

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

EDUARDO FONSECA SILVA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE DIURÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

São Luís – MA

2019

EDUARDO FONSECA SILVA

**ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE DIURÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva

Área de Concentração: Química Analítica

São Luís – MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Fonseca Silva, Eduardo.

Análise por injeção em batelada com detecção eletroquímica na determinação de diuréticos em formulações farmacêuticas / Eduardo Fonseca Silva. - 2019.

69 p.

Orientador(a): Iranaldo Santos da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Análise de injeção em batelada. 2. Furosemida. 3. Hidroclorotiazida. I. Santos da Silva, Iranaldo. II. Título.

EDUARDO FONSECA SILVA

**ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE DIURÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof^o. Dr. Iranaldo Santos da Silva

Área de Concentração: Química Analítica

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr. Iranaldo Santos da Silva

Prof^a Dr^o Eduardo Mathias Richter – UFU

Prof^o Dr^a Rita de Cassia Silva Luz

São Luís, 02 de agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por estar presente em todos os momentos da minha vida, que em nenhum momento me deixou fraquejar ou desistir nos momentos difíceis;

Aos meus pais, Dulcineira e Raimundo Nonato, que tanto lutaram para educação dos seus filhos, um exemplo de vida;

A minha amada Elenilde Sá, pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos, obrigado pelo carinho, paciência e por me trazer paz na correria de cada semestre;

Ao meu filho Miguel, pequeno no tamanho e grande em valor, tenho aprendido muito com você;

Ao meu orientador, o professor Dr^o Iranado Santos da Silva, que sempre foi muito paciente, conselheiro e acessível, com quem aprendi e aprendo muito, dentro ou fora da sala de aula. Muito obrigado;

Aos meus amigos Helson e Paulo, pelo incentivo e apoio constante e por todos os colegas e professores do laboratório de eletroquímica que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim.

Obrigado !!!

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo usar a metodologia de análise por injeção em batelada – BIA com detecção eletroquímica de amperometria de pulsos múltiplos (AMP), para determinação dos diuréticos furosemida (FRD) e hidroclorotiazida (HCT) em formulações farmacêuticas. A determinação desses compostos foi realizada através da aplicação sequencial de dois pulsos de potenciais em função do tempo usando solução tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0 como eletrólito suporte. FRD foi oxidado em +1,10 V, e em +1,30 V houve a oxidação de ambos os compostos, sendo necessário usar um fator de correção para determinar a concentração de HCT. Além disso, as medidas não apresentaram contaminação/passivação da superfície do eletrodo de trabalho diamante dopado com boro (BDD). Nestas condições, após a otimização do sistema, os compostos apresentaram faixa linear de resposta de 2 a $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para HCT ($r = 0,9990$) e 2 a $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para FRD ($r = 0,9993$), boa repetibilidade apresentando DPR menor que 5 % para $n = 30$, limites de detecção de $0,65 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para FRD e $0,89 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para HCT, limites de quantificação de $1,98 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para FRD e $1,92 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para HCT, frequência analítica experimental a 120 injeções por hora. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados aos obtidos por espectrofotometria UV-Vis, sendo estes estatisticamente semelhantes a um nível de confiança de 95%.

Palavra-chave: Análise de injeção em batelada; furosemida; hidroclorotiazida

ABSTRACT

This work aimed to use the BIA injection analysis methodology with electrochemical detection of multiple pulse amperometry (AMP) for determination of furosemide (FRD) and hydrochlorothiazide (HCT) diuretics in pharmaceutical formulations. The determination of these compounds was performed by sequentially applying two potential pulses as a function of time using a 0.04 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer solution at pH 4.0 as a support electrolyte. FRD was oxidized at +1.10 V, and at +1.30 V there was oxidation of both compounds, and it is necessary to use a correction factor to determine the concentration of HCT. In addition, the measurements showed no surface contamination / passivation of the boron-doped diamond (BDD) working electrode. Under these conditions, after system optimization, the compounds presented linear response range from 2 to 100 µmol L⁻¹ for HCT ($r = 0.9999$) and 2 to 300 µmol L⁻¹ for FRD ($r = 0.9993$), good repeatability with DPR less than 5% for $n = 30$, detection limits of 0.65 µmol L⁻¹ for FRD and 0.89 µmol L⁻¹ for HCT, quantitation limits of 1.98 µmol L⁻¹ for FRD and 1.92 µmol L⁻¹ for HCT, experimental analytical frequency at 120 injections per hour. The results obtained with the proposed method were compared to those obtained by UV-Vis spectrophotometry, which were statistically similar to a 95% confidence level.

Keywords: Batch injection analysis; furosemide; hydrochlorothiazide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Etapas de operação de um sistema BIA com resultado obtido	18
Figura 2:	Estrutura química da FRD	20
Figura 3:	Estrutura química da HCT	21
Figura 4:	A) Degrau de potencial aplicado e B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial	24
Figura 5:	Célula eletroquímica com seus respectivos eletrodos	31
Figura 6:	(A) vista da célula BIA: (1) micropipeta eletrônica; (2) ponteira; (3) agitador magnético; (4) eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl _{sat} ; (5) eletrodo auxiliar Pt; (6) tampa da célula BIA; (7) corpo da célula BIA; (8) anel de borracha; (9) eletrodo de trabalho; (10) placa de cobre impresso; (11) parafusos; (12) placa metálica; (13) base da célula BIA e (B) Sistema BIA acoplado ao potenciostato/galvanostato conectado a um computador.....	32
Figura 7:	Micropipeta eletrônica	33
Figura 8:	Voltamogramas cíclicos obtido usando o eletrodo de ouro em tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ , pH 10,0 na adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5,0 mV .	35
Figura 9:	Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo de carbono vítreo em tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ , pH 10 na adição de 1 mmol L ⁻¹ de FRD (A) e HCT (B). Velocidade: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5 mV	36
Figura 10:	Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ , pH 10,0 na adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de FRD (A) e HCT (B). Velocidade: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5,0 mV.....	36
Figura 11:	Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em 0,04 mol L ⁻¹ de tampão Britton-Robinson pH 10,0 na adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5,0 mV e (B) Influência dos valores de pH nos picos de potenciais anódicos de FRD e HCT	37

Figura 12:	Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em 0,04 mol L ⁻¹ de tampão Britton-Robinson pH 4,0 na adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5,0mV.....	38
Figura 13:	Voltametria hidrodinâmica para o estudo da furosemida (FRD) e hidroclorotiazida (HCT) ambos em 50 μmol L ⁻¹ , usando o eletrodo de trabalho diamante dopado com boro (BDD) em solução tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ , pH 4,0. Volume de injeção: 100 μL velocidade de dispensa: 67 μL	39
Figura 14:	A) Esquema dos pulsos de potenciais. B) Respostas obtidas no sistema BIA-AMP para injeções de soluções contendo HCT (50 μmol L ⁻¹) e FRD (50 μmol L ⁻¹) e uma mistura de HCT + FRD (50 μmol L ⁻¹ + 50 μmol L ⁻¹) em tampão BR pH 4,0 (0,04 mol L ⁻¹). Volume de injeção: 100 μL, velocidade de dispensa: 67 μL.....	40
Figura 15:	Picos transientes de acordo com seus respectivos pontos de amostragem de corrente obtido após a injeção de uma solução contendo HCT + FRD (ambos em 50 μmol L ⁻¹) no sistema BIA-AMP.....	42
Figura 16:	Estudo da velocidade de injeção da micropipeta eletrônica dos analitos furosemida (FRD) e hidroclorotiazida (HCT), ambos em 50 μmol L ⁻¹ usando eletrodo de trabalho diamante dopado com boro, eletrodo referência Ag/AgCl/KCl _{sat} , eletrodo auxiliar Pt e tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 em: 19 μL s ⁻¹ ; 22 μL s ⁻¹ ; 26 μL s ⁻¹ ; 31 μL s ⁻¹ ; 36 μL s ⁻¹ ; 42 μL s ⁻¹ ; 53 μL s ⁻¹ ; 67 μL s ⁻¹ ; 100 μL s ⁻¹ e 143 μL s ⁻¹	42
Figura 17:	Influência do volume injetado na resposta obtida com o sistema BIA-MPA. Volumes de injeção estudados: de 20 a 200 μL. Solução injetada: 50 μmol L ⁻¹ de FRD e 50 μmol L ⁻¹ de HCT. Eletrodo de BDD ativado catodicamente, eletrodo referência Ag/AgCl/KCl _{sat} , eletrodo auxiliar Pt em tampão Britton-Robinson 0,04 mol L ⁻¹ pH 4,0 em E = +1,10 V e E = +1,30 V. Velocidade de dispensa da micropipeta eletrônica: 100 μL s ⁻¹	43
Figura 18:	Efeito da agitação do eletrólito suporte usando FRD + HCT (50 + 50 μmol L ⁻¹), nas correntes obtidas por BIA-AMP em a) sem agitação, b) em 150,0 rpm e c) 250 rpm. Velocidade de injeção: 100 μL s ⁻¹ , volume de dispensa: 120 μL.....	44

Figura 19:	Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo a) $5 \mu\text{mol L}^{-1} + 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e b) $50 \mu\text{mol L}^{-1} + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT + FRD. Demais condições experimentais otimizadas de acordo com a tabela 1.....	46
Figura 20:	A) Amperogramas obtido simultaneamente no sistema BIA-AMP usando solução de FRD + HCT, ambas nas concentrações simultâneas de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e B) resposta analítica em $E = +1,30 \text{ V}$ e $E = +1,10 \text{ V}$	47
Figura 21:	Influência da concentração da FRD no FC ($I_{\text{FRD } +1,30\text{V}}/I_{\text{FRD } +1,10\text{V}}$) A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo concentrações crescente de FRD e B) resposta analítica do FC.....	48
Figura 22:	Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC), cinco soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a-e) de FRD e HCT (a- $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, e- $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, f- $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, g- $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, h- $250 \mu\text{mol L}^{-1}$, i- $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, j- $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ e k- $400 \mu\text{mol L}^{-1}$), B) Faixa linear para FRD e HCT.....	50
Figura 23:	Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, como fator de correção (FC), cinco soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a - e) de FRD e HCT e curva de calibração para FRD e HCT com quatro amostras farmacêuticas (A, B, C e D). Demais condições experimentais conforme Tabela 1	52
Figura 24:	Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC), cinco soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a-e) de FRD e HCT, quatro amostras farmacêuticas (A, B, C e D) e curva de calibração para FRD e HCT.....	55
Figura 25:	A) Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC) no estudo do interferente FRD na determinação de HCT ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em uma mistura de HCT (a-d = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + FRD (a- $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e d- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Resposta analítica em porcentagem.....	57

Figura 26: A) Amperograma obtido no sistema BIA-AMP no estudo do interferentes HCT na determinação de FRD ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $E = +1,10 \text{ V}$ em uma mistura de FRD (a-f = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + HCT (a- $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, e- $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e f- $110 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Resposta analítica em porcentagem..... 58

Figura 27: A) Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como FC, concentrações crescentes de FRD + HCT (a- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$; b- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; c- $30 \mu\text{mol L}^{-1}$; d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$), solução contendo $200 \mu\text{L}$ de urina sintética (D) e três concentrações diferentes de mistura contendo urina sintética ($200 \mu\text{L}$) e mistura de FRD e HCT nas concentrações padrões de $D_1 = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $D_2 = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $D_3 = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$. B) Curva de calibração para FRD e HCT..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Parâmetros relacionados com o sistema BIA-AMP estudados e otimizados.....	45
Tabela 2:	Estudo de repetibilidade do método.....	46
Tabela 3	Equações da curva analítica obtidas em diferentes dias e seus respectivos coeficientes de correlações	49
Tabela 4:	Resposta analítica do método BIA-AMP para FRD e HCT	51
Tabela 5:	Comparação dos resultados rotulados e os obtidos na determinação simultânea de FRD e HCT por BIA-AMP e UV-Vis	53
Tabela 6:	Valores de erro relativo usando o método proposto BIA-AMP e espectrofotometria UV-Vis	54
Tabela 7:	Estudo da adição e recuperação de FRD e HCT em formulações farmacêuticas	56
Tabela 8:	Porcentagem de recuperação usando urina sintética na determinação de FRD e HCT	60
Tabela 9:	Comparação do método BIA-AMP com outros métodos publicados	61

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FRD = Furosemida;

HCT = Hidroclorotiazida;

BDD = Diamante dopado com boro;

FIA = Análise de injeção em fluxo;

BIA = Análise de injeção em batelada;

AMP = Amperometria de múltiplos pulsos;

V = Volts;

UV-Vis = Espectrofotometria Ultravioleta – Visível;

μA = MicroAmperes;

LD = Limite de detecção;

LQ = Limite de quantificação;

DPR = Desvio padrão relativo;

FC = Fator de correção;

r = Coeficiente correlação linear;

a = Coeficiente angular, sensibilidade;

b = Coeficiente linear;

E = Erro relativo em porcentagem;

VPD = Voltametria de pulso diferencial;

F. A. = Frequência analítica;

I = CORRENTE

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Eletrodo diamante dopado com boro – BDD.....	16
1.2 Análise por injeção em batelada	18
1.3 Furosemida (FRD)	20
1.4 Hidroclorotiazida (HCT).....	21
1.5 Determinação de HTC e FRD	22
1.6 Amperometria	23
1.7 Parâmetros de confiabilidade analítica	25
1.7.1 Limite de detecção (LD)	25
1.7.2 Limite de quantificação (LQ).....	26
1.7.3 Repetibilidade	26
1.7.4 Robustez.....	27
1.7.5 Exatidão	27
1.7.6 Sensibilidade	27
1.7.7 Linearidade	28
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos	29
3 PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1 Instrumentação	30
3.1.1 Medidas eletroquímica.....	30
3.1.2 Medidas espectrofotométricas UV-Vis.....	30
3.1.3 Voltametria Cíclica	30
3.1.4 Eletrodos utilizados.....	31
3.1.5 Célula para medidas eletroquímica	31
3.2 Reagentes	33
3.3 Soluções e procedimentos	33
4. RESULTADO E DISCURSÕES	35
4.1 Comportamento eletroquímico da FRD e HCT	35
4.2 Voltametria cíclica e estudo do pH.....	35
4.3 Voltametria hidrodinâmica	38

4.4 Seleção dos pulsos de potenciais na determinação simultânea de HCT e FRD por BIA-AMP	40
4.5 Otimização do sistema BIA-AMP	41
4.6 Estudo da velocidade de injeção	42
4.7 Estudo do volume de dispensa da micropipeta eletrônica	43
4.8 Estudo da influência da agitação do eletrólito de suporte no sinal analítico	44
4.9 Estudo da repetibilidade do método	45
4.10 Estudo do fator de correção – FC.....	48
4.11 Robustez.....	49
4.12 Faixa linear e aplicação do método no sistema BIA-AMP na determinação simultânea de FRD e HCT em formulações farmacêuticas.	49
4.13 Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto BIAAMP e o método de referência.....	53
4.14 Estudo de adição e recuperação na determinação de FRD e HCT.....	54
4.15 Estudo de interferente	57
4.15.1 Interferência da FRD na determinação de HCT.....	57
4.15.2 Interferência da HCT na determinação de FRD.....	58
4.16 Aplicação do método em amostra biológica – Urina sintética.....	58
4.17 Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA métodos publicados anteriormente.....	60
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIA.....	63

1. INTRODUÇÃO

Fármacos são substâncias químicas que afetam a função fisiológica de modo específico¹. Quando estes acessam o organismo humano, por uma das possíveis vias de administração, inicia-se uma série de reações bioquímicas objetivando a absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e a sua eliminação. Os fármacos atuam ao nível de receptor o qual é responsável pela seletividade da ação farmacológica e pela relação quantitativa entre fármacos e seu efeito.

