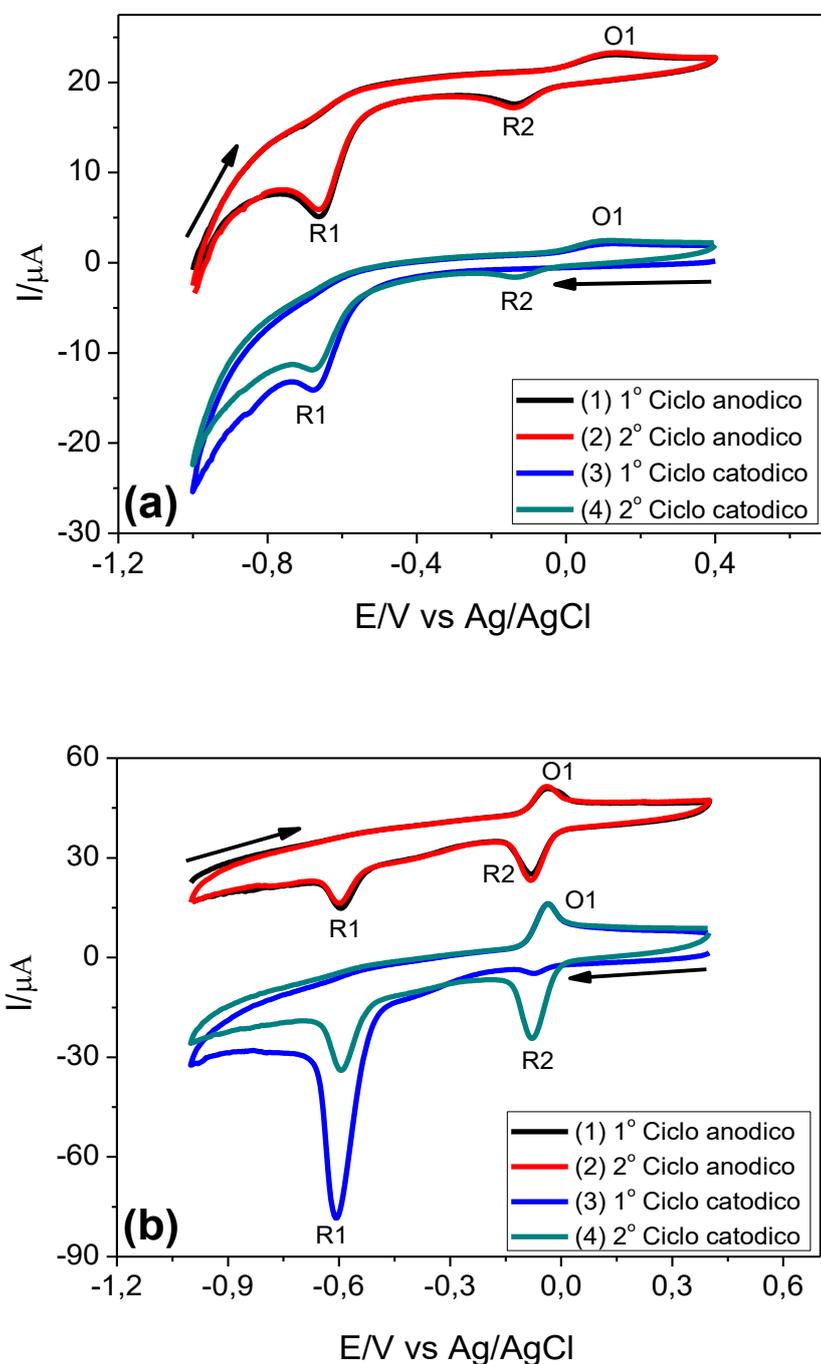
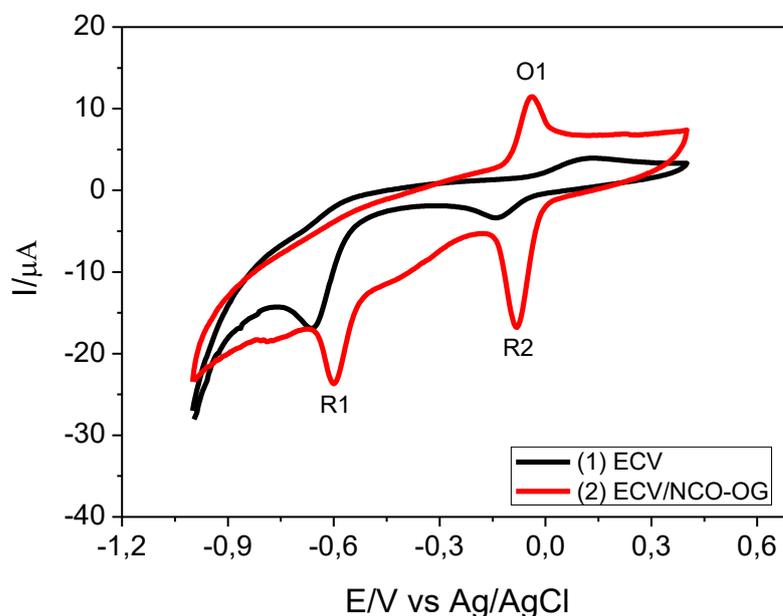
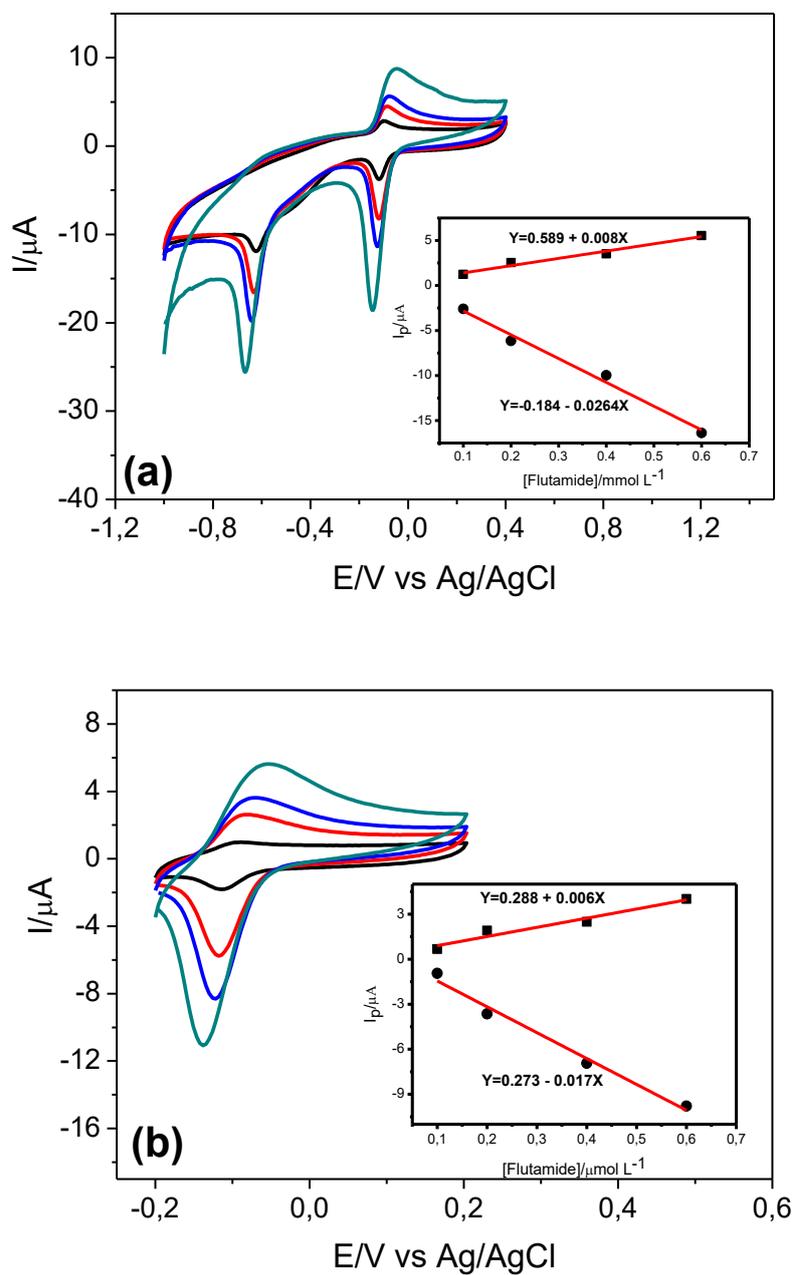


Figura 11: Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de flutamida sobre: ECV não modificado (voltamograma em preto) e ECV/NCO-OG (voltamograma vermelho). Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Para fins de análise, VCs foram realizados em duas faixas de potencial conforme apresentado nas Figuras 12a e 12b, com diferentes concentrações de flutamida ($0,1$; $0,2$; $0,3$ e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) utilizando-se o ECV modificado com o compósito NCO-OG. Inseridos nessas figuras estão os gráficos de corrente anódica e catódica (I_{pa} e I_{pc}). De acordo com os resultados, em ambas as faixas de potencial, as correntes de pico (I_p) aumentaram com o aumento da concentração de flutamida e os gráficos de I_p (correntes de pico anódica e catódica) em função da concentração foram lineares. Isso prova que é possível realizar a determinação do analito nas duas situações. Porém, neste trabalho, resolveu-se delimitar a faixa de potencial para a flutamida (-200 a $+200 \text{ mV}$) em uma faixa em que observa-se apenas o par redox O1/R2 por se pensar em determinações do analito em potenciais mais baixos ou mais próximos ao potencial zero, visando a utilização de uma menor quantidade de energia necessária para que o analito possa se oxidar ou reduzir. Também optou-se em explorar apenas o processo catódico do analito devido o mesmo apresentar maior sensibilidade e, conseqüentemente maior I_p , conforme pode ser observado na Figura 12b.