Furosemida (FRD) e hidroclorotiazida (HCT) são substâncias pertencentes à classe dos diuréticos de alça e tiazidas. São grupos de substâncias usadas para ajustar a composição e volume dos fluídos corporais em numerosos casos de doenças. Do ponto de vista farmacológico, são drogas que além de aumentarem o volume urinário, aumentam também a excreção urinária de sódio por uma ação direta sobre os rins^{2,3}.

Ambos os diuréticos não precisam de receita médica para aquisição e, por serem de fácil acesso, podem causar sérios riscos à saúde. Seus usos nos esportes são proibidos por mascarar substâncias vedadas em exames anti-dopping, por favorecer o aumento na eliminação de eletrólitos (especialmente sódio e íons cloreto), além de outras substâncias e água. Esses fármacos são utilizados no tratamento de edemas resultantes de uma variedade de causas, como por exemplo, insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, doenças crônicas do fígado, em associação à hipertensão, hipercalcemia, diabetes, etc⁴. Os diuréticos comercialmente disponíveis são as tiazidas, os de alça e poupadores de potássio. Os diuréticos poupadores de potássio são considerados de fraco poder diurético, apresentando-se normalmente associados a outras substâncias com a finalidade de diminuir a depleção de potássio⁴.

Na literatura atual, são encontrados diversos métodos para a determinação de fármacos contendo FRD e HCT, com destaque para métodos cromatográficos⁵, espectrofotométricos^{6,7} e voltamétricos⁸. Com exceção dos métodos cromatográficos, a grande maioria são elaborados para determinação individual destes compostos, e não os dois simultaneamente. Entretanto estes métodos apresentam alguns inconvenientes, pois análises com estas técnicas dependem de etapas iniciais de preparação das amostras que demandam muito tempo, utilizam grande quantidade de reagentes (solventes de alta pureza) e para a maioria dos métodos os equipamentos associados são de custos elevados, o que torna muito caro o custo final das análises^{9,10}. Com isto, é necessário se

desenvolver técnicas mais rápidas, de custo mais baixos e tão sensíveis quanto as técnicas cromatográficas⁹. Contudo os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens consideráveis sobre os demais, dentre as quais podemos citar: menores limites de detecção, alta frequência de análise, mínima manipulação da amostra, baixo custo de análise, além de custos de aquisição e manutenção inferiores dos equipamentos usados.

A análise por injeção em batelada (BIA), por sua vez associada a técnicas eletroquímicas, tem apresentado um papel de destaque na comunidade científica uma vez que tem sido demonstrado sua aplicabilidade no desenvolvimento de métodos com excelentes resultados em determinações de fármacos, conforme já descrito na literatura^{9,11}.

Na técnica BIA, proposta em 1991 por WANG e TAHA¹⁵, um injetor introduz a solução do analito diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho, que está inserido em um recipiente (célula BIA) contendo uma solução inerte estacionária ou sob convecção (na presença de agitação mecânica). De acordo com a literatura, ambos os sistemas BIA e FIA apresentam similaridade na proposta de análises realizadas continuamente e com menor intervenção do analista, apresentando picos transientes com alta frequência analítica, elevada precisão e baixo consumo de amostras e reagentes¹⁴.

FRD e HCT foram determinadas individualmente por ISSOPOULOS¹² e LORENÇÃO *et al*¹³. No primeiro estudo, os autores determinaram microquantidades de furosemida em medicamentos baseados na oxidação do fármaco na presença de iso e heteropoliânions de molibdênio (IV). A redução do molibdênio (IV) levou à formação de um composto azul, cuja concentração foi proporcional à quantidade de furosemida oxidada. Os comprimentos de onda usados para análise foram 690 nm para o produto de reação com o isopoliânion e 700 nm para o heteropoliânion de molibdênio (IV). Já para o segundo, os autores empregaram um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) submetido a um tratamento catódico em sistema de injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos. Vários outros fármacos também foram determinados usando o sistema BIA com detecção amperométrica, mostrando o grande potencial de aplicação deste método¹⁶.

Outros métodos eletroanalíticos foram propostos para determinação de HCT e FRD^{9, 11}. Apesar do sucesso destes métodos, a maioria dos eletrodos sólidos utilizados nesses trabalhos está sujeita à diminuição na atividade eletroquímica devido à adsorção

de espécies na superfície desses materiais. Na prática, este problema pode ser corrigido mediante o polimento mecânico da superfície do eletrodo, tratamento eletroquímico entre as medidas ou substituição do eletrodo após cada análise, como no caso dos eletrodos descartáveis.

Considerando o exposto anteriormente, neste estudo descreve-se o desenvolvimento e a otimização de um método eletroanalítico simples, rápido e de baixo custo para a determinação simultânea de FRD e HCT em fármacos, utilizando a metodologia Análise por Injeção em Batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos (BIA-AMP) e um eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro. O método proposto é considerado bastante atraente, uma vez que não é de nosso conhecimento algum método eletroanalítico descrito na literatura para a determinação simultânea destes dois analitos.

1.1 Eletrodo diamante dopado com boro – BDD

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês “*boron doped diamond*”) tem sido usado com frequência em diversas determinações, tais como: princípios ativos em medicamentos^{9, 17}, metais^{18,19}, antioxidantes²⁰, bases nitrogenadas do DNA²¹, corantes²², pesticidas²³, carboidratos²⁴, entre outros¹⁶. Trata-se de um material a base de carbono com elevados graus de densidade atômica, dureza e resistência mecânica. O primeiro filme de BDD foi obtido em 1973 por Poflerl *et al.*²⁵, através da técnica de deposição química a partir de vapor (CVD, do inglês “*chemical vapor deposition*”), na qual são introduzidos em um reator moléculas gasosas contendo carbono (metano, acetona, etc.) e derivados do dopante boro, diborano, por exemplo. Atualmente a técnica de CVD ainda é muito utilizada para a síntese do BDD, sendo possível a obtenção de materiais com variadas condutividades, dependendo do nível de dopagem, comumente de 500 a 10.000 mg kg⁻¹.

Os eletrodos de filme de BDD apresentam melhores propriedades para aplicação em eletroquímica e eletroanalítica em relação a outras formas de carbono (grafite, carbono vítreo, carbono pirolítico, pasta de carbono etc.), tais como: corrente capacitiva (corrente de fundo) baixa e estável, janela de potencial em meio aquoso ampla, cinética de transferência de elétrons rápida em vários sistemas redox, adsorção

molecular (baixa passivação) fraca, estabilidade dimensional e resistência à corrosão²⁶. Em funções destas propriedades, o eletrodo de BDD tem sido usado no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos e em estudos ambientais no que se trata de tratamento de efluentes.

Para que estas propriedades possam ser perceptíveis, é necessário tomar alguns cuidados ao adaptar um eletrodo de BDD em uma célula eletroquímica, como: manter um bom contato elétrico entre o substrato e o suporte de eletrodo e vedar bem as bordas do eletrodo, de forma que somente o BDD fique em contato com a solução de medida. Caso contrário ocorrerá a infiltração da solução no suporte, comprometendo o contato elétrico entre o BDD e o eletrólito, pelo elevado aumento na resistência ôhmica. Além das recomendações supracitadas, o desempenho do eletrodo de BDD é dependente das condições de pré-tratamento de limpeza e/ou ativação^{9, 11, 13}. Na polarização eletroquímica, aplica-se um potencial ou corrente positiva o suficiente para promover a oxidação da água gerando gás oxigênio (ativação anódica), situação está em que ocorre a funcionalização da superfície do BDD com grupos terminados em oxigênio. Por outro lado, aplicando-se um potencial ou corrente negativos na superfície do eletrodo, o suficiente para ocorrer a redução da água (eletrólise) gerando gás hidrogênio (ativação catódica). Estudos sobre a influência destes tratamentos no comportamento de BDD em eletroanálise são reportados na literatura²⁷.

SUFFREDINI et al.²⁸ estudaram o comportamento eletroquímico de pesticidas após tratamento catódico da superfície do eletrodo de BDD, o qual foi tratado utilizando uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e aplicando-se -3,0 V por 30 minutos. Os resultados mostraram que a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é afetada pelo tipo de pré-tratamento aplicado à superfície do eletrodo, sendo que este tratamento promoveu o aumento da resposta eletroquímica.

MEDEIROS et al.²⁹ relataram que após a realização de um pré-tratamento catódico (500 mA cm⁻² por 180 s em solução de H₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹), os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo apresentaram uma melhora significativa da resposta eletroquímica quando comparada ao eletrodo pré-tratados anodicamente (superfície oxigenada).

Em trabalhos realizados com eletrodos de BDD pré-tratados catodicamente, observou-se melhores desempenhos com relação aos BDD pré-tratados anodicamente na determinação de diversos fármacos^{30, 31} e antioxidantes³².

1.2 Análise por injeção em batelada

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “batch injection analysis”) é uma técnica analítica apresentada na literatura por WANG e TAHA no início da década de 90¹⁵. O sistema BIA pode ser considerado uma boa alternativa aos métodos baseados em FIA (do inglês “flow injection analysis”) para também aumentar a frequência analítica³³. A técnica BIA com detecção amperométrica consiste em injetar, com o auxílio de uma micropipeta (normalmente eletrônica), um pequeno volume de uma solução da amostra diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho, estando este imerso em uma grande quantidade de volume do eletrólito suporte, ou seja, a célula contém, normalmente, um volume total de 100 ml.

A injeção da espécie de interesse sobre a superfície do eletrodo resulta em sinais transientes semelhantes aos obtidos em sistemas FIA.

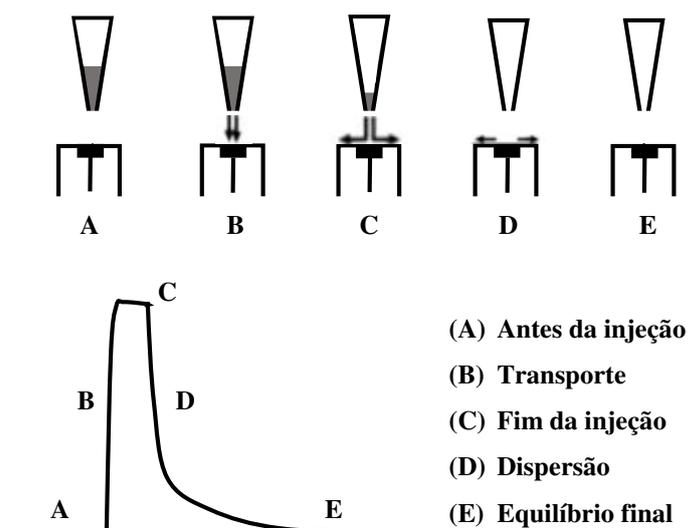


Figura 1: Etapas de operação de um sistema BIA com resultado obtido.

Conforme apresentado na Figura 1, o sistema BIA apresenta as seguintes etapas:

Antes da injeção da solução contendo amostra, há a presença de uma corrente residual gerada a partir do eletrólito suporte inerte (Figura 1A), indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. Quando uma alíquota de solução padrão ou da amostra (normalmente diluída em eletrólito de suporte devido a resistência) é injetada sobre a superfície do eletrodo de trabalho (Figura 1B),

ocorre um aumento rápido da corrente até chegar em um valor máximo, devido ao processo redox do analito de interesse (Figura 1C). A intensidade desse sinal é proporcional à concentração do analito na amostra (quando na faixa linear de resposta). Em seguida, ocorre uma queda do sinal em direção à linha base devido ao efeito da dispersão (Figura 1D), atingindo o equilíbrio existente antes da injeção (corrente residual; Figura 1E).

Ao compararmos o sistema BIA com o FIA, percebe-se que o procedimento BIA possui diversas características similares às apresentadas por FIA, como: rapidez, simplicidade, boa repetibilidade, sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes. Em ambos os sistemas, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho é menor em relação aos sistemas estacionários devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante as análises³⁴.

Um dos problemas recorrentes do sistema BIA empregando eletrodos sólidos em detecção eletroquímica é o de contaminação/adsorção de componentes na superfície do eletrodo de trabalho. Esse problema pode ser contornado, em sistemas hidrodinâmicos, pela aplicação repetitiva e alternada de pulsos de potenciais de limpeza³⁵⁻³⁶.

Recentemente, sistemas BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (AMP) vêm sendo explorados com sucesso para executar determinações simultâneas usando somente um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo³⁸. Por exemplo, para determinação simultânea de duas substâncias escolhe-se uma combinação com no mínimo dois pulsos de potenciais, de modo que em um dos pulsos apenas um analito seja detectado e no outro pulso ambas espécies respondam. Nesse caso, é extremamente importante usar nas análises envolvendo duas substâncias, um fator de correção simples para se obter a corrente relativa ao segundo analito^{9, 39}. A técnica permite ainda a aplicação de um terceiro ou quarto pulso de potencial para evitar a contaminação ou promover a constante limpeza eletroquímica e consequente renovação da superfície do eletrodo de trabalho empregado.

1.3 Furosemida (FRD)

A FRD (Figura 2) ou ácido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2-[(furanilmetil)amino benzoico] é um diurético inibidor do suporte de Na^+ , K^+ e Cl^- . Sua fórmula molecular é $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ com massa molecular de $330,75 \text{ g mol}^{-1}$, possui faixa de fusão em 206°C e pKa de 4,25, 9,83 e 16,96⁶. Quando administrada por via oral é absorvida rapidamente dentro de 5 a 10 minutos. O início da ação desse diurético é rápido quando administrada via venosa, sendo de 1 a 5 minutos. Quando administrada em doses máximas, chega a determinar a excreção de 30% da carga filtrada de sódio.

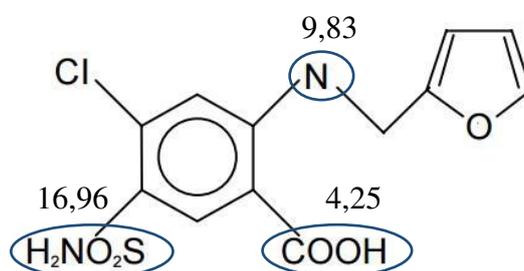


Figura 2: Estrutura química da FRD

A FRD é um dos medicamentos diuréticos mais potentes e eficazes disponíveis. Exerce a sua ação na alça de Henle, que é uma porção do néfron que regula o balanço de água e sódio do organismo, induzindo uma perda de cloreto de sódio e água⁴⁰. Mas recentemente, suas propriedades diuréticas fizeram da FRD um medicamento útil para o tratamento de hipertensão e retenção de líquidos (edema) em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, doença hepática e disfunção renal, tais como a síndrome nefrótica. A FRD é proibida nos esportes, por mascarar substâncias nos exames anti-doping⁴¹.

FRD é determinada em preparações farmacêuticas utilizando espectrofotometria no UV/VIS^{6,7}, espectrofotometria no infravermelho^{6,7} e colorimetria^{6,7,42}. Para doseamento as seguintes técnicas são utilizadas: espectrofotometria no UV/VIS⁴², titulometria^{7,42}, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV⁶ e métodos potenciométricos⁴³.

1.4 Hidroclorotiazida (HCT)

A HCT ou 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido (Figura 3) é um diurético inibidor do suporte de Na^+ e K^+ . Sua fórmula molecular é $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$ com massa molecular de $297,74 \text{ g mol}^{-1}$ ⁴², é muito usado como monoterapia ou em combinação com outros fármacos, tais como captopril, losartana e outros.

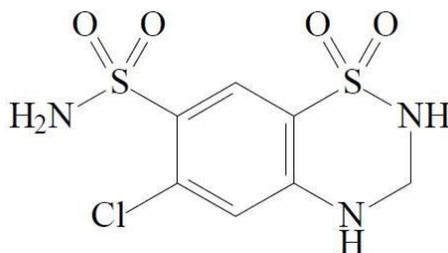


Figura 3: Estrutura química da HCT

A HCT é um diurético da classe dos tiazídicos, muito utilizada no tratamento de doenças como hipertensão arterial sistêmica, hipercalcemia, edema renal, doenças hepáticas, cardíacas e diabetes insípido nefrogênico, devido à sua eficácia terapêutica e seu baixo custo⁴⁴. É bastante eficaz via administração oral, sendo bem absorvida pelo trato gastrointestinal e excretada, principalmente, pela urina⁴⁵. Dentre os fármacos de curta ação, como a HCT, o efeito máximo é observado em cerca de quatro a seis horas com duração de oito a doze horas⁴⁶.

A HCT apresenta como principais efeitos adversos o resultado de suas ações renais, como a redução de potássio plasmático, o que pode induzir arritmias ventriculares⁴⁷. Outros efeitos indesejáveis são a alcalose metabólica, o aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico e a hiperglicemia, devendo por isso, ser usado com cautela^{45, 48}.

1.5 Determinação de HTC e FRD

A FARMACOPÉIA INTERNACIONAL⁴⁹ recomenda a volumetria ácido-base como procedimento de quantificação da furosemida. O procedimento descrito emprega o azul de bromotimol em dimetilformamida como indicador e a solução de amostra é titulada com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

BOGUZ e colaboradores⁵ desenvolveram procedimentos empregando cromatografia líquida e gasosa para a análise de oitenta fármacos, entre eles, os diuréticos amilorida, espironolactona, hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, acetozolamida e triantereno. Já Liu e colaboradores⁴⁶ alcançaram uma gama de 266 fármacos incluindo acetozolamida, amilorida, hidroclorotiazida, clorotiazida, furosemida, clortalidona e outros diuréticos, os limites de detecção variaram de 5 pg a 1 ng por amostra injetada e as recuperações variaram de 63 a 100%.

GIMENES et al⁹ determinaram captopril e hidroclorotiazida usando eletrodo BDD em BIA-AMP, com mínima manipulação das amostras (apenas dissolução e diluição no eletrólito). Uma sequência de potenciais pulsos foi selecionada de tal forma que o HCT foi detectado seletivamente a +1,4 V / 50 ms e ambos (HCT + CAP), foram detectados a +1,8 V / 50 ms com uma frequência analítica de 100 injeções h⁻¹. Os resultados obtidos com o método BIA foram comparados com os obtidos por eletroforese capilar e resultados semelhantes foram obtidos a 95% do nível de confiança.

PEREIRA et al¹¹ determinaram, simultaneamente, furosemida e amilorida utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica (BIA-AMP), onde foi utilizado o eletrodo de BDD, onde as características analíticas do método proposto incluem boa estabilidade (DPR <1,1%; n = 20), baixos limites de detecção (0,13 e 0,94 mg L⁻¹ para AMD e FMD, respectivamente), alto rendimento (72 injeções por h) e produção mínima de resíduos (menos de 150 µL por análise).

MANSANO et al¹⁴ determinou simultaneamente usando eletrodo de BDD uma mistura ternária anti-hipertensiva de amlodipina, hidroclorotiazida e valsartana em produtos farmacêuticos por voltametria de onda quadrada usando um eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente, com limites de detecção de 2,3×10⁻⁷ mol L⁻¹, 7,5×10⁻⁷ mol L⁻¹ e 6,2×10⁻⁶ mol L⁻¹ para AML, HCTZ e VAL, respectivamente. O método proposto

foi aplicado com sucesso na análise simultânea desses fármacos anti-hipertensivos em seus comprimidos farmacêuticos combinados disponíveis no mercado.

KARIMI-MALEH et al.⁵⁰ desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação de HCT em formulações farmacêuticas e urina, empregando-se um eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido ferrocenodicarboxílico e a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). Foram obtidas duas faixas lineares nas concentrações de 0,08 – 5,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,80 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um LD de 0,037 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

RAZAK⁵¹ utilizou um eletrodo de carbono vítreo, juntamente com a técnica de DPV para a determinação de hidroclorotiazida em amostras farmacêuticas e urina. A faixa linear de concentração obtida neste trabalho foi de 24 – 320 ng mL^{-1} com limites de detecção de 5,0 ng mL^{-1} para soluções padrões e de 14,0 ng mL^{-1} para urina.

O estudo do comportamento eletroquímico e a determinação de HCT em amostras de urina e formulações farmacêuticas sobre um eletrodo de carbono vítreo, modificado com nanotubos de carbono, utilizando a voltametria de redissolução anódica, foi descrita por Rezaei e Damiri⁵². Sob as condições empregadas, foram obtidas duas faixas lineares de concentração: 2,0 – 20,0 nmol L^{-1} e 0,2 – 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com LD de 0,8 nmol L^{-1} e uma precisão menor que 4%.

1.6 Amperometria

A técnica da amperometria baseia-se na aplicação de um potencial (Figura 4A) que produz uma resposta de corrente que decai rapidamente com o tempo (Figura 4B). Assim, o uso de sensores amperométricos tem como objetivo a medida de uma resposta de corrente a partir da aplicação de um potencial fixo.

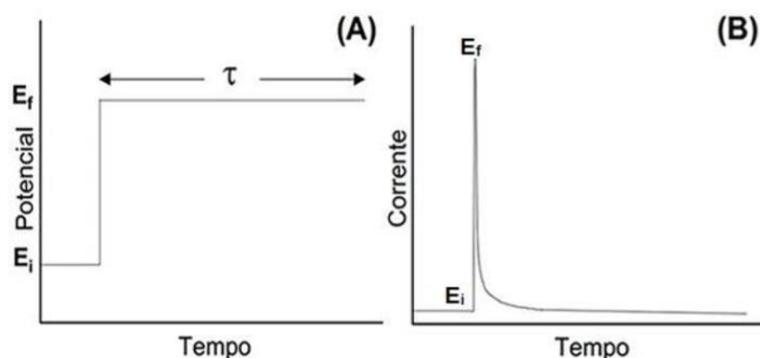


Figura 4: A) Degrau de potencial aplicado e B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.

A amperometria pode ser usada em eletroanálise desde que seja selecionado um potencial adequado para promover um processo faradáico, oxidação ou redução na superfície do eletrodo de trabalho. Na amperometria a potencial constante, a corrente capacitiva é mínima, pois a dupla camada elétrica é constante no decorrer de toda a medida. Uma das grandes limitações da amperometria convencional é a adsorção de impurezas, de espécies eletroativas ou produtos de reações redox na superfície do eletrodo de trabalho. Tais efeitos causam diminuição dos sinais de corrente devido ao bloqueio gradativo da área ativa da superfície do eletrodo de trabalho, o que compromete diretamente na reprodutibilidade dos sinais. Para contornar este problema, é proposto na literatura o uso da Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA, do inglês “multiple pulse amperometry”), pois o envenenamento do eletrodo de trabalho pode ser eliminado ou minimizado pela aplicação de potenciais de pulsos de limpeza e condicionamento alternados com o (s) pulso (s) de detecção⁵³.

Até onde conhecemos, esta técnica é disponibilizada apenas no software GPES, que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Autolab. Este software permite aplicar de 2 até 10 pulsos de potenciais de forma sequencial e repetitiva no mesmo eletrodo de trabalho, sendo possível a aquisição da corrente individualmente em cada pulso de potencial, o que corresponde à aquisição de até 10 amperogramas distintos simultaneamente.

Determinações simultâneas de compostos eletroativos em potenciais redox distintos³² somente são possíveis empregando a técnica de amperometria a potencial constante quando mais de um eletrodo de trabalho são usados na detecção⁵⁴. Quando

somente um eletrodo de trabalho é usado, determinações simultâneas somente são possíveis se a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (AMP)⁵³ é empregada.

Informações a respeito dos aspectos teóricos da detecção empregando a AMP são divulgadas na literatura. Dos Santos et al, em um artigo de revisão⁵³, abordam alguns aspectos teóricos, potencialidades (determinação simultânea, análises indiretas, limpeza eletroquímica, inserção de padrão interno para correção de variáveis do sistema em fluxo, etc.) e revisão bibliográfica sobre o tema.

Levando em consideração o potencial na AMP acoplada a sistemas FIA ou BIA, o desenvolvimento de novas metodologias de análise se torna vantajosa, uma vez que apresenta custo reduzido, boa reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, tempo reduzido de análise, simplicidade de execução e possibilidades de determinação simultânea com a injeção de uma alíquota de amostra.

1.7 Parâmetros de confiabilidade analítica

A validação de métodos analíticos mostra, através de eficiências objetivas, que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específicos são atendidos assegurando a confiabilidade dos resultados. Dessa forma, a necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais conhecida e exigida⁵⁶.

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos⁵⁷. Portanto, o método deve apresentar valores para limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, sensibilidade, linearidade, exatidão e robustez adequado a análise.

1.7.1 Limite de detecção (LD)

LD é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, não necessariamente quantificada, sob condições experimentais

estabelecidas⁵⁸. Para os métodos que empregam curva de calibração analítica, o LD pode ser expresso por:

$$LD = 3 \times s/a$$

Onde s é o desvio padrão do branco correspondente a no mínimo 10 medidas, e a é o coeficiente angular da curva da calibração (ou sensibilidade).

1.7.2 Limite de quantificação (LQ)

LQ é a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com precisão aceitável (repetitividade) e exatidão (concordância com o valor verdadeiro e correspondente)⁴³ sob condições experimentais adotadas.

$$LQ = 10 \times s/a$$

Onde s é o desvio padrão do branco e a é o coeficiente angular da curva da calibração (ou sensibilidade).

1.7.3 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão do método e está relacionada com a concordância entre os resultados de medidas sucessivas⁵⁸, ou seja, as medidas foram efetuadas em curto espaço de tempo sob mesmo procedimento de medição, observador, instrumento, condições de medida e local.

Verificou-se a repetibilidade do método contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método, sendo expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas. O DPR é calculado pela seguinte maneira:

$$DPR(\%) = \frac{DPx}{\bar{x}} * 100$$

Onde DPx é o desvio padrão absoluto da concentração encontrada e \bar{x} é o valor médio encontrado.

1.7.4 Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal^{59, 60}.

Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório⁶⁰.

1.7.5 Exatidão

A exatidão indica a proximidade da medida do valor verdadeiro ou aceito, sendo expresso pelo erro⁶⁸. A exatidão mede a concordância entre um resultado calculado e o valor aceito ou de referência, sendo expresso em termos do erro absoluto e erro relativo. O erro relativo Er é uma quantidade mais usada que o erro absoluto, é dado em porcentagem pela expressão:

$$Er = \frac{Xi - Xv}{Xv} \times 100$$

Onde Xi é o valor calculado e Xv é o valor aceito ou de referência.

1.7.6 Sensibilidade

A sensibilidade da calibração e a variação no sinal de resposta pela variação da unidade de concentração do analito. A sensibilidade é, portanto, a inclinação da curva analítica, e se a curva de calibração for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração⁶⁸.

1.7.7 Linearidade

Calibração, de acordo com o Inmetro⁵⁸, é o conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões. Amostra padrão é uma amostra de referência que contém o analito de interesse⁶⁸. Para verificar se existe uma relação linear entre duas variáveis x_i e y_i , usa-se o coeficiente de correlação de Pearson r ⁶⁸.

$$r = \frac{n\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\{[n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2][n\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]\}^{1/2}}$$

O valor de r deve estar entre -1 e +1, pois indica maior probabilidade de existência de correlação linear. Valores de r que tendem a zero indicam que x e y não estão linearmente correlacionados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método usando a análise por injeção em batelada com detecção eletroquímica para a determinação simultânea dos diuréticos FRD e HCT em formulações farmacêuticas e amostras biológicas.

2.2 Específicos

A fim de alcançar o objetivo proposto, as realizações dos seguintes objetivos específicos se fizeram necessário:

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico da FRD e HCT, investigar as propriedades oxido-redução e escolher qual eletrodo de trabalho (carbono vítreo, ouro ou diamante dopado com boro) será utilizado nas análises;
- ✓ Avaliar alguns parâmetros que influenciam na resposta analítica do sistema BIA: pulso de potencial do eletrodo, agitação da solução no interior da célula, volume e vazão de injeção;
- ✓ Validar o método sob os parâmetros de confiabilidade analítica (parâmetros de desempenho analítico): sensibilidade, repetibilidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação;
- ✓ Efetuar a quantificação dos compostos de interesse em fármacos comerciais e em amostras biológicas empregando o sistema proposto.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

3.1.1 Medidas eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas usando potenciostato/galvanostato 302N conectado a um microcomputador e controlado pelo software GPES versão 4.9.007.

3.1.2 Medidas espectrofotométricas UV-Vis

As medidas por espectrofotometria UV-VIS foram realizadas usando o equipamento Cary 50 Conc, modelo ELO1115146 conectado a um computador.

3.1.3 Voltametria Cíclica

Antes dos experimentos, foi realizado um processo de limpeza e ativação eletroquímica do eletrodo BDD aplicando uma corrente de +0,01 A por 1000 s usando uma solução tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (ativação anódica) e, em seguida, aplicando-se -0,01 A por 1000 s em solução H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (ativação catódica). Estes pré-tratamentos são similares aos usados em estudos publicados anteriormente^{11, 13}. Estes pré-tratamentos eletroquímicos (anódico e catódico) somente foram realizados em eletrodos novos, ou quando observado uma diminuição muito acentuada do sinal analítico. Usou-se a técnica de voltametria cíclica para investigar o mecanismo de oxirredução da FRD e HCT. No experimento, usou-se as concentrações da

FRD e HCT em 1,0 mmol L⁻¹ e aplicou-se uma varredura cíclica de potencial com início em 0,0 V, potencial de inversão em 1,4 V e potencial final em 0,0 V, com velocidade de 50 mV s⁻¹, incremento de potencial de 5,0 mV. Além disso, quando o eletrodo não foi usado por alguns dias, também foi necessário realizar novamente os pré-tratamentos (anódico e catódico)¹¹. Por outro lado, o tratamento catódico foi realizado em todos os dias antes do início de cada dia de trabalho.

3.1.4 Eletrodos utilizados

Utilizou-se o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho e como eletrodos de referência e auxiliar, foram usados um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3M) e um eletrodo platina (Pt), conforme figura 5.

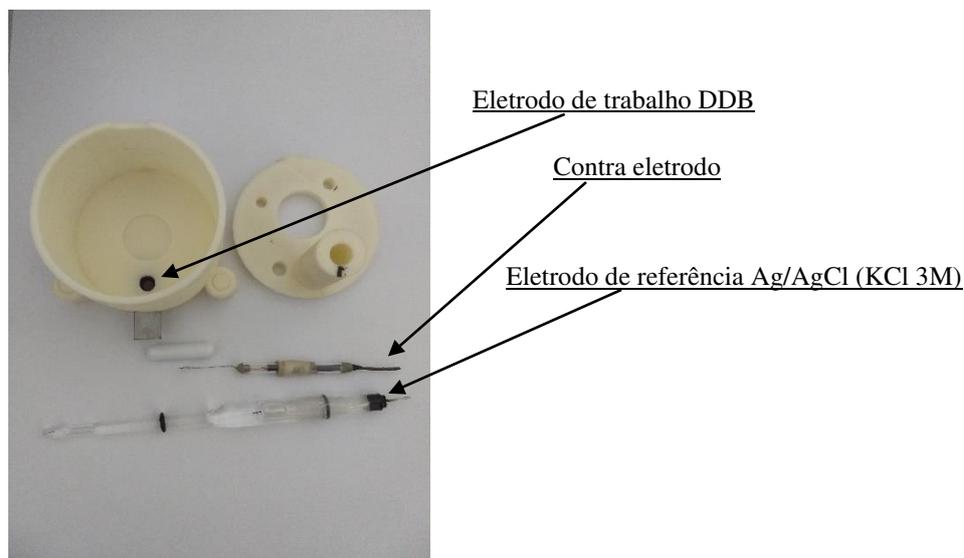


Figura 5: Célula eletroquímica com seus respectivos eletrodos

3.1.5 Célula para medidas eletroquímica

A célula eletroquímica usada no sistema BIA (Figura 6) foi confeccionada com uma impressora 3D e cedida pelo professor Rodrigo A. A. Muñoz coordenador do Núcleo de Pesquisas em Eletroanalítica da Universidade Federal de Uberlândia. Esta célula consiste em um recipiente cilíndrico com capacidade máxima de 100 mL.