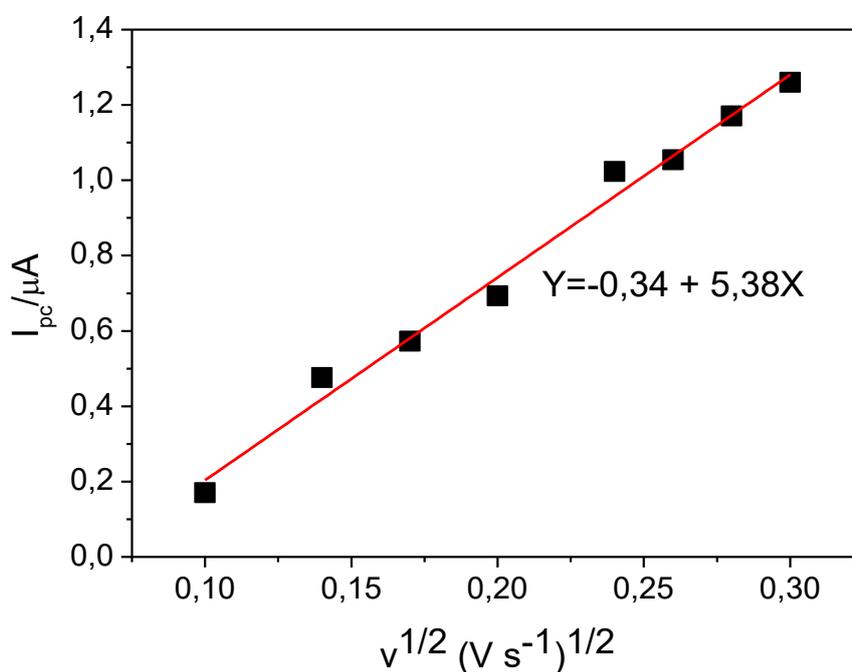
Figura 12: Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de flutamida sobre o ECV/CNO-OG nas faixas de potencial: (a) de -1000 a $+400$ mV e (b) -200 a $+200$ mV. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7. $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$. Inserção: gráfico de I_p vs [Flutamida].



5.3. Estudo da Influência da velocidade de varredura do sensor à base de NCO-OG sobre a corrente de pico da flutamida

A influência da velocidade de varredura de potencial ($0,01 - 0,1 \text{ V s}^{-1}$) sobre a corrente de pico catódica (I_{pc}) da flutamida foi verificada com o sensor à base de NCO-OG em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão BR, pH 7,0, contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de flutamida. Neste contexto, a Figura 13 mostra o gráfico de I_{pc} vs a raiz quadrada da velocidade de varredura $v^{1/2}$ o qual resultou em uma reta de equação $Y = -0,34 + 5,38 X$, com $R^2 = 0,987$. A I_{pc} foi dependente de $v^{1/2}$, tal como esperado para um processo reversível e controlado por difusão. O que nos sugere que o processo de redução de flutamida sobre o ECV/NCO-OG é controlado pelo transporte de massa.

Figura 13: Gráfico de I_{pc} versus $v^{1/2}$ para o processo catódico da flutamida sobre o ECV/NCO-OG na presença de diferentes velocidades de varredura ($0,01 - 0,1 \text{ V s}^{-1}$) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão BR (pH 5,0). $[flutamida] = 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$.



5.4. Otimização dos parâmetros experimentais

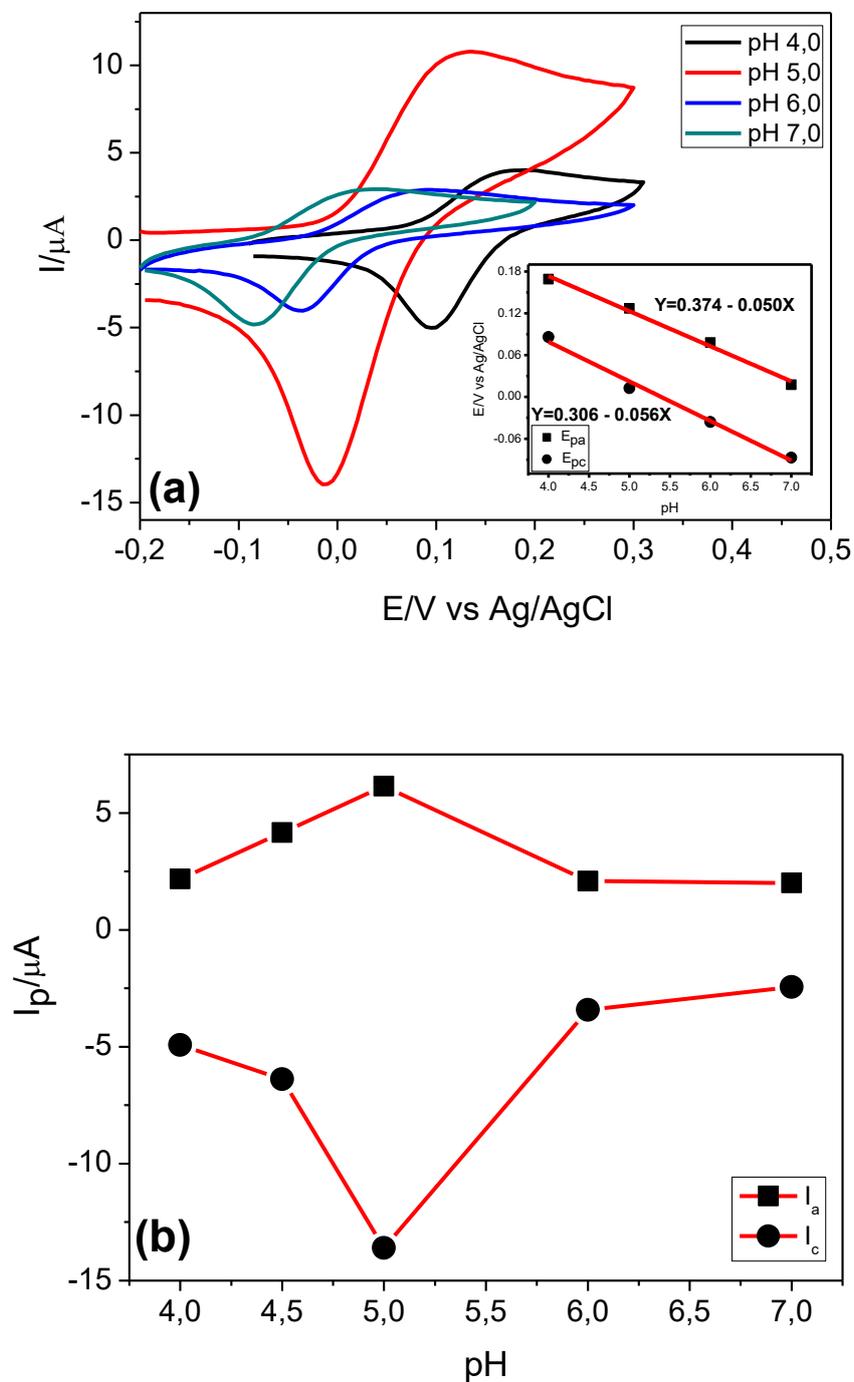
5.4.1. Estudo da influência do pH e do tipo de solução tampão sobre o processo redox da flutamida

O estudo da influência do pH da solução eletrolítica sobre o processo redox da flutamida foi investigado nos pHs 4,0; 5,0; 6,0, e 7,0, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, contendo 0,4 mmol L⁻¹ de flutamida. A Figuras 14a mostra os VCs referentes ao comportamento redox da flutamida nesses diferentes pHs. Inseridos nesta figura estão os gráficos dos potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) em função do pH do meio. Esses voltamogramas indicaram que o pH da solução eletrolítica possui influência significativa sobre os valores de E_{pa} e E_{pc} , bem como sobre as I_{pc} .

Os gráfico de potencial de pico em função do pH da Figura 14a apresentaram coeficientes de correlação angular próximos a 0,059 V por unidade de pH, o que nos sugere que os processos de oxidação e redução da flutamida sobre o eletrodo modificado com o compósito NCO-OG envolvem um número de prótons igual ao número de elétrons. Adicionalmente, como o n_e determinado para a redução de flutamida neste trabalho foi 4, então há apenas uma possibilidade para o pH entre 4,0 e 7,0, ou seja, o n_p envolvidos no processo de redução de flutamida sobre o sensor deve ser 4 ou 0,059 (n_p/n_e) V/pH onde $n_p=n_e=4$.

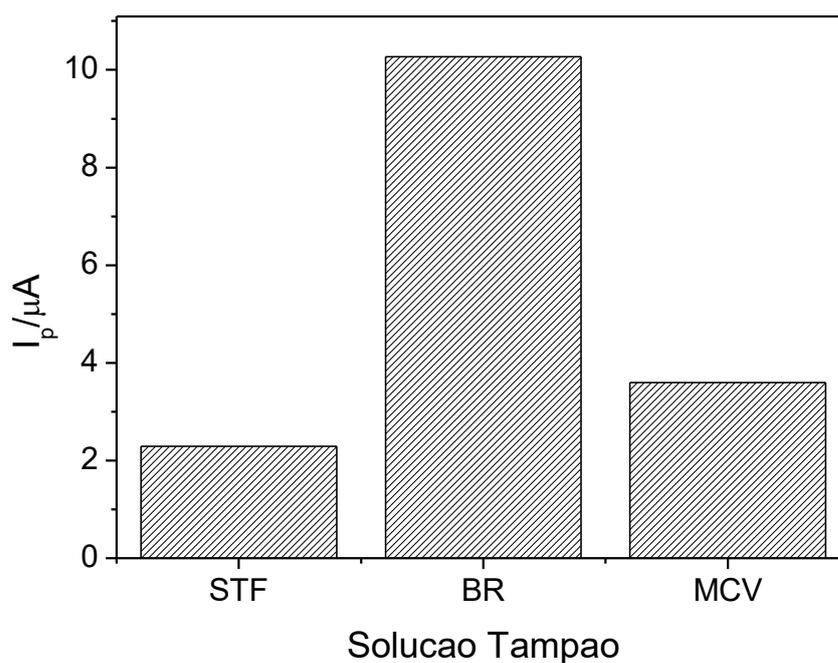
A Figura 14b mostra o gráfico das I_{pa} e I_{pc} em função do pH. Nesta Figura observa-se que as correntes de pico aumentaram do pH 4 ao pH 5, apresentando um valor máximo em pH 5,0. Quando o valor do pH foi superior a 5,0, as correntes diminuíram e mantiveram-se constantes entre o pH 6,0 e pH 7,0. Este resultado pode estar associado à maior estabilidade do compósito NCO-OG na superfície do ECV e conseqüentemente, uma maior estabilidade do sensor está diretamente relacionada a uma maior eficiência no processo redox do analito sobre o eletrodo modificado. Neste sentido, o pH 5,0 foi selecionado como valor ótimo para a detecção de flutamida nos estudos posteriores.