O eletrodo de BDD foi posicionado na parte inferior da célula com um auxílio de um anel de borracha (O-ring) e pressionado por uma lâmina de aço permitindo assim o contato elétrico com o eletrodo. A parte inferior foi fixada com o encaixamento por porcas rosqueados no fundo do tubo. A área útil do eletrodo de BDD foi definida como área geométrica do anel de borracha sendo de $0,40 \text{ cm}^2$.

Na parte superior (tampa), existe três orifícios onde foram posicionados o eletrodo de referência, o eletrodo auxiliar e a micropipeta eletrônica de modo que a

ponteira da micropipeta fosse firmemente introduzida ao orifício, de maneira frontal à superfície do eletrodo de trabalho, conforme Figura 6. Para assegurar sinais analíticos sensíveis e reproduzíveis, uma distância fixa de 2 mm entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo foi usada em todo o trabalho. Por fim a agitação da solução foi possível mediante o uso de um agitador magnético posicionado no centro da célula conforme Figura 6.

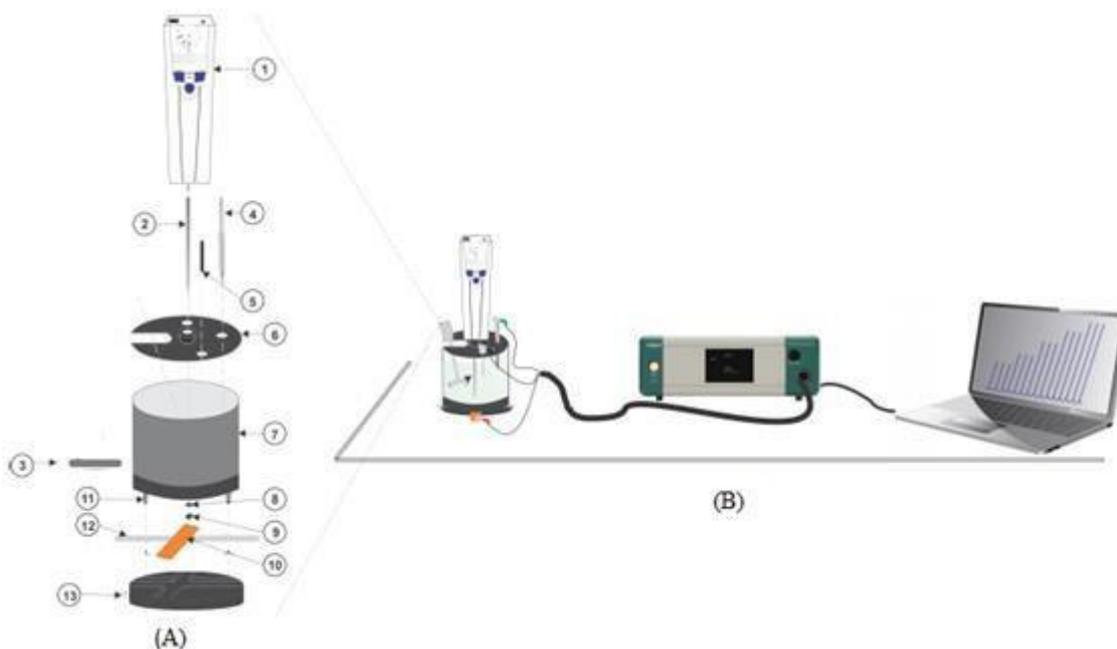


Figura 6: (A) vista da célula BIA: (1) micropipeta eletrônica; (2) ponteira; (3) agitador magnético; (4) eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl_{sat}; (5) eletrodo auxiliar Pt; (6) tampa da célula BIA; (7) corpo da célula BIA; (8) anel de borracha; (9) eletrodo de trabalho; (10) placa de cobre impresso; (11) parafusos; (12) placa metálica; (13) base da célula BIA e (B) Sistema BIA acoplado ao potenciostato/galvanostato conectado a um computador.

A micropipeta eletrônica usada no sistema BIA foi a EDP3-Plus (Figura 7) permitindo manipulação de diversos volumes (com intervalo de 20 μL até 200 μL) e velocidade de dispensa ($19 \mu\text{L s}^{-1}$ até $143 \mu\text{L s}^{-1}$).



Figura 7: micropipeta eletrônica

3.2 Reagentes

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade não inferior a $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida em um sistema de purificação de água Millipore Direct 8. Todos os reagentes utilizados no experimento foram de pureza analítica (PA). Ácido bórico, cloreto de potássio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e cloreto de amônio foram obtidos pela ISO FAR. Ácido acético glacial, ácido sulfúrico 95-97%, sulfato de sódio anidro, dihidrogenofosfato de potássio e uréia foram obtidos pela MERCK. FRD e HCT foram obtidos pelo laboratório GALENA QUÍMICA E FARMACÊUTICA Ltda, Campinas, SP e cloreto de cálcio, PA, dihidratado foi obtido pela PROQUIMIOS. Utilizou-se a solução tampão Britton-Robinson⁵⁵ como eletrólito suporte nos experimentos e as amostras das soluções-estoque dos padrões foram preparadas diariamente.

3.3 Soluções e procedimentos

Para o estudo inicial do comportamento eletroquímico, as soluções estoque de FRD e HCT foram preparadas em meio alcalino ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na concentração de $4,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Usou-se como eletrólito de suporte o tampão Britton-Robinson, sendo preparado pela mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, todos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH de cada solução tampão foi

ajustada com NaOH $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de modo a obter-se soluções tampão com valores diferentes de pH.

As amostras de medicamentos de empresas diferentes contendo FRD e HCT foram comprados em farmácias na cidade de São Luís – MA. No procedimento de preparo de amostras, as massas do conteúdo de vinte comprimidos foram pesadas e maceradas até completa homogeneização utilizando-se um almofariz e pistilo de porcelana. Em seguida, pesou-se cerca de 13,3 mg de FRD e 12 mg de HCT e usou-se NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solvente a um volume de 10 ml.

No teste adição e recuperação dos analitos, três concentrações diferentes de solução padrão de FRD e HCT foram adicionadas às soluções das amostras e aplicados na equação da reta da curva de calibração, onde os resultados obtidos são descontados daqueles sem a adição da solução padrão e multiplicado por 100, obtendo assim, o resultado em porcentagem.

No método de referência, as amostras farmacêuticas foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis empregando NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solvente nas amostras e padrões. Usou-se NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para ajustar o zero em 271 nm para determinação da FRD e, em seguida, usou-se água para ajustar o zero na determinação de HCT em 273 nm. Realizou-se os experimentos em ambos os analitos, a medida do branco, em seguida, medida de uma solução padrão e realizou-se medidas usando as amostras farmacêuticas. Tais procedimentos foram realizados conforme descrito na farmacopeia brasileira⁶¹.

A amostra de urina sintética foi preparada como descrito por Laube et al.⁶⁶ contendo a seguinte composição: 0,73 g NaCl, 0,40 g KCl, 0,27 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,56 g Na_2SO_4 , 0,35 g KH_2PO_4 , 0,25 g NH_4Cl e 6,25 g ureia em um balão volumétrico de 250 mL, completando-o com água deionizada. A amostra de urina foi utilizada logo após a preparação da mesma, sendo que alíquota de 200 μL foi diluída no respectivo eletrólito de suporte. Adicionou-se 200 μL da urina em três concentrações diferentes de FRD e HCT ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente, na presença de oxigênio dissolvido. Varreduras de voltametria cíclica foram realizadas usando uma célula de 10 mL enquanto que medidas amperométricas foram realizadas usando a célula BIA.

4. RESULTADO E DISCURSÕES

4.1 Comportamento eletroquímico da FRD e HCT

Nos estudos iniciais para determinação da FRD e HCT, avaliou-se o perfil voltamétrico dessas moléculas, o qual foi investigado e otimizado com objetivo de se obter melhor estabilidade (melhor repetitividade) e maior magnitude da corrente. Nos intervalos de cada ciclo, realizou-se agitação da célula.

4.2 Voltametria cíclica e estudo do pH

A voltametria cíclica foi inicialmente usada para avaliar os processos redox dos compostos em diferentes eletrodos de trabalho. Nos primeiros experimentos, usou-se o eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho, onde verificou-se a sobreposição dos picos de oxidação em ambos os compostos, sendo inviável seu uso conforme mostra a Figura 8.

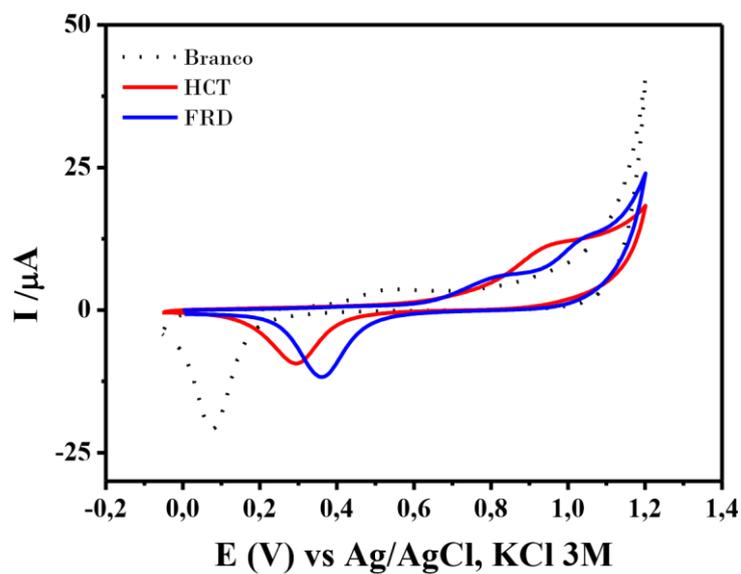


Figura 8: Voltamogramas cíclicos obtido usando o eletrodo de ouro em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0 na adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: $5,0 \text{ mV}$.

No eletrodo de carbono vítreo, os compostos foram facilmente adsorvidos na sua superfície o que provocou uma queda no sinal analítico nas medias seguintes, diminuindo sua reprodutibilidade conforme mostra a Figura 9. Por este motivo, o uso deste eletrodo apresentou fortes limitações.

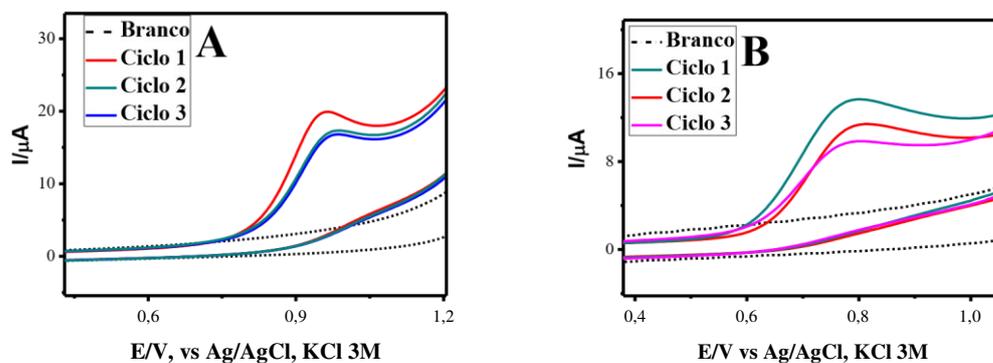


Figura 9: Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo de carbono vítreo em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0 na adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FRD (A) e HCT (B). Velocidade: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: $5,0 \text{ mV}$.

Por outro lado, o eletrodo de trabalho BDD apresentou uma baixa corrente de fundo, além de fraca adsorção molecular de espécies eletroativas na sua superfície (Figura 10) e adequada separação entre os sinais voltamétricos para os dois compostos (Figura 11A).

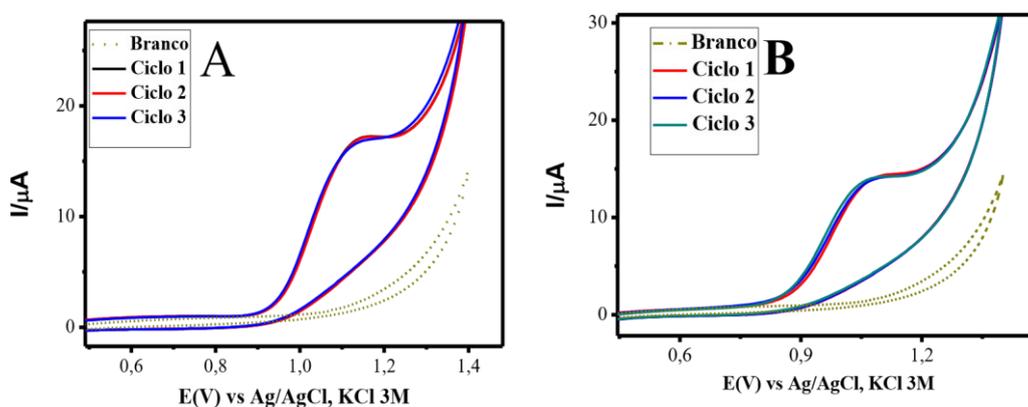


Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0 na adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FRD (A) e HCT (B). Velocidade: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: $5,0 \text{ mV}$.

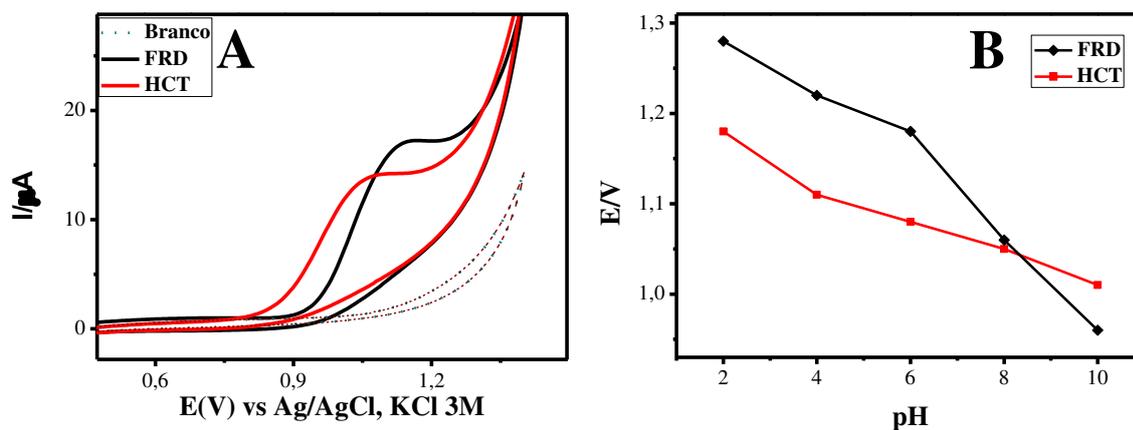


Figura 11: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão Britton-Robinson pH 10,0 na adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: $5,0 \text{ mV}$ e (B) Influência dos valores de pH nos picos de potenciais anódicos de FRD e HCT.

De acordo com a Figura 11A, as respostas voltamétricas mostraram a presença de processos de oxidação na região de potenciais de $+1,15 \text{ V}$ para FRD e $+1,02 \text{ V}$ para HCT. Não observou-se processos de redução para ambas as espécies na faixa de potencial estudada, sugerindo que o processo é irreversível em tais condições. De acordo com a literatura¹¹, a eletrooxidação da FRD envolve a transferência de dois elétrons, e dependendo do pH da solução, dois picos voltamétricos podem ser observados. Neste estudo, apenas o primeiro pico de oxidação foi utilizado, correspondendo à oxidação do grupo sulfonilamina^{11, 43} como mostra a Figura 12. Para a HCT, conforme descrito na literatura, o mecanismo de oxidação eletroquímica em eletrodos de BDD envolve a transferência de 2 elétrons e 2 prótons¹⁴.

O efeito da concentração hidrogeniônica (Figura 11B) mostrou que os potenciais de picos de oxidação dos compostos variaram com a mudança do pH do tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando que a melhor condição para determinação eletroquímica simultânea de FRD e HCT é em pH 4,0, pois neste valor de pH foi observado maior separação entre os valores de potencial de pico, com uma diferença de 110 mV .

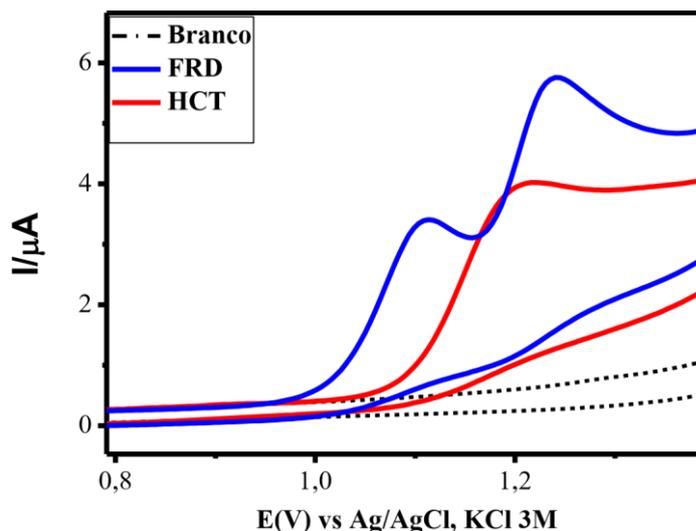


Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo BDD em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão Britton-Robinson pH 4,0 na adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FRD e HCT. Velocidade: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: $5,0 \text{ mV}$.

4.3 Voltametria hidrodinâmica

Após a escolha do pH 4,0 do tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ usado como eletrólito suporte, realizou-se testes adicionais para verificar o comportamento eletroquímico da FRD e HCT em condições hidrodinâmicas, empregando o sistema BIA com detecção amperométrica. Neste estudo, treze potenciais (0,20 V; 0,30 V; 0,40 V; 0,50 V; 0,60 V; 0,70 V; 0,80 V; 0,90 V; 1,0 V; 1,10 V; 1,20 V; 1,30 V e 1,40 V) foram aplicados individualmente a fim de verificar os potenciais de oxidação dos compostos, onde a corrente de cada potencial foi monitorada durante as injeções em triplicatas ($n = 3$) de soluções contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD e $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT, individualmente. A corrente de oxidação foi registrada em forma de picos e usadas na construção da voltametria hidrodinâmica conforme ilustrado na Figura 13.

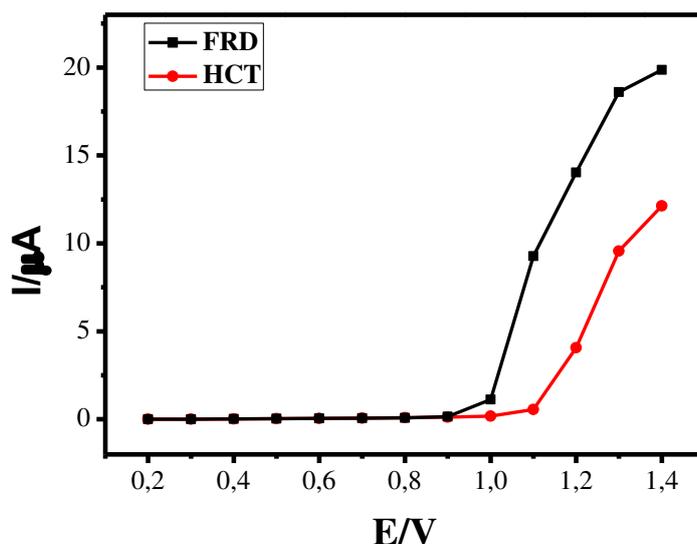


Figura 13: Voltametria hidrodinâmica para o estudo da FRD e HCT, ambos em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, usando o eletrodo de trabalho BDD em solução tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0. Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$, velocidade de dispensa: $67 \mu\text{L s}^{-1}$.

Este estudo mostrou que, nestas condições, a oxidação da FRD iniciou-se em potencial $+0,90 \text{ V}$ e atinge um valor máximo próximo de $E = +1,30 \text{ V}$. Para a HCT, a oxidação iniciou em potencial $+1,0 \text{ V}$ atingindo valor máximo de $E = +1,40 \text{ V}$. Objetivando-se uma determinação simultânea dos dois compostos é importante que o comportamento voltamétrico de ambos apresente diferença de algumas centenas de mV (pelo menos 100 mV) onde um composto pode apresentar o processo redox enquanto o outro não. Dessa forma, analisando a Figura 13, podemos perceber que em $E = +1,10 \text{ V}$ apenas a FRD é oxidada, sendo que neste potencial, a oxidação da HCT é desprezível. Contudo, em potencial $E = +1,30 \text{ V}$ ambos os compostos são oxidados. Nestas condições, selecionou-se a combinação de pulsos em $+1,10 \text{ V}$ apenas para oxidação da FRD e de $+1,30 \text{ V}$ para oxidação da FRD e HCT, obtendo-se assim uma boa separação.

4.4 Seleção dos pulsos de potenciais na determinação simultânea de HCT e FRD por BIA-AMP

A partir dos resultados apresentados, no item 4.3, verificou-se a possibilidade de determinação simultânea de FRD e HCT utilizando aplicação sequencial de dois pulsos de potenciais, sendo estes:

- ✓ +1,10 V/100 ms: oxidação somente da FRD;
- ✓ +1,30 V/100 ms: oxidação dos dois compostos (HCT e FRD).

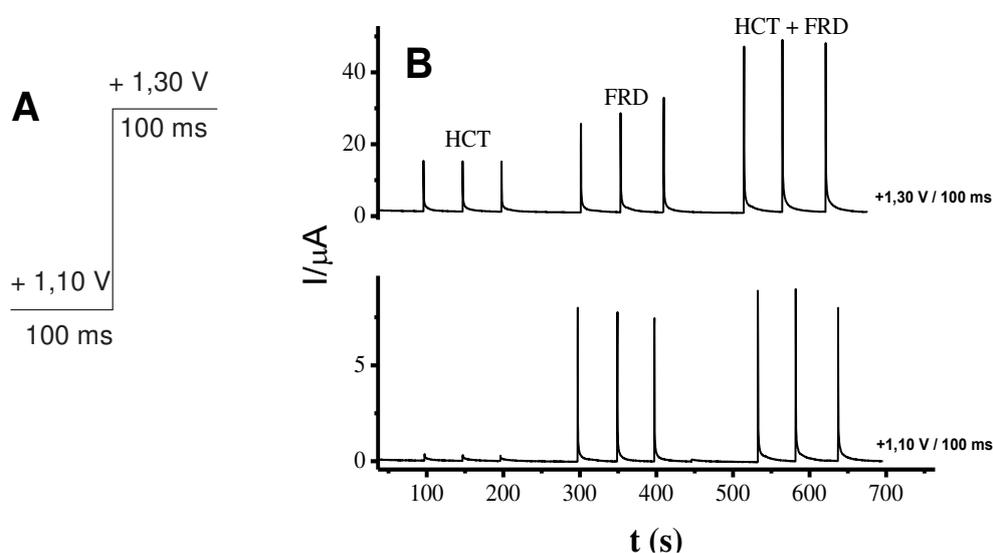


Figura 14: A) Esquema dos pulsos de potenciais. B) Respostas obtidas no sistema BIA-AMP para injeções de soluções contendo HCT ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e FRD ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e uma mistura de HCT + FRD ($50 \mu\text{mol L}^{-1} + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Britton-Robinson pH 4,0 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$). Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$, velocidade de dispensa: $67 \mu\text{L s}^{-1}$.

Observou-se pelos amperogramas da Figura 14B, que apenas a FRD é oxidada em +1,10 V, sendo que neste potencial, a corrente detectada para o HCT é muito pequena e por isso pode ser desconsiderada, indicando também que não há interação química entre HCT e FRD ou com os produtos de oxidação. Em +1,30 V, tanto a HCT quanto a FRD são oxidadas.

Um fenômeno que também pode ser observado é que a oxidação da FRD não gera a mesma magnitude de corrente em ambos os pulsos de potenciais (+1,10 V e +1,30V), o que impede o uso de uma subtração simples entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($I_{+1,30 \text{ V}} - I_{+1,10 \text{ V}}$) para ter acesso à corrente de oxidação relacionado somente com a oxidação da HCT. No entanto, este problema pode ser

contornado através do uso de um fator de correção (FC), que é obtido pela razão (divisão) entre a corrente de oxidação da FRD obtida em +1,30 V e pela corrente de FRD em +1,10 V mediante a injeção de solução contendo apenas FRD¹¹. Assim, quando uma solução contendo os dois compostos é injetada no sistema BIA-AMP, a corrente de oxidação da HCT pode ser obtida pela subtração entre a corrente detectada na mistura de HCT e FRD em +1,30 V e a corrente detectada em +1,10 V multiplicada pelo FC de acordo com as equações 1 e 2, que foram usadas nos cálculos para obtenção das correntes relacionadas com a oxidação de HCT e do FC, respectivamente.

$$FC = I_{FRD\ 1,30V} / I_{FRD\ 1,10V} \quad \text{Eq 1}$$

$$I_{HCT} = I_{1,30\ V} - (FC \times I_{1,10V}) \quad \text{Eq 2}$$

Assim, com os amperogramas obtidos nos dois pulsos de potenciais (em +1,10 V e +1,30 V) e as equações acima, é possível detectar seletivamente as correntes de oxidação da HCT e da FRD quando presentes na mesma solução.

4.5 Otimização do sistema BIA-AMP

O desempenho do sistema BIA-AMP foi investigado com o intuito de melhorar a estabilidade, sensibilidade e a frequência de amostragem. Os parâmetros estudados e avaliados foram os seguintes: velocidade de dispensa, volume de dispensa e agitação do eletrólito de suporte.

Na Figura 15, observou-se a aquisição de corrente no ápice de cada pico. A quantidade de aquisições de corrente por pico é um dado importante, pois na obtenção do fator de correção, utilizou-se a altura dos picos, e, portanto, pelo menos duas (ou mais) amostragens de corrente no ápice de cada pico é importante para que o sistema tenha boa repetibilidade. De acordo com a Figura 15, pode-se observar duas amostragens de corrente no ápice de cada pico.

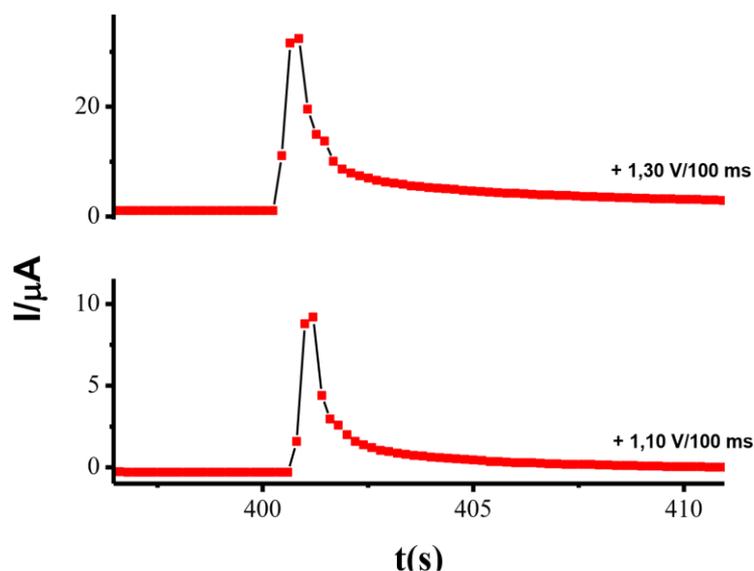


Figura 15: Picos transientes de acordo com seus respectivos pontos de amostragem de corrente obtido após a injeção de uma solução contendo HCT + FRD (ambos em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) no sistema BIA-AMP.

4.6 Estudo da velocidade de injeção

Estudos sobre a influência da velocidade de injeção da micropipeta eletrônica sobre a resposta BIA-AMP foram realizadas variando entre $19 \mu\text{L s}^{-1}$ a $143 \mu\text{L s}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 16.

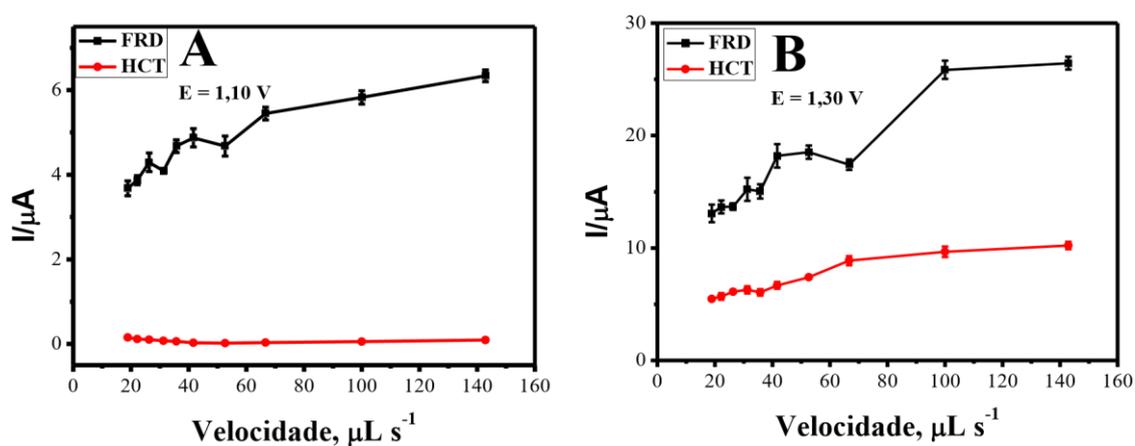


Figura 16: Estudo da velocidade de injeção da micropipeta eletrônica dos analitos FRD e HCT, ambos em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando eletrodo de trabalho BDD, em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 em: $19 \mu\text{L s}^{-1}$; $22 \mu\text{L s}^{-1}$; $26 \mu\text{L s}^{-1}$; $31 \mu\text{L s}^{-1}$; $36 \mu\text{L s}^{-1}$; $42 \mu\text{L s}^{-1}$; $52 \mu\text{L s}^{-1}$; $67 \mu\text{L s}^{-1}$; $100 \mu\text{L s}^{-1}$ e $143 \mu\text{L s}^{-1}$.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 16, percebeu-se um aumento nas correntes de oxidação com o aumento da velocidade de injeção da

micropipeta eletrônica. Isso ocorre devido ao aumento da taxa de transporte de massa na superfície do eletrodo de trabalho BDD. Nesse sentido, os pontos de aquisição de corrente de pico demonstraram que, com o aumento da velocidade de injeção, o sinal de corrente também aumenta para ambos os compostos. Assim, avaliou-se a intensidade do sinal amperométrico detectado, observando que a melhor resposta para a velocidade de injeção foi obtida em $100 \mu\text{L s}^{-1}$ para ambos os compostos em ambos os potenciais.

4.7 Estudo do volume de dispensa da micropipeta eletrônica

Na Figura 17, observou-se que a corrente de oxidação da FRD e HCT varia significativamente nos dois pulsos de potenciais aplicados (+1,10 V e +1,30 V), até um volume injetado de $60 \mu\text{L}$. Em volumes maiores, observou-se uma estabilização na corrente de pico em $E = +1,10 \text{ V}$. Em $E = +1,30 \text{ V}$, o volume de $120 \mu\text{L}$ apresentou mais aquisições na altura de corrente de picos e menor desvio padrão garantindo, dessa forma, melhor estabilidade no sistema. Por esse motivo, o volume de dispensa da micropipeta eletrônica de $120 \mu\text{L}$ foi escolhido para os demais experimentos.