Figura 14: VCs referentes ao processo redox da flutamida sobre o ECV/NCO-OG em diferentes valores de pHs. Inseridos nessa figura estão os gráfico de potenciais de E_{pa} e E_{pc} . Medidas conduzidas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ flutamida. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Avaliou-se também a influência do tipo de eletrólito de suporte sobre a resposta do sensor para a flutamida, a qual foi verificada em três diferentes soluções tampão 0,1 mol L⁻¹, pH 5 (Fosfato - STF, Britton-Robinson - BR e MacIlvein - MCV). A Figura 15 mostra as I_p referentes a cada tipo de tampão estudado. Conforme pode-se observar nesta figura, a maior I_p foi obtida em tampão BR a qual pode ser associado com a alta mobilidade iônica das espécies que compõem o tampão (acetato, fosfato e borato), possibilitando uma melhor transferência eletrônica entre o eletrodo modificado e a flutamida em solução. Neste sentido, o BR foi escolhido para as etapas do trabalho.

Figura 15: Influência do tipo de solução tampão na I_p da flutamida empregando a técnica VC. [Flutamida]=0.4 mmol L⁻¹; $v=0.05$ V s⁻¹.



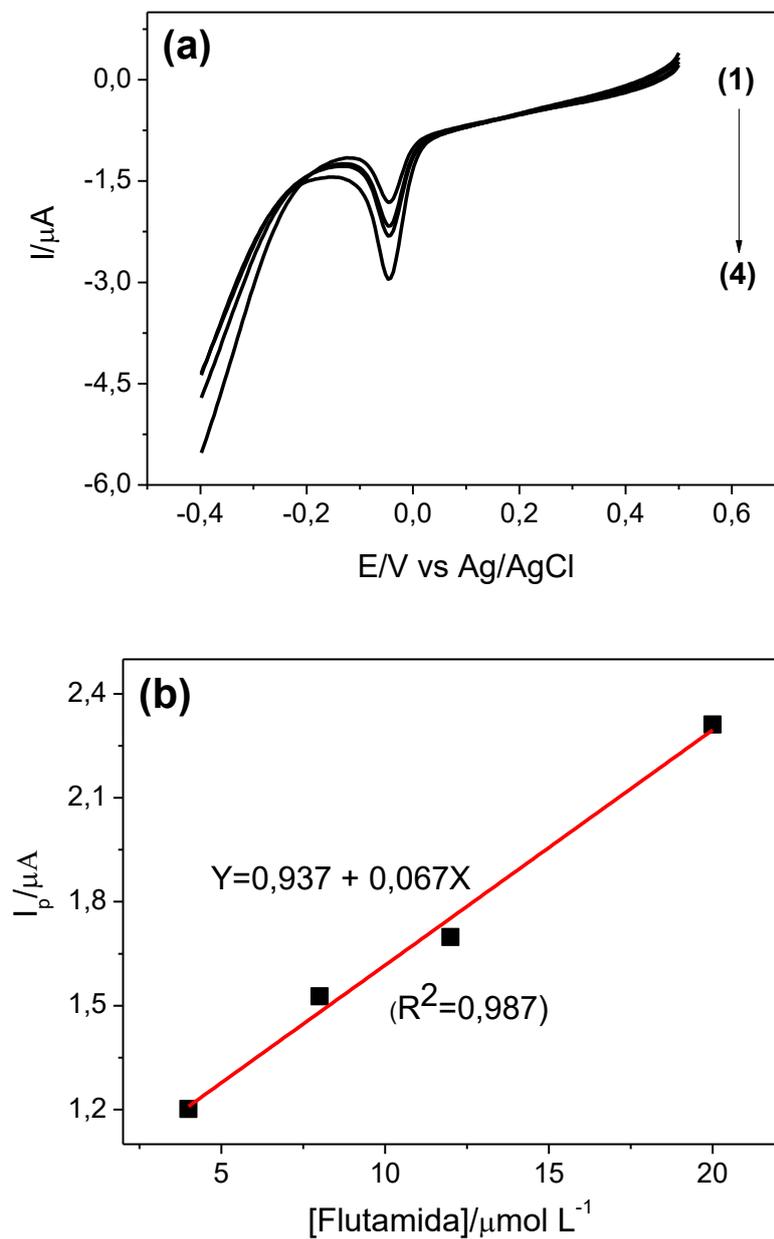
5.5. Escolha da técnica voltamétrica para a determinação de flutamida empregando o sensor à base de NCO-OG

A escolha da técnica a ser utilizada para a determinação de um analito é de fundamental importância, uma vez que parâmetros analíticos tais como LOD, LOQ, e sensibilidade, são dependentes da técnica empregada para a determinação do analito. Neste sentido, foram construídas curvas analíticas para a determinação de flutamida com o uso do ECV/NCO-OG utilizando duas técnicas eletroanalíticas: a VPD e VOQ a fim de se avaliar qual destas referidas técnicas seria a mais adequada na determinação deste analito em amostras farmacêuticas e em amostras de urina artificial.

A primeira técnica testada para a determinação da flutamida foi a VPD, a qual consiste em aplicar um pulso de potencial superposto em uma rampa de potencial linear e a medida de corrente é feita logo antes da aplicação do pulso e imediatamente após o final do pulso. Nesta técnica, as correntes são subtraídas visto que a primeira corrente lida é referente à contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica. Essa diferença de corrente é registrada em função do aumento linear da voltagem e com isso, obtêm-se uma curva diferencial cuja a altura do pico é diretamente proporcional à concentração do analito em solução.

Os voltamogramas de pulso diferencial (Figura 16a) foram obtidos após adições sucessivas de flutamida em diferentes concentrações (4, 8, 12 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na célula eletroquímica contendo solução 0,1 mol L^{-1} de tampão BR (pH 5,0) . Conforme observado na Figura.16b, as correntes de pico catódicas foram diretamente proporcionais às concentrações de flutamida fornecendo uma curva analítica de sensibilidade igual a 0,067 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$.

Figura 16: (a) Voltamogramas de pulso diferencial para a determinação de flutamida nas concentrações: (1) 4, (2) 8, (3) 12 e (4) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas de pulso diferencial. Medidas conduzidas utilizando o ECV/NCO-OG em condições experimentais otimizadas, em solução 0,1 mol L^{-1} de tampão BR (pH 5,0). $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e $A_p = 0,025 \text{ V}$.



A segunda técnica utilizada foi a de VOQ, a qual consiste na sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). Nesta técnica, as medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante.

Neste contexto, voltamogramas de onda quadrada (Figura. 17a) foram obtidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ da solução de tampão BR, pH 5,0, por meio de diferentes adições de flutamida à célula eletroquímica fornecendo as seguintes concentrações: 4, 8, 12 e $16 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Conforme observado na Figura 17b, a curva analítica obtida a partir da figura 16a apresentou uma sensibilidade igual a $0,17 \text{ } \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$.

Após a construção de curvas analíticas utilizando as duas técnicas acima citadas (VPD e VOQ) foi possível comparar as sensibilidades obtidas com cada curva analítica (Tabela 4) e decidir qual seria a mais adequada para ser utilizada na determinação de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial.

Figura 17: (a) Voltamogramas de onda quadrada para a determinação de flutamida nas concentrações: (1) 4, (2) 8, (3) 12 e (4) 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas de onda quadrada. Medidas conduzidas utilizando-se o ECV/NCO-OG em condições experimentais otimizadas, em solução 0,1mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 5,0). Frequência igual a 10 Hz ($\nu=0,05 \text{ V s}^{-1}$) e $A_p=0,025 \text{ V s}^{-1}$.

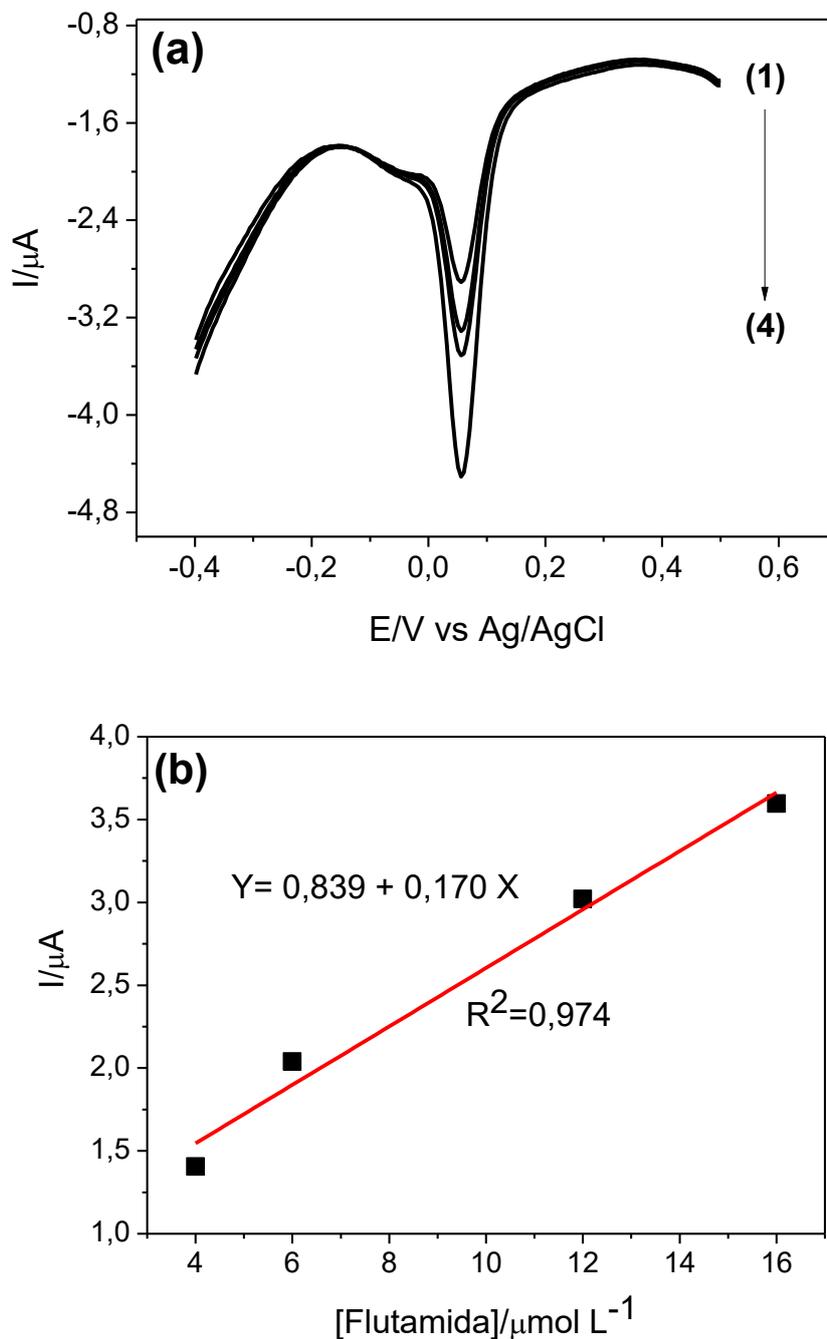


Tabela 2: Comparação entre as sensibilidades obtidas por VPD e VOQ para a determinação de flutamida empregando o ECV/NCO-OG.

Técnica	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)
VPD	0,067
VOQ	0,170

Com base nos resultados apresentados, a técnica VOQ foi escolhida para ser utilizada na determinação de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial, uma vez que a mesma apresentou uma maior sensibilidade.

5.5.1. Otimização dos parâmetros operacionais da técnica VOQ.

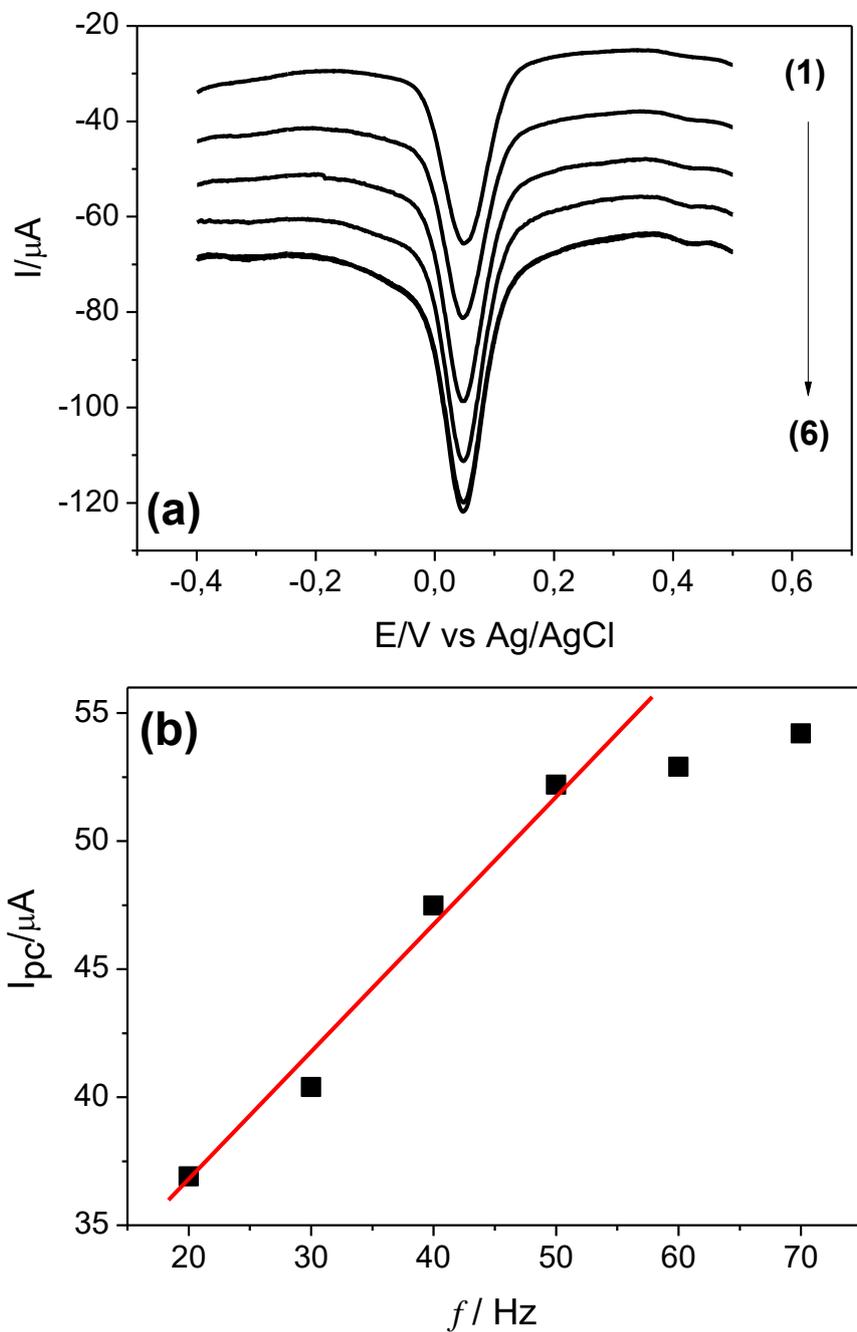
Na VOQ é de fundamental importância que os parâmetros operacionais como frequência, f , e amplitude de pulso (A_p) os quais estão diretamente relacionados com a sensibilidade da técnica, pois a mesma é responsável pela magnitude do sinal analítico.

Diante disto, os efeitos desses parâmetros foram estudados e otimizados com intuito de se obter um sistema mais adequado para a determinação de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial.

No primeiro momento, verificou-se o efeito de f sobre o sinal analítico da flutamida na faixa de 20 a 90 Hz, mantendo-se a A_p constante (0,05 V). Os voltamogramas foram obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0), contendo 10 mmol L⁻¹ de flutamida com o uso do ECV/NCO-OG em condições experimentais otimizadas.

Conforme observado nas Figuras 18a e 18b, verificou-se um aumento praticamente proporcional da I_{pc} até 50 Hz. Acima deste valor observa-se que a I_{pc} manteve-se praticamente constante. Com base nesses resultados optou-se em escolher uma frequência de 50 Hz como ideal para a construção da curva analítica referente à técnica VOQ.

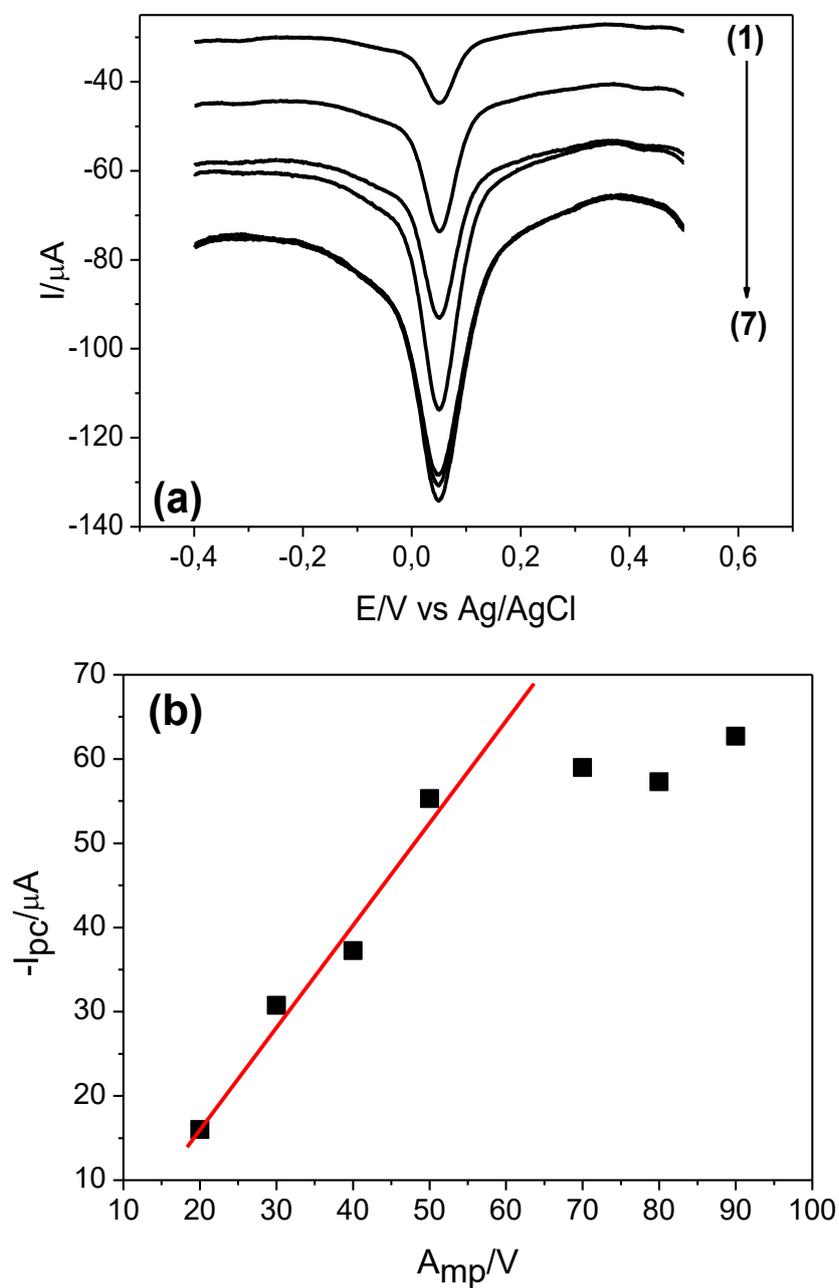
Figura 18: (a) VOQ obtidos em diferentes frequências: (1) 20, (2) 30, (3) 40, (4) 50, (5) 60 e (6) 70 Hz; (b) Gráfico de I_{pc} vs frequência. Medidas conduzidas em solução $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 5,0) utilizando-se o ECV/NCO-OG. $A_p=0,05\text{ V}$.