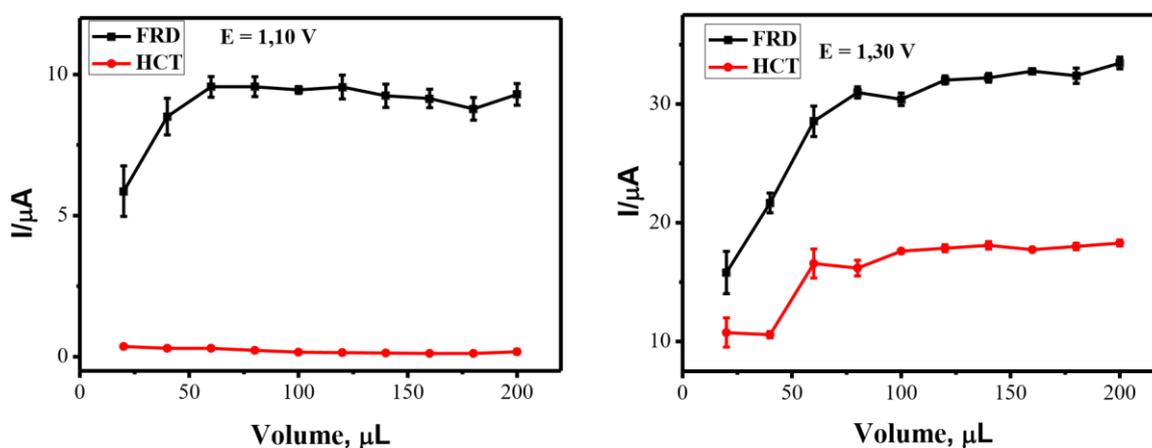


Figura 17: Influência do volume injetado na resposta obtida com o sistema BIA-AMP. Volumes de injeção estudados: de 20 a $200 \mu\text{L}$. Solução injetada: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT. Eletrodo de BDD ativado catodicamente, eletrodo referência $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$, eletrodo auxiliar Pt em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 em $E = +1,10 \text{ V}$ e $E = +1,30 \text{ V}$. Velocidade de injeção da micropipeta eletrônica: $100 \mu\text{L s}^{-1}$.

4.8 Estudo da influência da agitação do eletrólito de suporte no sinal analítico

O efeito da agitação da solução do interior da célula BIA foi avaliado através da injeção de soluções de FRD e HCT. Para agitação usou-se um agitador magnético e os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 18.

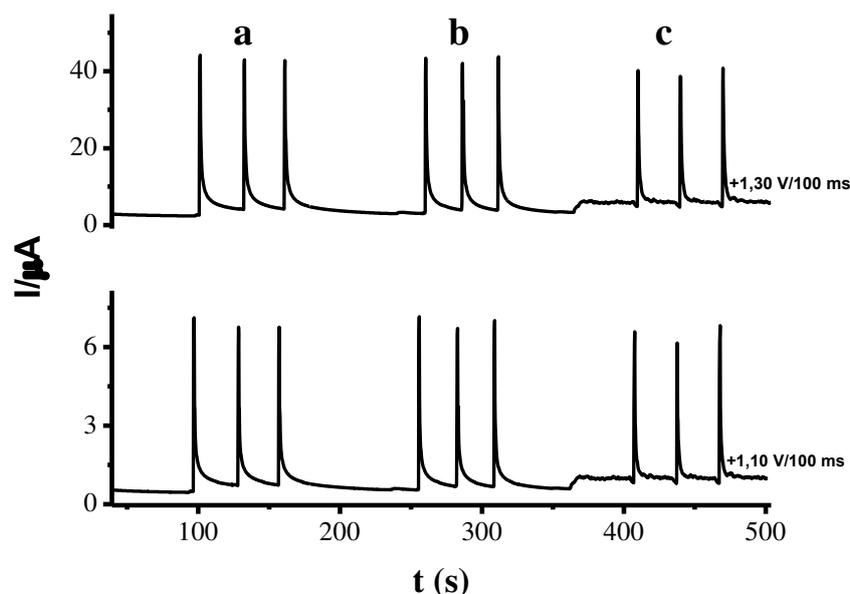


Figura 18: Efeito da agitação do eletrólito suporte usando FRD + HCT ($50 + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$), nas correntes obtidas por BIA-AMP em a) sem agitação, b) em 150,0 rpm e c) 250 rpm. Velocidade de injeção: $100 \mu\text{L s}^{-1}$, volume de dispensa: $120 \mu\text{L}$.

Durante os estudos de influência da agitação do eletrólito de suporte no sinal analítico da FRD e HCT, observou-se que a agitação no sistema acelera a remoção do material eletroativo da interface eletrodo/solução e a corrente gerada (sinais transientes) retorna para a linha base mais rapidamente, o que aumenta a frequência analítica do sistema. Além disso, os analitos e seus produtos de oxidação são rapidamente removidos da superfície do eletrodo de trabalho, o que reduz a possibilidade de contaminação do eletrodo. A determinação simultânea de FRD e HCT poderia ser usada sem agitação no interior da célula BIA, porém, para uma diminuição na dispersão dos sinais analíticos e aumento da frequência analítica, optou-se em usar o sistema BIA-AMP com agitação a 150 rpm, apresentando sinais analíticos mais estáveis e conseqüentemente mais reprodutíveis como mostrou a Figura 18, escolheu-se este para as demais análises. Em 250 rpm, houve uma instabilidade na linha de base e uma diminuição do sinal analítico, não sendo possível seu uso no método proposto.

A Tabela 1 mostra os parâmetros estudados e os valores escolhidos na otimização do método BIA-AMP.

Tabela 1: Parâmetros relacionados com o sistema BIA-AMP, estudados e otimizado.

Parâmetros	Avaliados	Valor Otimizado
Potenciais de oxidação, V	0,2 - 1,40	+1,10 e +1,30
pH	2,0 - 10,0	4,0
Velocidade de injeção, $\mu\text{L s}^{-1}$	18,8 - 142,8	100
Volume de injeção, μL	20 - 200	120
Agitação, rpm	0 - 250	150

4.9 Estudo da repetibilidade do método

O método analítico adequado requer que o sinal obtido tenha elevada estabilidade. Por isso, primeiramente foi avaliado o efeito memória por meio de um teste de repetibilidade do sistema BIA-AMP com injeções alternadas de soluções contendo uma mistura de FRD e HCT nas concentrações de a) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados são apresentados na Figura 19.

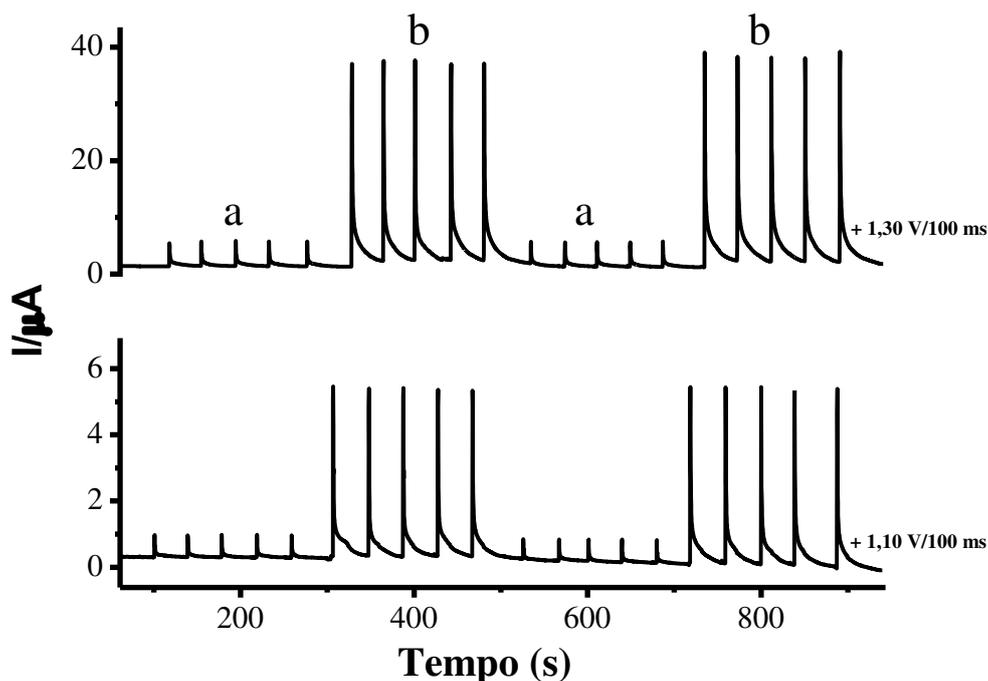


Figura 19: Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo a) $5 \mu\text{mol L}^{-1} + 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e b) $50 \mu\text{mol L}^{-1} + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT + FRD. Demais condições experimentais otimizadas conforme Tabela 1.

Tabela 2: Estudo de repetibilidade do método

Soluções	$I_{\text{média}}/\mu\text{A}$	DPR
+1,30 V/100 ms		
$5 \mu\text{mol L}^{-1} + 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD + HCT	5,69	2,10
$50 \mu\text{mol L}^{-1} + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD + HCT	37,94	2,07
+1,10 V/100 ms		
$5 \mu\text{mol L}^{-1} + 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD + HCT	0,96	1,83
$50 \mu\text{mol L}^{-1} + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD + HCT	5,41	0,84

Uma repetibilidade muito satisfatória nos picos para ambas as concentrações foi verificada neste experimento com baixo DPR conforme mostrou a Tabela 2. Estes resultados indicam que o sistema BIA-AMP proposto apresentou boa repetibilidade diante dos parâmetros otimizados anteriormente, uma vez que os DPR obtidos foram abaixo de 5% e não foi observado efeito de memória entre as sucessivas injeções, mesmo alternando as soluções de diferentes concentrações.

Em seguida, a fim de confirmar a possibilidade de adsorção da superfície do eletrodo de trabalho de BDD na concentração mais elevada, realizou-se injeções sucessivas ($n = 30$) de uma mistura contendo concentração de FRD e HCT em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Resultado está ilustrado na Figura 20.

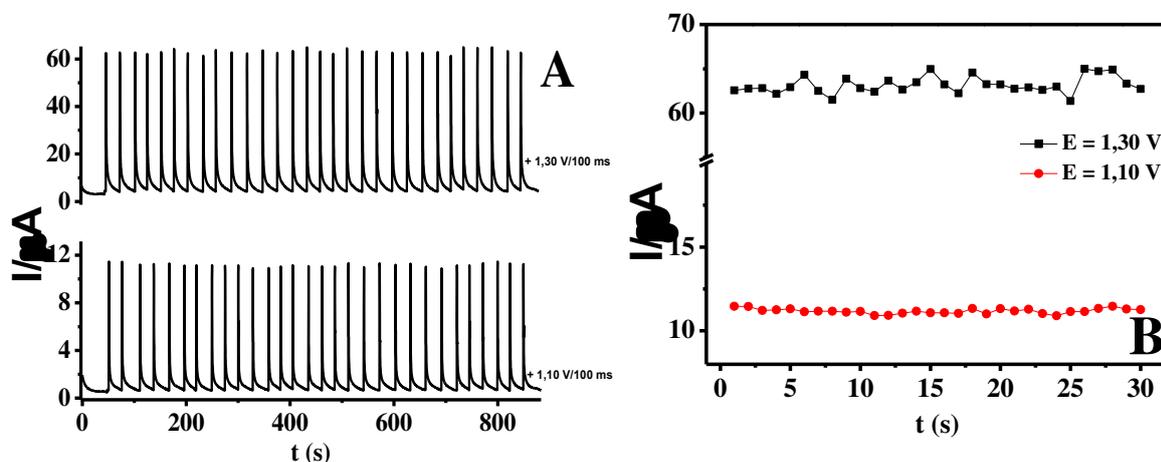


Figura 20: A) Amperogramas obtido simultaneamente no sistema BIA-AMP usando solução contendo FRD + HCT, ambas nas concentrações simultâneas de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e B) resposta analítica em $E = 1,30 \text{ V}$ (—■—) e $E = 1,10 \text{ V}$ (—●—).

Neste estudo, o DPR ($n = 30$) foi de 1,53% em $E = +1,30 \text{ V}$ e 1,39% em $E = +1,10 \text{ V}$ para injeções de uma mistura contendo FRD e HCT na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Conforme resultados das correntes de picos apresentados na Figura 20B, o sistema BIA-AMP proposto apresentou boa repetibilidade e estabilidade diante dos parâmetros otimizados anteriormente, sendo que os DPR obtidos foram baixos e não foi observado adsorção na a superfície do eletrodo entre as sucessivas injeções de FRD e HCT na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Com base na Figura 20, podemos observar que, para a análise experimental após 50 segundos, houve a primeira injeção dos analitos e as injeções seguintes foram realizadas com intervalo de 30 em 30 segundos, podendo chegar a uma frequência analítica experimental de 120 injeções por hora. Contudo, analisando apenas o tempo em que o sinal analítico atinja a corrente limite e retorne a linha de base na Figura 20, podemos obter uma frequência analítica teórica de 142 injeções por hora.

4.10 Estudo do fator de correção – FC

Conforme descrito anteriormente, para a determinação simultânea de FRD e HCT empregando a amperometria de múltiplos pulsos, é de extrema importância estabelecer o fator de correção. Dessa forma, no desenvolvimento do método analítico, estudos para identificação da faixa de concentração onde há uma relação linear entre corrente/concentração também são necessários. Portanto, além da identificação da faixa linear de resposta, também há uma necessidade de identificar a faixa de concentração da FRD onde o FC é constante. E como apresentado anteriormente, o FC serve para identificar a corrente de oxidação da HCT no pulso de potencial de +1,30 V. Sendo assim a Figura 21 apresenta os valores de FC em função da variação na concentração da FRD em $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

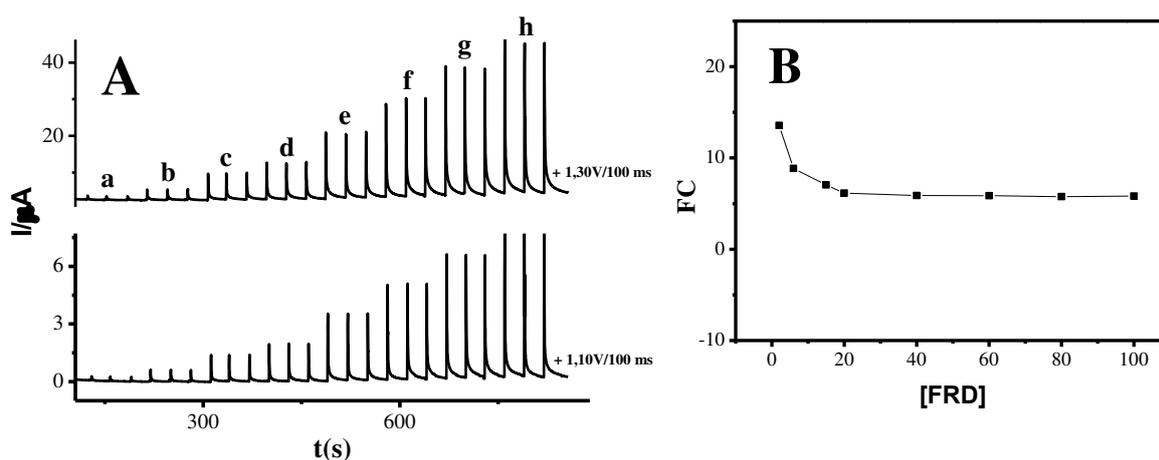


Figura 21: Influencia da concentração da FRD no FC ($I_{\text{FRD } +1,30\text{V}}/I_{\text{FRD } +1,10\text{V}}$) A) Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo concentrações crescente de FRD e B) resposta analítica do FC obtida a partir de A.

Como pode ser observado na Figura 21B, o FC apresentou uma resposta constante na faixa de concentração de 20 a $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD. Em concentrações menores de FRD, esse valor apresenta um aumento. Entretanto, na construção de uma curva de calibração, esta faixa de concentração pode ser evitada nas análises. Usou-se a concentração de FRD no FC em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, pois além de apresentar uma tendência linear conforme Figura 21B, apresentou maior quantidade de corrente no ápice de cada pico comparando com as demais concentrações.