Por fim, a amplitude de potencial foi otimizada, mantendo-se f em 50 Hz e variando-se a amplitude de potencial no intervalo de 0,02 a 0,09 V. Os voltamogramas foram obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0), contendo 10 mmol L⁻¹ de flutamida com o uso do ECV/NCO-OG sob as condições experimentais otimizadas (Figura 19a).

Nesse estudo houve um aumento de intensidade de I_{pc} de forma proporcional até 50 mV, porém acima desse valor observa-se uma tendência de I_{pc} se manter constante (Figura 19b). Portanto, o referido valor de amplitude (50 mV) foi considerado como valor ótimo de A_p a ser utilizado na construção da curva analítica referente à técnica VOQ.

Figura 19: (a) VOQ obtidos em diferentes amplitudes de pulso (1) 20, (2) 30, (3) 40, (4) 50, (5) 70, (6) 80 e (7) 90 mV. (b) Gráfico de I_{pc} vs A_p . Medidas conduzidas utilizando-se o ECV/NCO-OG em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 5,0). $f=50 \text{ Hz}$.



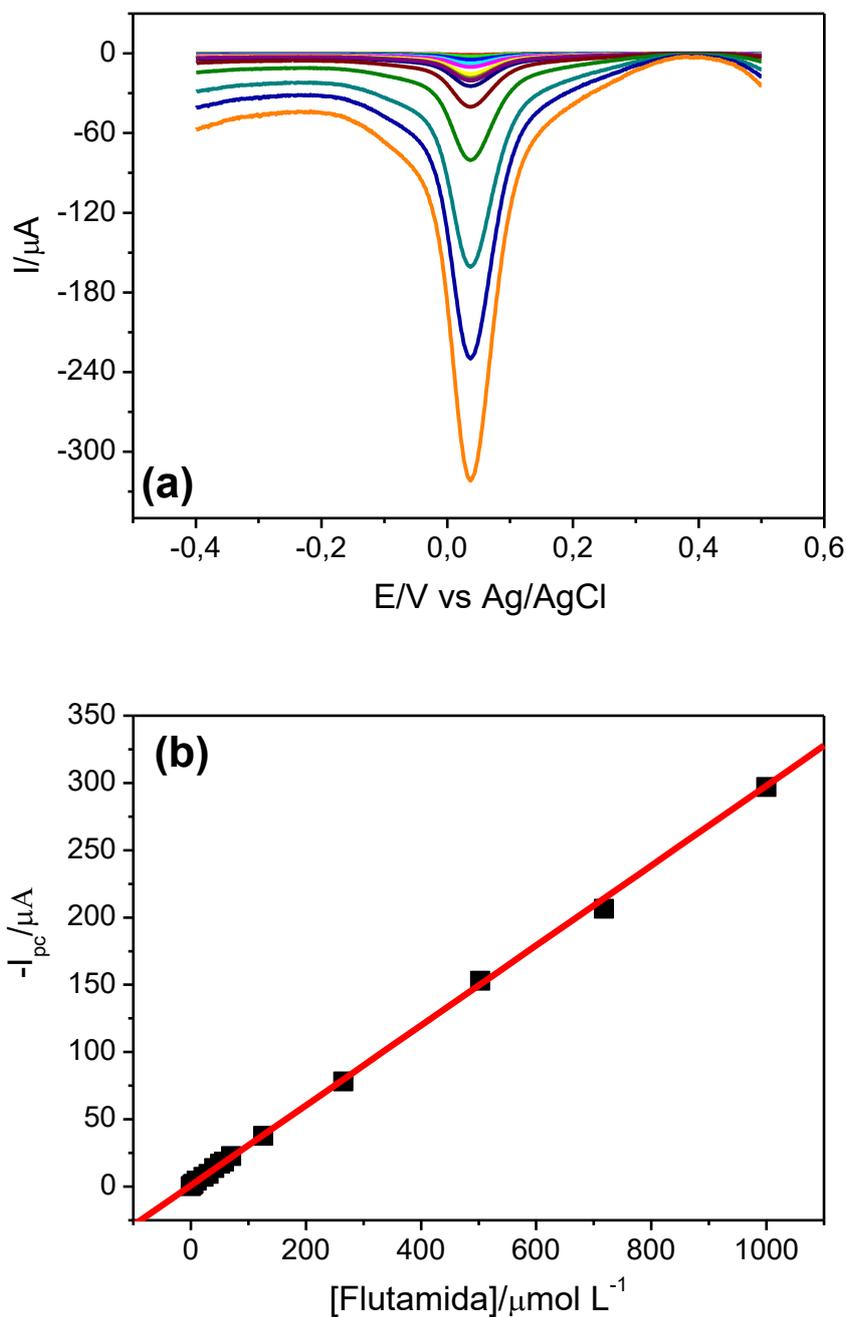
5.6. Caracterização analítica do sensor para a determinação de flutamida

Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais da VOQ, tais como a f (50 Hz) e a A_p (0,05 V), construiu-se a curva analítica através de adições sucessivas de pequenas alíquotas de solução padrão de flutamida. Os voltamogramas de onda quadrada são mostrados na Figura 20a. A partir destes voltamogramas construiu-se um gráfico de I_{pc} em função da concentração de flutamida com a qual foi possível obter uma ampla faixa linear de trabalho (0,1 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com $R^2 = 0,997$ ($n = 15$), utilizando-se como eletrólito uma solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} (pH 5,0). A expressão matemática que define a curva analítica pode ser escrita como:

$$\Delta I/\mu\text{A} = 1,026 (\pm 0,650) + 0,300 (\pm 0,002) [\text{Flutamida}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (10)$$

Os LOD e LOQ foram determinados seguindo as relações matemáticas recomendadas pela IUPAC. Os LOD e LOQ foram calculados utilizando-se 3 s/b e 10 s/b , respectivamente, onde s corresponde ao desvio padrão para dez voltamogramas do branco e b , ao coeficiente angular da curva analítica. O valor obtido para o desvio padrão s foi de 0,0032 μA , possibilitando LOD e LOQ iguais a 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A curva analítica para a determinação de flutamida por VOQ apresentou sensibilidade igual a 0,300 $\mu\text{A L}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$.

Figura 20: (a) VOQ para redução da flutamida obtidos em tampão BR, pH 5,0. As concentrações de flutamida na célula eletroquímica corresponderam a: 0,1; 2,4; 4,8; 10,2; 22,0; 31,0; 40,9; 51,0; 58,0; 70,0; 126,0; 265,0; 503,0; 718,0 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Curva analítica obtida a partir dos voltamogramas da figura 19a. $f = 50 \text{ Hz}$ e $A_p = 0,05 \text{ V}$.



Com base nos diferentes trabalhos reportados na literatura para determinação eletroquímica de flutamida (Tabela 3) fez-se a comparação do desempenho do sensor desenvolvido. Nesse sentido, observa-se que a sensibilidade, o LOD e a linearidade obtidos neste trabalho foram melhores do que muitos valores relatados na literatura.

A sensibilidade satisfatória apresentada pelo ECV/NCO-OG pode ser justificada pela facilidade de transferência eletrônica entre o compósito NCO-OG e a flutamida, favorecendo o processo catalítico na superfície do eletrodo. Nessa tabela, nota-se também que ainda há poucos trabalhos empregando os métodos eletroanalíticos para determinação de flutamida.

Tabela 3: Comparação do desempenho analítico utilizando diferentes eletrodos para determinação de flutamida.

Eletrodo	E_{red} (V)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
ECV/Nano-Ag	- 0,30	10 – 100	$4,5 \times 10^{-6}$		[AHMADI <i>et al</i> ,
	(vs SCE)	100 – 1000	$1,0 \times 10^{-6}$	9,33	2015]
EPC/Ds-DNA	- 0,75	72,4 – 579	0,011	3,62	[BRAHMAN;
	(vs SCE)				DAR; PITRE,
EPC/CTAB	-0,75	72,4 – 579	$9,08 \times 10^{-3}$	0,181	[BRAHMAN <i>et al</i> ,
	(vs Ag/AgCl)				2012]
ELG Modificado	-0,25	0,0001-0,1	$1,24 \times 10^{-5}$		[ENSAFI;
	(vs Ag/AgCl)	0,1-100	0,0043	$34,4 \times 10^{-6}$	KHODDAMI; REZAEI, 2016].
NCO-OG	0,05 (vs Ag/AgCl)	0,1 – 1000	0,30	0,03	Este trabalho

5.7. Determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras de urina artificial e comparação com o método de espectroscopia UV-VIS

O sensor proposto também foi aplicado para determinação de flutamida em duas amostras de medicamentos (A e B), obtidas em dois laboratórios diferentes e duas amostras de urina artificial (A e B), preparadas conforme descrito na parte experimental.

A determinação de flutamida nas amostras foi realizada em 5,0 mL de tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 5, contendo 10 µL de amostra. Assim, foram realizadas adições sucessivas de solução padrão de flutamida em tampão BR para determinação do fármaco. As concentrações de flutamida nas amostras farmacêuticas e urina artificial são apresentadas na Tabela 4. Esta tabela também mostra uma comparação entre o método proposto e um método comparativo descrito na literatura.

Tabela 4: Estudo da adição e recuperação do analito nas amostras farmacêuticas contendo flutamida.

Amostra (n=3)	Método Eletroquímico				Método Espectrométrico*	
	Flutamida adicionada (mg)	Flutamida esperada (mg)	Flutamida encontrada (mg)	Recuperação (%)	Flutamida encontrada (mg)	Recuperação (%)
Comprimido A	0,00	250,00	249,90 (±1,00)	99,9	251,50 (±1,20)	100,6
	10,00	260,00	253,54 (±0,50)	97,5	252,27 (±0,70)	99,4
Comprimido B	0,00	250,00	249,7 (±0,30)	99,8	248,48 (±0,50)	99,5
	20,00	270,00	285,26 (±0,20)	105,6	284,93 (±0,40)	99,9
Urina Artificial A	0,00	-	-	-	-	-
	10,00	10,00	9,99 (±0,02)	99,00	9,75 (±0,02)	97,5
	20,00	20,00	19,87 (±0,10)	98,70	19,98 (±0,10)	100,6
Urina Artificial B	0,00	-	-	-	-	-
	10,00	10,00	9,97 (±0,05)	97,00	9,99 (±0,12)	100,2
	20,00	20,00	19,95 (±0,03)	99,50	19,86 (±0,30)	99,5

*(DEEPAKUMARI, REVANASIDDAPPA, 2002). **valores obtidos considerando o fator de diluição para as amostras.

A porcentagem de recuperação do analito foi obtida pela seguinte equação:

$$\% Rec. = \left(\frac{[Flutamida]encontrada}{[Flutamida]esperada} \right) \times 100 \quad (11)$$

Os resultados dos testes de adição e recuperação, conforme observados na Tabela 4, deixam evidente que o método proposto apresentou uma boa exatidão,

pois foram obtidas porcentagens de recuperação próximas a 100 %, atestando que o sensor permitiu uma boa recuperação para o analito nas amostras avaliadas.

Aplicando-se um teste *t-Student* para comparar esses métodos, observou-se um nível de confiança de 95%, mostrando que não há diferença estatística significativa entre o método de referência e os resultados obtidos com o sensor proposto.

5.8. Estudo da repetibilidade do sensor

O estudo da repetibilidade intra-dias do ECV/NCO-OG foi realizado por meio de medidas sucessivas do mesmo por VOQ realizadas no mesmo dia ($n=10$) numa solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0, contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de flutamida. A repetibilidade dessas medidas foi verificada através das medições de I_{pc} determinando-se o DPR entre essas medidas o qual foi utilizado como parâmetro para avaliar a precisão do sensor (Tabela 5). Os resultados obtidos nesta tabela mostram o DPR médio de 0,06% evidenciando que o sensor apresenta uma boa repetibilidade para as medidas.

Tabela 5: Avaliação da repetibilidade intra-dias das medidas obtidas com o sensor ECV/NCO-OG imerso em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução de tampão BR (pH 5,0) contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de flutamida.

Medida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$I_{pc} (\mu\text{A})$	25,52	25,49	25,53	25,52	25,50	25,51	25,52	25,49	25,50	25,48
Média das Medidas	25,50					DPR				
	25,50					0,064%				

Adicionalmente, a repetibilidade inter-dia foi avaliada medindo-se I_{pc} referente à redução da flutamida em dias diferentes (5 dias, $n=5$), com sensores preparados da mesma maneira, e testados em tampão BR, pH 5,0 (Tabela 6). Os resultados apresentados nesta tabela mostram que o sensor proposto forneceu um DPR inferior a 5%, sugerindo que o mesmo apresenta uma boa estabilidade do material na superfície do eletrodo, devido, provavelmente à boa adsorção do composto na superfície do sensor.

Tabela 6: Avaliação da repetibilidade inter-dia obtida com cinco sensores à base de NCO-OG imerso em 0,1 mol L⁻¹ solução de tampão fosfato (pH 5,0) contendo 50 µmol L⁻¹ de flutamida.

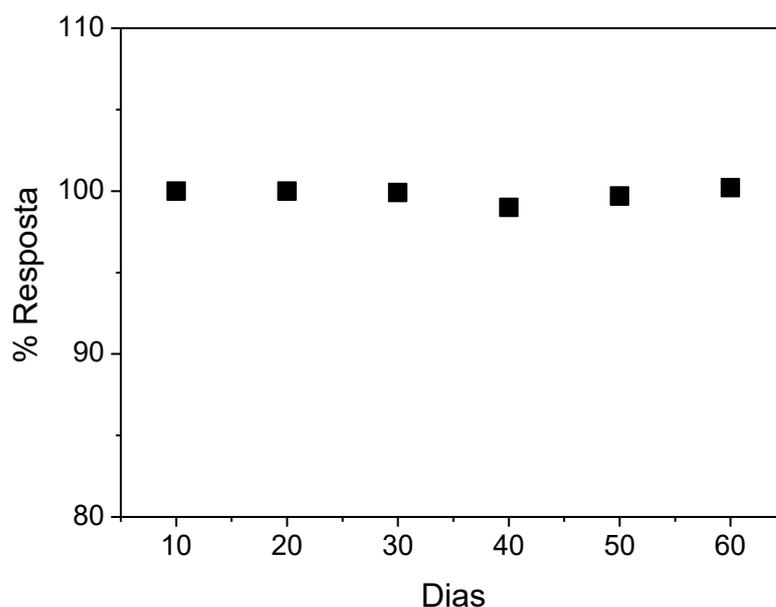
Medida	1	2	3	4	5
I_{pc} (µA)	25,49	25,50	25,51	25,48	25,52
	Média das medidas 25,50			DPR 0,062%	

5.9. Avaliação do tempo de vida útil do sensor

O tempo de vida útil do sensor foi avaliado por um período de sessenta dias, a partir das medidas de correntes de pico I_{pc} obtidas a partir de voltamogramas de onda quadrada realizados com uma solução 50 µmol L⁻¹ de flutamida presente em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão BR (pH 5,0) (Figura 21).

O valor da resposta analítica encontrada inicialmente foi considerado como 100% e os demais valores correspondentes aos dias subsequentes, calculados como porcentagem desse valor inicial. Nenhuma mudança significativa na resposta analítica foi observada durante o período de avaliação do tempo de vida útil de sensor, armazenado em temperatura ambiente.

Figura 21: Tempo de vida útil do ECV/NCO-OG. Respostas analíticas obtidas em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) contendo 50 µmol L⁻¹. Medidas obtidas em condições experimentais e operacionais otimizadas.



5.10. Estudo de interferentes

A seletividade do sensor foi avaliada através da determinação de flutamida ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) presente em solução tampão BR, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0 contendo diversas substâncias comumente encontradas em amostras farmacêuticas ou em amostras que podem ser encontradas no organismo humano através de sua ingestão via oral.

Os resultados indicaram que concentrações 100 vezes maiores das espécies avaliadas não interferem na determinação do analito estudado (Tabela 7). O menor valor de recuperação obtido para a flutamida neste estudo foi de 97%, sendo, portanto, evidente que através da exploração da redução de flutamida, o sensor eletroquímico foi capaz de fornecer boa seletividade para detecção deste sem qualquer interferência de substâncias comumente coexistentes. Estes resultados indicaram que a determinação deste composto não foi significativamente afetada por esses possíveis interferentes.

Tabela 7: Avaliação da seletividade do sensor proposto em relação a possíveis interferentes. [Flutamida]= $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (n = 3).

Interferente	Quantidade (mmol L^{-1})	% de Recuperação da Flutamida \pm DPR
Lactose mono-hidratado	10	98,8% ($\pm 0,5$)
Estearato de Magnésio	10	99,1% ($\pm 0,3$)
Laurato de Sódio	10	98,3% ($\pm 0,5$)
Celulose	10	97,7% ($\pm 0,8$)
Ureia	10	97,0 ($\pm 1,0$)
Amido	10	98,5% ($\pm 0,5$)
Glicose	10	98,9% ($\pm 0,5$)
Ácido Ascórbico	10	99,6% ($\pm 0,5$)
Dextrose	10	100,5% ($\pm 0,5$)
Talco	10	99,1% ($\pm 0,5$)
Vitamina B6	10	98,6% ($\pm 0,5$)

5.11. Avaliação das figuras de mérito obtidas com o sensor proposto e considerações finais sobre o ECV/NCO-OG

A Tabela 8 mostra o resumo dos resultados das figuras de mérito avaliadas no decorrer do trabalho, sendo elas: precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.

O sensor ECV/NCO-OG demonstrou uma boa exatidão, pois os resultados dos estudos de adição e recuperação da flutamida obtidas nas amostras de medicamentos e nas amostras de urina artificial analisados foram satisfatórios. Além disso, os resultados obtidos ao comparar o método proposto com o método espectrométrico não apresentou diferença estatisticamente significativa (teste *t Student*, com 95% de confiança).