4.11 Robustez

Avaliou-se a robustez do sistema proposto verificando as curvas analíticas obtidas em dias diferentes. As equações que descrevem as diferentes curvas de calibração são mostradas na Tabela 3. De acordo com os resultados, o baixo desvio padrão relativo no coeficiente angular das equações descrevem as curvas analíticas indicando que o sistema BIA-AMP proposto é robusto.

Tabela 3: Equações da curva analíticas obtidas em diferentes dias e seus respectivos coeficientes de correlações.

Dias	Equação	r
1	$I/\mu\text{A} = 0,1973 [\text{HCT}] + 1,3969$	0,9956
	$I/\mu\text{A} = 0,0836 [\text{FRD}] + 0,1751$	0,9931
2	$I/\mu\text{A} = 0,1761 [\text{HCT}] + 0,2681$	0,9946
	$I/\mu\text{A} = 0,0882 [\text{FRD}] + 1,1948$	0,9986
3	$I/\mu\text{A} = 0,1995 [\text{HCT}] + 1,0173$	0,9968
	$I/\mu\text{A} = 0,0826 [\text{FRD}] + 1,4895$	0,9967
4	$I/\mu\text{A} = 0,1887 [\text{HCT}] + 0,2783$	0,9974
	$I/\mu\text{A} = 0,0790 [\text{FRD}] + 0,5833$	0,9979

$I/\mu\text{A}$ = Corrente em microAmpere; [HCT] = Concentração da hidroclorotiazida; [FRD] = Concentração da furoseimida; r = Coeficiente correlação.

4.12 Faixa linear e aplicação do método no sistema BIA-AMP na determinação simultânea de FRD e HCT em formulações farmacêuticas.

Avaliou-se a linearidade através da faixa linear, onde usou-se concentração de FRD em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ no FC e mistura de concentrações crescentes dos padrões FRD e HCT. A Figura 22 apresentou os amperogramas obtidos em +1,10 V e +1,30 V nas injeções em triplicata dos padrões, onde a correlação entre concentração e corrente de oxidação detectada é linear ($R \geq 0,99$) conforme mostrou a Tabela 4.

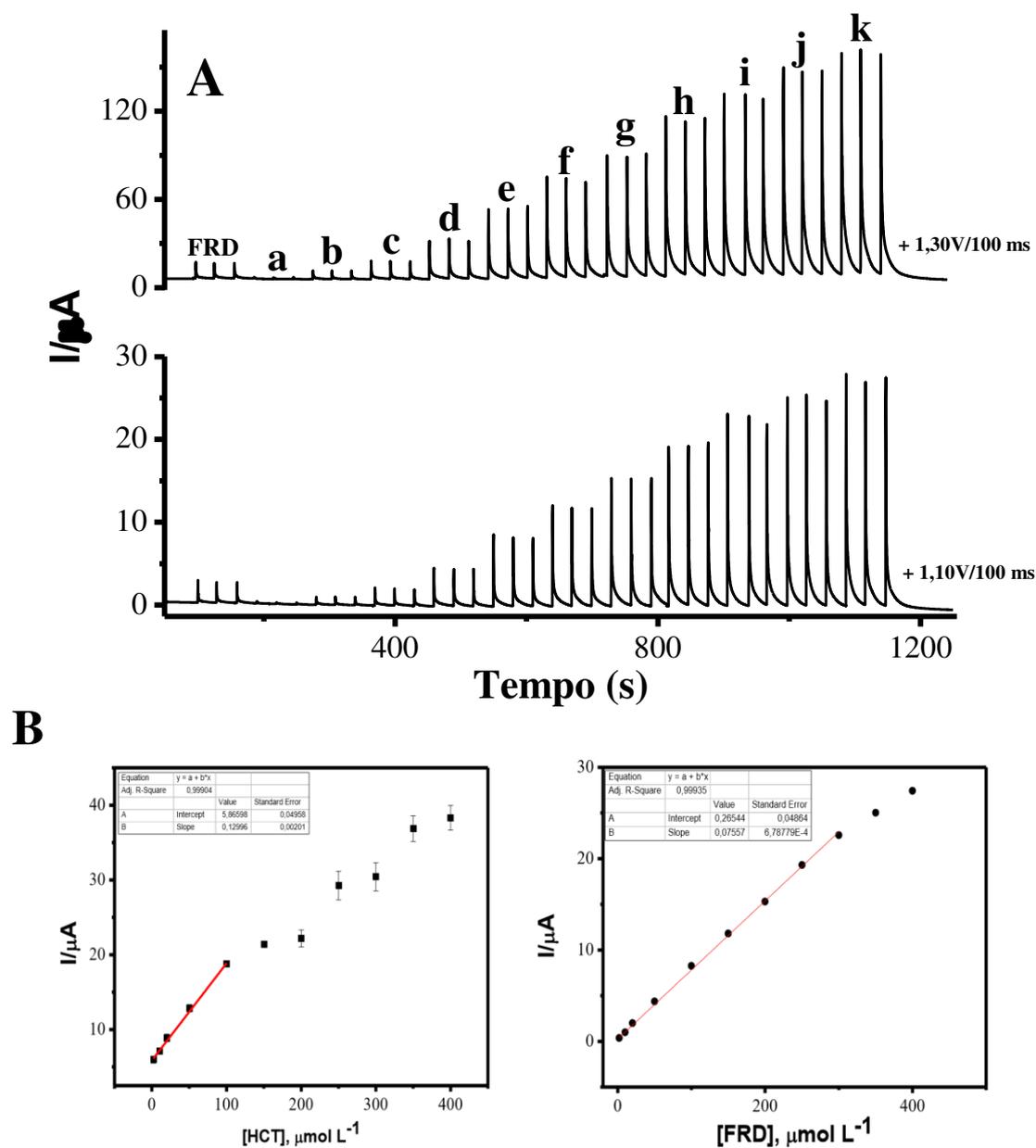


Figura 22: A) Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC), onze soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a-k) de FRD e HCT (a- $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, e- $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, f- $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, g- $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, h- $250 \mu\text{mol L}^{-1}$, i- $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, j- $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ e k- $400 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Faixa linear para FRD e HCT.

As soluções padrões injetadas em ordem de concentração crescente apresentaram linearidades satisfatórias nas faixas de concentrações estudadas, o que confirma que o fenômeno de efeito memória ou contaminação do eletrodo foi prevenido.

As características analíticas para o método BIA-AMP para determinação simultânea de FRD e HCT são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Resposta analítica do método BIA-AMP para a FRD e HCT

Parâmetros	Analitos	
	FRD	HCT
Faixa Linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	2 – 300	2 – 100
Sensibilidade, $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$	0,0756	0,1299
R	0,9993	0,9990
Intercepto, μA	0,2654	5,866
LD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,65	0,89
LQ, $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,98	1,92
Branco (SD)	0,015	0,025

r = Coeficiente de correlação do método; LD = Limite de detecção ($3,3 \cdot \text{SD}/b$); LQ = Limite de quantificação ($10 \cdot \text{SD}/a$); SD = Desvio padrão do branco; Intercepto = Coeficiente Linear.

Como o propósito era obter uma faixa linear de resposta para FRD e HCT, estudos foram realizados para quantificar as concentrações de FRD e HCT em formulações farmacêuticas onde a relação entre corrente/concentração nos picos de oxidação detectada é linear ($R > 0,99$). Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 23.

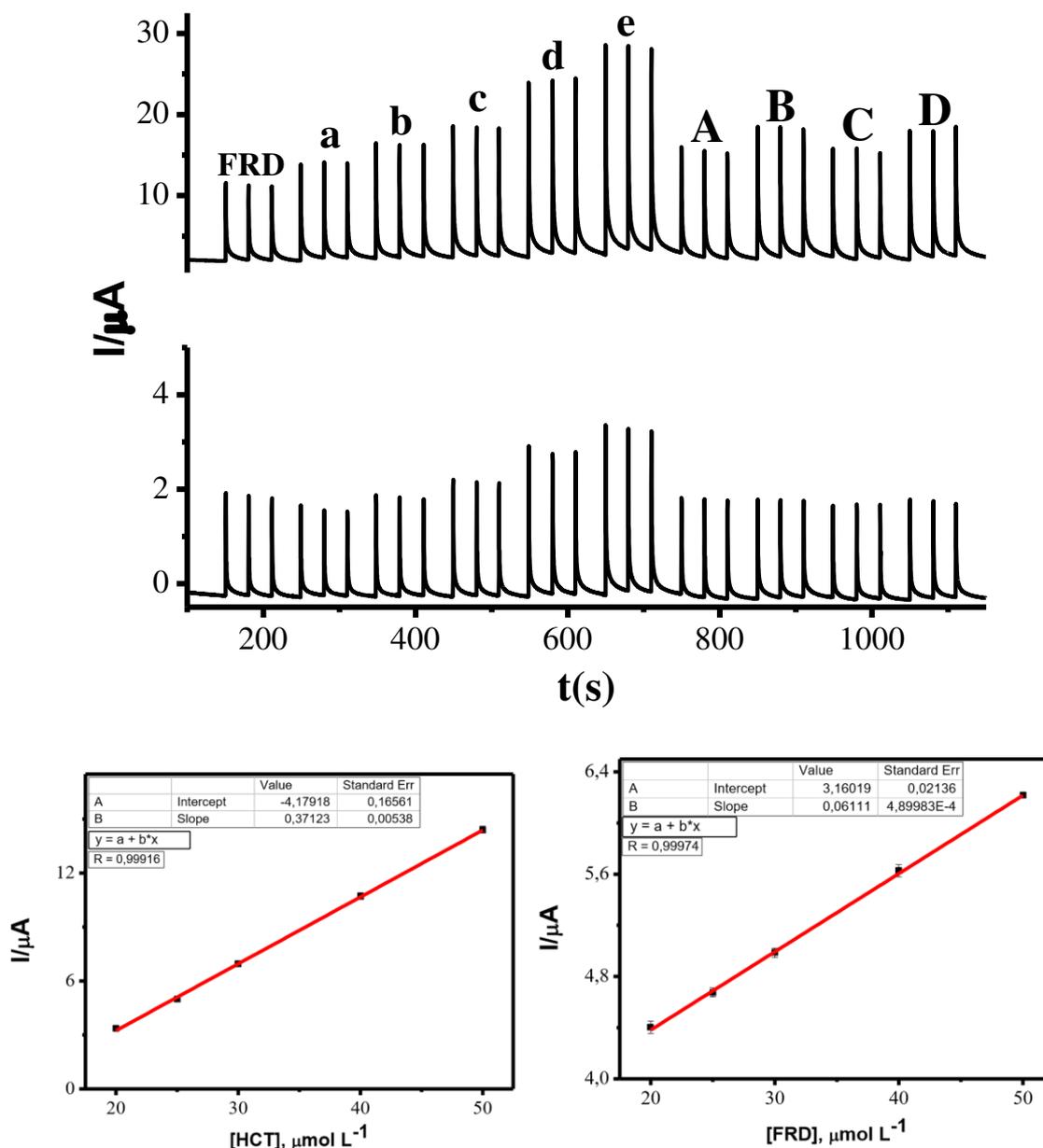


Figura 23: Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC), cinco soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a - e) de FRD e HCT e curva de calibração para FRD e HCT com quatro amostras farmacêuticas (A, B, C e D). Demais condições experimentais conforme Tabela 1.

De acordo com a Figura 23, a curva de calibração obtida apresentou coeficientes de correlação adequados ($r = 0,9992$ e $r = 0,9997$ para HCT e FRD, respectivamente) para as concentrações estudadas de a- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e e- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado, as soluções padrões injetadas em ordem crescente de concentração simultânea de FRD e HCT apresentaram respostas semelhantes, apresentando coeficiente correlação satisfatório tanto par HCT quanto para FRD.

4.13 Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto BIAAMP e o método de referência.

A exatidão do método foi avaliada comparando os resultados obtidos pelo método BIA-AMP com aqueles obtidos pelo método de referência⁶¹, em que as amostras de formulações farmacêuticas também foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nas análises dessas amostras com seus respectivos desvios padrão (n = 3) tanto pelo método proposto como pelo método de referência.

Tabela 5. Comparação dos resultados rotulados e os obtidos na determinação simultânea de FRD e HCT por BIA-AMP e UV-Vis.

Am.	ROTULADO		FRD		HCT	
	FRD	HCT	BIA-AMP	UV-VIS	BIA-AMP	UV-VIS
A	40 mg 25 mg		39,4 ± 1,09	39,5 ± 0,005	24,8 ± 0,65	25,1 ± 0,06
B	40 mg 50 mg		38,9 ± 0,86	40,1 ± 0,001	51,3 ± 0,53	49,1 ± 0,08
C	40 mg 25 mg		39,5 ± 0,74	41,3 ± 0,002	25,2 ± 0,29	24,3 ± 0,03
D	40 mg 50 mg		39,3 ± 0,85	39,2 ± 0,004	50,3 ± 0,41	48,9 ± 0,07

Am. = Amostras; FRD = Furosemda; HCT = Hidroclorotiazida; UV-VIS = Espectrofotometria UV-VIS

De acordo com a Tabela 5, observou-se que os resultados obtidos empregando o método BIA-AMP estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método espectrofotométrica UV-Vis. O teste t de Student para amostras pareadas foi usado para comparar os valores obtidos por espectrofotométrica UV-Vis com os encontrados utilizando o método proposto. Em um nível de confiança de 95%, os resultados em ambos os métodos podem ser considerados semelhantes ($t_{\text{calculado}} 0,611 < t_{\text{crítico}} = 2,780$), ou seja, não apresentam diferença significativa ao nível de 95% de confiança. Além disso, os erros relativos encontrados comparando-se os resultados

obtidos por ambos os métodos com o valor declarado no rótulo dos medicamentos estão dentro do aceitável (< 5%), como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Valores de erro relativo usando o método proposto BIA-AMP e espectrofotometria UV-Vis.

Amostras	E _a , FRD BIA-AMP	E ^a , HCT BIA-AMP	E _b , FRD UV-VIS	E _b , HCT UV-VIS
A	- 1,5	- 0,8	- 0,2	- 1,2
B	-2,8	2,6	- 2,9	4,5
C	- 1,2	0,8	- 4,4	3,7
D	- 1,8	0,6	0,3	2,9

Os erros relativos foram calculados de acordo com a equação seguinte:

$$E^a = \frac{V.BIA - V.ROT}{V.ROT} \times 100 \quad \text{e} \quad E^b = \frac{V.BIA - V.UVV}{V.UVV} \times 100$$

Onde:

E^a: Erro relativo usando o método BIA-AMP com o rotulado;

E^b: Erro relativo usando o método BIA-AMP com UV-Vis;

V. BIA = Valor obtido pelo sistema BIA-AMP;

V. ROT = Valor rotulado (bula);

V. UVV = Valor obtido pelo sistema UV-VIS.

4.14 Estudo de adição e recuperação na determinação de FRD e HCT

A exatidão do método proposto também foi avaliada de outra maneira mediante teste de adição e recuperação. Na Figura 24 são apresentadas as curvas de calibração e os sinais das amostras contendo adições de concentrações de FRD e HCT. Além disso os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 7.