A precisão foi considerada satisfatória após a verificação da repetibilidade de medidas e da repetibilidade no preparo do sensor. Os desvios padrão relativos entre as correntes de pico encontrados em ambos os testes foram 0,064 % para repetibilidade intra-dias e 0,062 % para repetibilidade em diferentes dias, sendo estes valores bem abaixo do valor máximo recomendado pela ANVISA

A seletividade do sensor proposto foi avaliada pelo estudo de interferentes e observou-se que nenhuma das espécies químicas testadas interferem na determinação do analito nas amostras analisadas, demonstrando assim que o sensor é altamente seletivo.

Os resultados dos parâmetros analíticos avaliados foram satisfatórios e merecem destaque, já que foram melhores que muitos trabalhos encontrados na literatura para a determinação de flutamida utilizando outros eletrodos (AHMADI *et al*, 2015; BRAHMAN; DAR; PITRE, 2012; BRAHMAN *et al*, 2012). Aspectos que, aliados à simplicidade de modificação, tornam o sensor uma interessante alternativa para a determinação deste analito.

Os resultados mostrados na tabela 8 comprovam que o sensor proposto foi validado e, portanto, é adequado para a determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras de urina.

Outra característica desejável apresentada pelo ECV/NCO-OG e que merece destaque é a sua estabilidade verificada por sessenta dias sem que, nesse período, houvesse perda de sua resposta, mantendo-o em temperatura ambiente.

Tabela 8: Figuras de mérito obtidas com o método analítico proposto.

Figura de mérito	Teste realizado	Resultado
Exatidão	Adição e Recuperação	Satisfatório
Precisão	Repetibilidade intra-dia de medidas	DPR = 0,06 %
	Repetibilidade inter-dia do sensor	DPR = 0,06 %
Seletividade	Estudo de interferentes	Satisfatório
LOD	–	0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$
LOQ	–	0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Linearidade	–	0,1 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o ECV/NCO-OG é uma alternativa viável para a determinação analítica de flutamida. A modificação da superfície do eletrodo foi efetuada de forma simples e efetiva, proporcionando grande estabilidade ao sensor desenvolvido.

As imagens de MEV obtidas demonstraram que os defeitos apresentados nas paredes dos nanotubos estão relacionados a esfoliação e a introdução de grupos funcionais contendo oxigênio. Já as imagens de espectroscopia Ramam confirmaram a estrutura cristalina dos NC após a esfoliação, comprovando que não houve perda das suas características. O sensor à base de NCO-OG foi capaz de promover uma excelente resposta eletrocatalítica para a determinação de flutamida, evidenciada pelo aumento significativo nas correntes anódica e catódica do analito e diminuição do sobrepotencial de redução, em relação ao eletrodo não modificado. A eletrocatalise observada pode ser atribuída à baixa resistência de transferência de carga do compósito NCO-OG.

O processo de redução da flutamida caracterizou-se por ser controlado por difusão, no qual o transporte de massa é o fator limitante do processo, bem como mostrou ser dependente do pH e comportar-se como um sistema nernstiano, onde o $n_p = n_e$.

O compósito NCO-OG apresentou uma maior estabilidade em pH 5 e conseqüentemente uma maior eficiência no processo redox do analito sobre eletrodo modificado. O tampão BR foi escolhido por apresentar uma melhor resposta do sensor para a flutamida o que foi associado ao fato de que o mesmo apresenta uma alta mobilidade iônica das espécie que o compõe (acetato, fosfato e borato), possibilitando uma melhor transferência eletrônica.

O estudo das diferentes técnicas voltamétricas de pulso demonstraram que a técnica de VOQ apresentou uma maior sensibilidade, sendo a mesma escolhida para ser utilizada na determinação de flutamida em amostras farmacêuticas e amostras de urina artificial.

A otimização das condições experimentais e operacionais proporcionou a obtenção de baixos LOD e LOQ para determinação de flutamida, bem como alta sensibilidade, ampla faixa linear de trabalho, cujo os valores para esses parâmetros foram melhores do que muitos trabalhos descritos na literatura.

O método proposto apresentou boa exatidão já que o estudo de adição e recuperação do analito não mostrou uma diferença estaticamente significativa ao compará-lo com o método de referência.

O sensor proposto apresentou boa precisão, o qual foi observado através de baixos valores de DPR encontrados na avaliação da repetibilidade das medidas e no preparo do sensor.

Os resultados obtidos com estudo de interferência comprovam que o método apresenta uma alta seletividade, pois não foi possível observar interferências significativas na resposta do analito frente às espécies químicas comumente encontradas em formulações farmacêuticas que contém flutamida como princípio ativo ou mesmo em fluidos biológicos como a urina.

Portanto, considerando as figuras de mérito avaliadas, o sensor desenvolvido apresenta-se como uma nova metodologia de baixo custo, de fácil operação, rápida, exata, precisa, seletiva, sensível e linear para a determinação de flutamida em formulações farmacêuticas e amostras de urina.

Como perspectiva futura, propõe-se o emprego do sensor desenvolvido para a determinação de flutamida em amostras de saliva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, C. J. H.; HURLEY, A.; STRATHMANN, F. G. Use of artificial urine as a matrix substitute for standard and quality control materials in the clinical assessment of iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 80-82, 2014.

AHMADI, F.; RAOOF, J. B.; OJANI, R.; BAGHAYERI, M.; LAKOURAJ, M. M.; TASHAKKORIAN, H. Synthesis of Ag nanoparticles for the electrochemical detection of anticancer drug flutamide. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 36, p.439–445, 2015.

AJAYAN, P. M.; ZHOU, O. Z. Applications of Carbon Nanotubes. **Topics in Applied Physics**, v. 80, p. 391-425, 2001.

ALOTHMANA, Z. A.; BUKHARI, N.; WABAIDUR, S. M.; HAIDER, S. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 146, p. 314–320, 2010.

ANJUM, S.; SWAN, S. K.; LAMBRECHT, L. J.; RADWANSKI, E.; CUTLER, D. L.; AFFRIME, M. B.; HALSTENSON, C. E. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 43-47, 1999.

BAKER, J. W.; BACHMAN, G. L.; SCHUMACHER, L.; ROAM, D. P.; THARP, A. Synthesis and bacteriostatic activity of some nitrotrifluorometylanilides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 93-95, 1967.

BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; HEER, W. A. Carbon Nanotubes—the Route Toward Applications. **Science**, v. 297, p. 787-792, 2002.

BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O método das adições padrão aplicado à análise cromatográfica quantitativa de fenóis em águas residuais. **Química Nova**, v. 11, p. 288-291, 1988.

BERTOLDO, S. A.; PASQUINI, V. Z. Câncer de próstata: um desafio para a saúde do homem. **Rev Enferm UNISA**, v. 11, p. 138-142, 2010.

BRAHMAN, P. K.; DAR, R. A.; PITRE, K. S. Voltammetric study of ds-DNA–flutamide interaction at carbon paste electrode. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1884–S1888, 2012.

BRAHMAN, P. K.; DAR, R. A.; TIWARI, S.; PITRE, K. S. Voltammetric determination of anticancer drug flutamide in surfactant media at polymer film modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 8– 15, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 04 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

BRITTO, P. J.; SANTHANAM, K. S. V.; AJAYAN, P. M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, p. 121-125, 1996.

BROGDEN, R. N.; CHRISP, P. Flutamide: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. **Drugs & Aging**, v. 1, p. 104-115, 1991.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALEDI, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, p. 1-6, 1998.

CHOU, A.; BOCKING, T.; SINGH, N. K.; GOODING, J. J. Demonstration of the importance of oxygenated species at the ends of carbon nanotubes for their favourable electrochemical Properties. **Chemical Communications**, v. 07, n. 07, p. 842-844, 2004.

CHROUSOS, G. P.; ZOUMAKIS, E.; GRAVANIS, A.; KATZUNG, B. G. Basic and Clinical Pharmacology, 8th ed., **Lange Medical Books/McGraw-Hill**, New York, p. 704-707, 2001.

COUTO, G. G. Nano partículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

DEEPAKUMARI, H. N.; REVANASIDDAPPA, H. D. Spectrophotometric Estimation of Flutamide in Pure and in Pharmaceutical Preparations. **ISRN Spectroscopy**, v. 2012, p. 1-8, 2002.

DRUGLINE. Drugs information online: Drugs and diseases reference index. Disponível em: <<http://drugline.org/drug/medicament/10047>> Acesso em: 12 jul. 2016.

ENSAFI, A. A.; KHODDAMI, E.; REZAEI, B. Development of a cleanup and electrochemical determination of flutamide using silica thin film pencil graphite electrode functionalized with thiol groups. **Iranian Chemical Society**, v. 13, p. 1683-1690, 2016.

FELIX, F. S.; DANIEL, D.; JIVALDO, R. M.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. Fast analysis of terbutaline in pharmaceuticals using multi-walled nanotubes modified electrodes from recordable compact disc. **Analytica Chimica Acta**, v. 928, p. 32-38, 2016.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. Oncologia Molecular. 1^o ed. **São Paulo: Editora Atheneu**, p. 03-295, 2004.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.

GOMES, R.; REBELLO, L. E. F. S.; ARAÚJO, F. C.; NASCIMENTO, E. F. Prostate cancer prevention: a review of the literature. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 235-246, 2008.

GONG, K.; DONG, Y.; XIONG, S.; CHEN, Y.; MAO, L. Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 253-259, 2004.

GOYAL, R. N. GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, p. 252-258, 2010.

HELSEN, C.; THOMAS V. B.; ARNOUT, V.; STEFAN, P.; POPPEL, V.; HENDRIK, V. P.; STEVEN, J.; FRANK, C. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy, **Endocrine Related Cancer**, v. 21, p. 105-128, 2014.

HERBST, M. H. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, p. 986-992, 2004.

HU, C.; HU, S. Carbon nanotube-based electrochemical sensors: principles and applications in biomedical systems. **Journal of Sensors**, v. 2009, p.1-41, 2009.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

IMTIAZ, M.; HAYATA, T.; ALSAEDI, A.; AHMAD, B. Convective flow of carbon nanotubes between rotating stretchable disks with thermal radiation effects. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 101, p. 948-957, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Tipos de Câncer – Próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em 29 jun. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE-008, rev. 4, jul. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>. Acesso em 03 jul. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH), 2005. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em 03 jul. 2016.

JALALIZADEH, H.; SOURI, E.; GRANAMI, H. R. J.; ALMASIRAD, A.; FOROUMADI, A. A rapid and sensitive HPLC method for the determination of 2-hydroxyflutamide plasma. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, p. 221-225, 2006.

KIM, J. P.; LEE, P.; LEE, J.; HONG, S.; SIM, S. J. Enhancement of sensitivity and specificity by surface modification of carbon nanotubes in diagnosis of prostate cancer based on carbon nanotube field effect transistors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3372–3378, 2009.

KUTLUAY, A.; ASLANOGLU, M. Quantification of methyl dopa in pharmaceuticals using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, p. 91–95, 2016.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urine. **J. Crystal Growth**, v. 233, p. 367-374, 2001.

LI, X. Q.; ZHU, S.; TONG, W.; Wang, W. Self-assembled microstructure of carbon nanotubes for enzymeless glucose sensor. **Sensors Actuators B**, v. 136, p. 444-450, 2009.

LIMA, K. C. M. S. ; SANTOS, A. C. F. ; FERNANDES, R. N. ; DAMOS, F. S. ; LUZ, R. C. S. Development of a novel sensor for isoniazid based on 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone and graphene: Application in drug samples utilized in the treatment of tuberculosis. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 226-234, 2016.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de fundamentos e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, p. 1318-1325, 2006.

LUEJE, A. A.; PEÑA, C. L. J.; VERGARA, N.; SQUELLA, J. A. Electrochemical study of Flutamide, an anticancer drug, and its polarographic, UV spectrophotometric and HPLC determination in tablets. **Electroanalysis**, v. 10, p. 1043-1051, 1998.

MARONA, H. R. N.; STORTI, M. P. B.; NETO, V. A. L. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, p.37-44, 2004.

MIÑANA, B.; RODRIGUEZ, A. A.; GOMES, V. F.; HERNÁNDEZ, C.; SUÁREZ, J. F.; FERNÁNDEZ, G. J. M.; UNDA, M.; BURGOS, J.; ALCARAZ, A.; RODRÍGUEZ, P.; MORENO, C.; PEDROSA, E.; CÓZAR, J. M. Treatment trends for clinically localised prostate cancer. National population analysis: GESCAP group. **Actas Urológicas Españolas**, v. 40, p. 2009-2016, 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) Da qualidade analítica, Manual de Garantia. Resíduos e contaminantes em Alimentos. Brasília, 2011.

MONTEIRO, D. B.; BRAGA, J. M. de F.; ALBUQUERQUE, M. M.; STRATTMANN, R.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, P. J. R. Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento da matéria-prima lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, p. 120-123, 2006.

MOREIRA, J. V. S.; CORAT, E. J.; MAY, P. W.; CARDOSO, L. D. R.; LELIS, P. A.; ZANIN, H. Freestanding Aligned Multi-walled Carbon Nanotubes for Supercapacitor Devices. **Journal of Electronic Materials**, v. 45, p. 5781, 2016.

MURRAY, R. W. BARD, A. J. Electroanalytical Chemistry. **Marcel Dekker**, New York, v. 13, p. 191, 1984.

NAGARAJA, P.; SUNITHA, K. R.; SILWADI, M. F. New spectrophotometric method for the determination of flutamide in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p. 617–622, 2000.

ORNSTEIN, D. K.; RAO, G. S.; JOHNSON, B.; CHARLTON, E. T.; ANDRIOLE, G. L. Combined finasteride and flutamide therapy in men with advanced prostate cancer. **Urology**, v. 48, p. 901-905, 1996.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S. REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

RADWANSKI, E. PERENTESIS, G. SYMCHOWICZ, S. ZAMPAGLIONE, N. Single and multiple dose pharmacokinetic evaluation of flutamide in normal geriatric volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 554-558, 1989.

REDDY, G. V. S.; REDDY, C. L. N.; MYREDDY, V. N. e REDDY, S. J. Electrochemical reduction of flutamide and its determination in dosage forms and biological media. **Journal Clinical Medicine and Research**, v. 3, p. 35-39, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C. SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

SAITO, E.; ANTUNES, E. F.; ZANIN, H.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O.; TRAVAIROLDI, V. J.; CORAT, E. J. Oxygen Plasma Exfoliated Vertically Aligned Carbon Nanotubes as Electrodes for Ultrasensitive Stripping Detection of Pb²⁺. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 161, p. H321-H325, 2014.

SALES, R. J. Materiais Compósitos Reforçados com Nanotubos de Carbono. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Militar) – Academia Militar, Lisboa, 2013.

SALMANIPOUR, A.; TAHERA, M. A.; BEITOLLAHI, H.; HOSSEINZADEHD, R. New voltammetric strategy for simultaneous determination of N-acetylcysteine and folic acid using a carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 385–390, 2013.

SANE, R. T.; GANGRADE, M. G.; BAPAT, V. V.; SURE, S. R. Gas chromatographic determination of flutamide, nimodipine and ticlopidine hydrochloride from their pharmaceutical preparations. **INDIAN DRUGS**, v. 30, p. 147-150, 1993.

SILVA, T. A.; ZANIN, H.; VICENTINI, F. C.; CORAT, E. J.; FILHO, O. F. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of atorvastatin calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode. **The Analyst**, v. 139, p. 2832-2841, 2014.

SILVA, T. A.; ZANIN, H.; VICENTINI, F. C.; CORAT, E. J.; FILHO, O. F. Electrochemical determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical and human body fluid samples using a composite of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide as the electrode material. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p.51–59, 2015.

SINGH, B. G. P.; BABURAO, C.; PISPATI, V.; PATHIPATI, H.; MUTHY, N.; PRASSANA, S. R. V.; RATHODE, B. G. “Carbon nanotubes. A novel drug delivery system”. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 2, p. 523–532, 2012.

SNYCERSKI, A. Polarographic determination of flutamide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, p. 1513-1518, 1989.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA (SBU). Câncer de próstata. Disponível em :< <http://portaldaurologia.org.br/doencas/cancer-de-prostata/> >. Acesso em: 11 jan. 2017.

SOLANKI, P. R.; KAUSHIK, A.; ANSARI, A. A.; TIWARI, A. MALHOTRA, B. D. Multi-walled carbon nanotubes/sol–gel-derived silica/chitosan nanobiocomposite for total cholesterol sensor. **Sensors and Actuators B**, v. 137, p. 727–735, 2008.

SORTINO, S.; GIFFRIDA, S.; GUIDI, G.; CHILLEMI, R.; PETRALIA, S.; MARCONI, G.; CONDORELLI, G.; SCIUTO, S. The photochemistry of flutamide and its inclusion complex with β -cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature

and on the efficiency of the photodegradation pathways. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, p. 6-13, 2001.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191-195, 1997.

SUN, D.; XIE, X.; CAI, Y.; ZHANG, H.; WU, K. Voltammetric determination of Cd²⁺ based on the bifunctionality of single-walled carbon nanotubes–Nafion film. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, p. 27–31, 2007.

SWAMY, B.; VENTON, B.J.; Microelétrodos de carbono modificado com nanotube parágrafo a detecção simultânea de dopamina e serotonina in vivo. **Analyst**, v. 132, p. 876-884, 2007.

TEMERK, Y. M.; IBRAHIM, H. S. M.; SCHUHMANN, W. Square wave cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the anticancer drugs flutamide and irinotecan in biological fluids using renewable pencil graphite electrodes. **Electroanalysis**, v. 28, p. 372 – 379, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, p. 403-410, 2009.

TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G. Automated determination of flutamide by a validated flow-injection method: Application to dissolution studies of pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1820–1824, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009

VALENTINI, L.; BAVASTRELLO, V.; STURA, E.; ARMENTANO, I.; NICOLINI, C.; KENNY, J. M. Sensors for inorganic vapor detection based on carbon nanotubes and poly(o-anisidine) nanocomposite material. **Chemical Physics Letters**, v. 383, p. 617–622, 2004.

VERGARA, L. J. N.; FARIAS, D.; BOLLO, S.; SQUELLA, J. A. An electrochemical evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endorxenobiotics of pharmacological relevance. **Bioelectrochemistry**, v. 53, p. 103–110, 2000.

VILLAMIZAR, R. A.; MAROTO, A.; RIUS, F. X.; INZA, I.; FIGUERAS, M. J. Fast detection of Salmonella Infantis with carbon nanotube field effect transistors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 279–283, 2008.

WANG, J. Modified electrodes for electrochemical Sensors. **Electroanalysis**, v. 3, p.255-259, 1991.

WANG, J.; ROGERS, K. Electrochemical sensors for environmental monitoring: a review of recent technology. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, 1995.

YADAV, S.; SINGH, P. S. Carbon nanotube dispersion in nematic liquid crystals: An overview. **Progress in Materials Science**, v. 80, p. 38–76, 2016.

YAPASAN, E.; **CALISKAN**, A.; KARADENIZ, H.; ERDEM, A. Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors. **Materials Science and Engineering B**, v. 169, p. 169–173, 2010.

ZANIN, H.; FERREIRA, A. M.; SILVA, N. S.; MARCIANO, F. R. CORAT, E J.; LOBO, A. O. Graphene and carbon nanotube composite enabling a new prospective treatment for trichomoniasis disease. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v. 41, p. 65-69, 2014.

ZARBIN, A. J. G. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis? **Química Nova**, v. 36, p. 1533-1539, 2013.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, J.; TAN, X.; ZHAO, D.; TAN, S.; HUANG, Z.; MI, Y.; HUANG, Z. Study of nimesulide and its determination using multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 2522–2526, 2010.