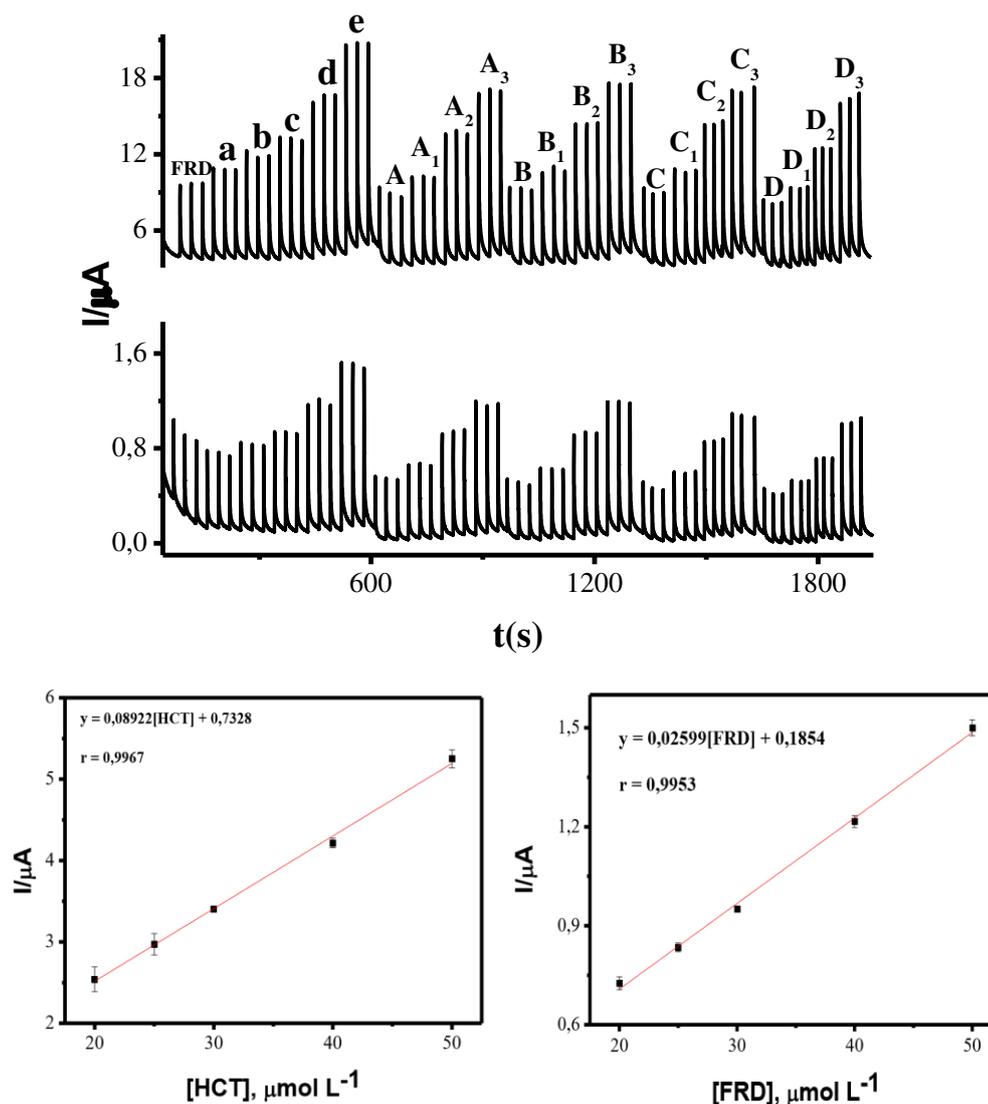


Figura 24: Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC), cinco soluções padrões contendo simultaneamente concentrações crescentes (a - e) de FRD e HCT, quatro amostras farmacêuticas (A, B, C e D) e curva de calibração para FRD e HCT.

De acordo com a Figura 24, a curva de calibração obtida apresentou coeficientes de correlação adequados ($r = 0,9953$ e $r = 0,9967$ para FRD e HCT, respectivamente) para as concentrações estudadas de a- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e e- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como pode ser observado, as soluções padrões injetadas em ordem crescente de concentração simultânea de FRD e HCT apresentaram ótimas respostas, com recuperação em porcentagem variando de 90% a 114%.

Tabela 7: Estudo da adição e recuperação de FRD e HCT em formulações farmacêuticas comerciais.

Amo.	[HCT], $\mu\text{mol L}^{-1}$			%Rec.	[FRD], $\mu\text{mol L}^{-1}$			%Rec.
	[HCT], eq	Recu.	Adic.		[FRD], eq	Recu.	Adic.	
A	23	-	-	-	14	-	-	-
A ₁	28	5	5	100	19	5	5	100
A ₂	40	17	15	113	29	15	15	100
A ₃	46	23	25	92	38	24	25	96
B	35	-	-	-	13	-	-	-
B ₁	40	5	5	100	18	5	5	100
B ₂	50	15	15	100	29	16	15	107
B ₃	58,0	23	25	92	39	26	25	104
C	37	-	-	-	11	-	-	-
C ₁	42	5	5	100	16	5	5	100
C ₂	52	15	15	100	26	15	15	100
C ₃	60	25	25	100	34	23	25	92
D	34	-	-	-	9	-	-	-
D ₁	39	5	5	100	14	5	5	100
D ₂	49	15	15	100	23	14	15	93
D ₃	58	24	25	96	33	24	25	96

Dados: Amo.= Amostras de FRD e HCT; [HCT], eq = Concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT obtido pela equação da reta; Recu. = Concentração recuperado; Adic. = Concentração padrão adicionado de HCT e FRD; [FRD], eq = Concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD obtido pela equação da reta; %Rec. = Porcentagem de recuperação do método BIA-AMP.

Para obter os resultados da porcentagem de recuperação (%Rec.) da tabela 7, foi usado a seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação: } \frac{\text{Recuperado}}{\text{Adicionado}} \times 100$$

4.15 Estudo de interferente

4.15.1 Interferência da FRD na determinação de HCT

Na determinação de HCT tendo FRD como interferente, manteve-se constante a concentração de HCT em todas as soluções padrões e variou-se a concentração de FRD a fim de verificar a interferência em porcentagem de FRD na determinação de HCT conforme mostra a Figura 25.

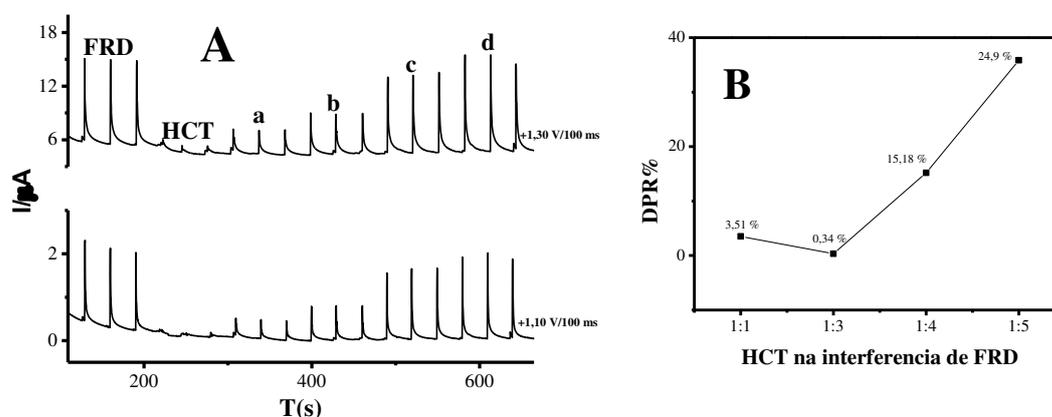


Figura 25: A) Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fator de correção (FC) no estudo do interferente FRD na determinação de HCT ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em uma mistura de HCT (a-d = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + FRD (a- $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e d- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Resposta analítica em porcentagem.

De acordo com as respostas analíticas obtidas na Figura 25B, podemos concluir que a HCT na presença de FRD nas proporções de 1:1 e 1:3, não causaram interferência significativa para a determinação de HCT, pois DPR% encontrou-se abaixo de 5%. Em concentração acima $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FRD (ou seja, na proporção a partir de 1:4) verificou-se um aumento significativo do DPR% demonstrando que nessas condições a FRD apresenta interferência considerável na determinação de HCT, por isso deve-se evitar trabalhar a partir desta proporção.

4.15.2 Interferência da HCT na determinação de FRD

Na determinação de FRD, tendo HCT como interferente, manteve-se constante a concentração de FRD em todos os padrões e variou-se a concentração de HCT a fim de verificar a interferência de HCT na determinação de FRD conforme mostra a Figura 26.

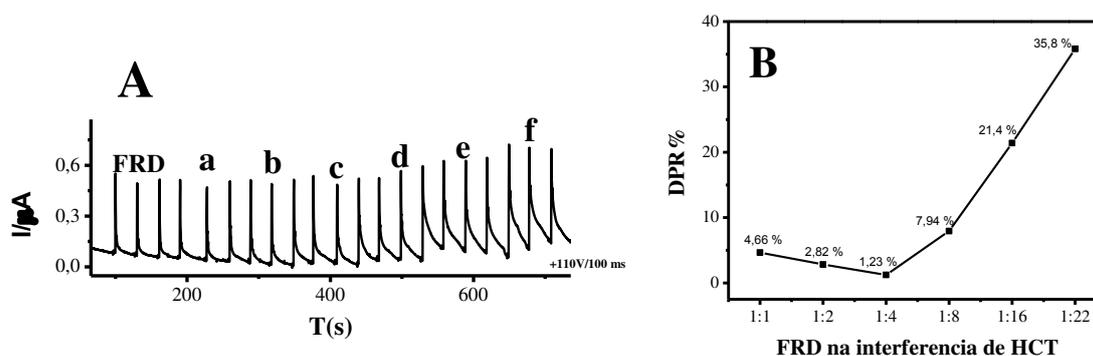


Figura 26: A) Amperograma obtido no sistema BIA-AMP no estudo do interferentes HCT na determinação de FRD ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $E = +1,10 \text{ V}$ em uma mistura de FRD (a-f = $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + HCT (a- $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, b- $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, c- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, e- $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e f- $110 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Resposta analítica em porcentagem.

De acordo com as respostas analíticas obtidas na Figura 26B, podemos concluir que a FRD na presença de HCT nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4 não apresentou interferência significativa de HCT para a determinação de FRD, pois DPR% encontrou-se abaixo de 5%. Em concentrações acima $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT (ou seja, na proporção a partir de 1:8) verificou-se um aumento de porcentagem de interferência do HCT na determinação de FRD, por isso deve-se evitar trabalhar nesta condição.

4.16 Aplicação do método em amostra biológica – Urina sintética

As amostras de urina sintética foram preparadas contendo a maioria dos constituintes de uma amostra real. Para a aplicação do método proposto, realizou-se a determinação em urina sintética, onde adicionou-se $100 \mu\text{L}$ da mesma em cada solução padrão em três diferentes concentrações e a recuperação em porcentagem foi calculada conforme ilustrado na Tabela 8.

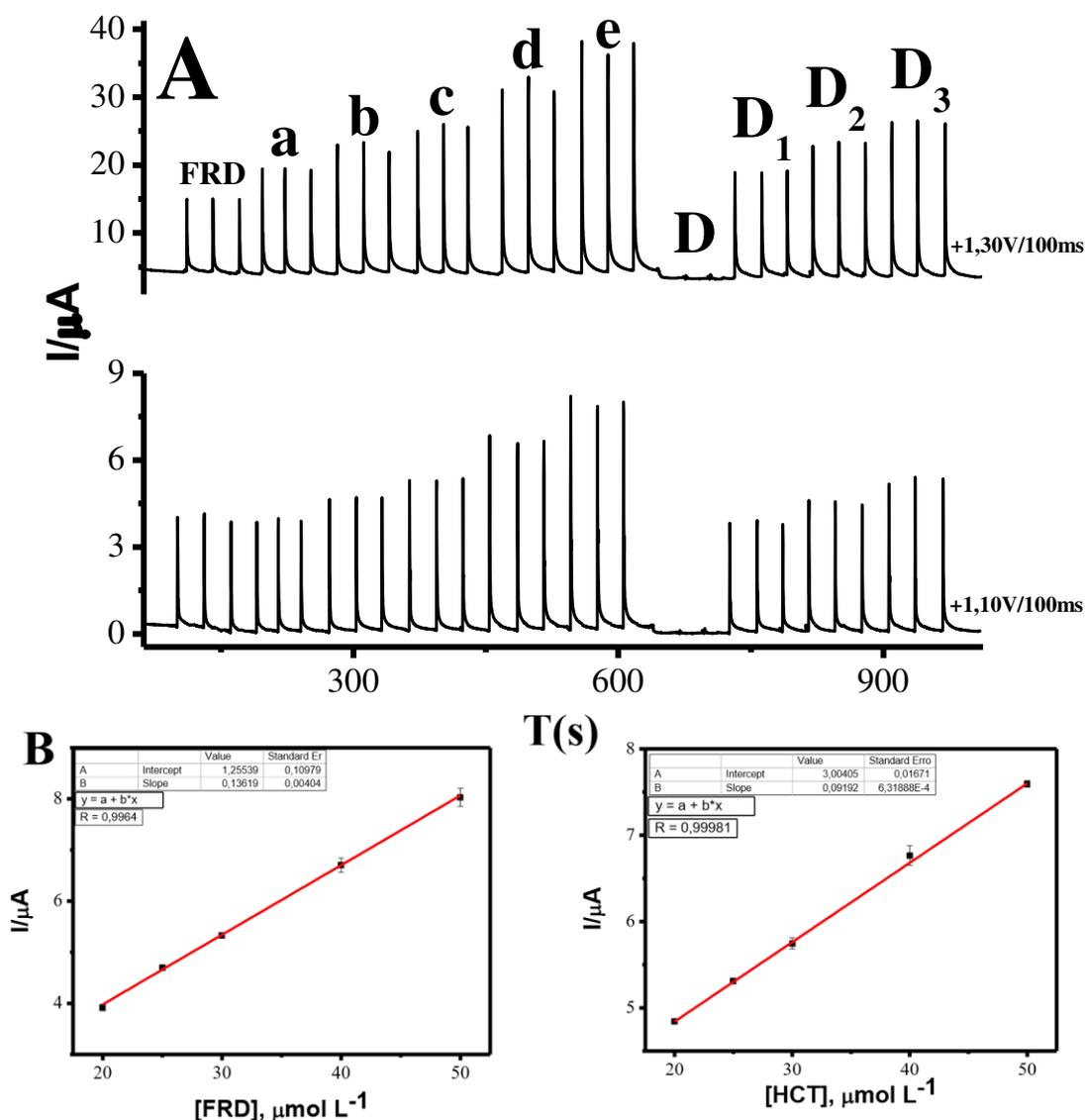


Figura 27: A) Amperogramas obtidos por BIA-AMP após injeções ($n = 3$) de soluções contendo FRD em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ como FC, concentrações crescentes de FRD + HCT (a- $20 \mu\text{mol L}^{-1}$; b- $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; c- $30 \mu\text{mol L}^{-1}$; d- $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e- $50 \mu\text{mol L}^{-1}$), solução contendo $200 \mu\text{L}$ de urina sintética (D) e três concentrações diferentes de mistura contendo urina sintética ($200 \mu\text{L}$) e mistura de FRD e HCT nas concentrações padrões de $D_1 = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $D_2 = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $D_3 = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$. B) Curva de calibração para FRD e HCT.

O método forneceu valores de recuperações que variaram de 105 a 110% para HCT e 96 a 99% para FRD. Sendo assim, a determinação simultânea utilizando eletrodo de BDD é viável, pois se trata de uma análise simultânea sensível, estável, reprodutível e de simples execução sem a interferência dos compostos da matriz da amostra, podendo ser aplicada satisfatoriamente na determinação simultânea de FRD e HCT em amostras de urina sintética.

Tabela 8: porcentagem de recuperação usando urina sintética na determinação de FRD e HCT.

Amo.	[HCT], $\mu\text{mol L}^{-1}$			[FRD], $\mu\text{mol L}^{-1}$		
	Rec.	Adic.	%Rec.	Rec.	Adic.	%Rec.
A + 20	22	20	110	19	20	95
A + 25	26	25	104	24	25	96
A + 30	32	30	107	30	30	100

Dados: Amo.= Amostras de FRD e HCT; %Rec. = Porcentagem de recuperação do método BIAAMP;
Adic. = Concentração padrão adicionado de HCT e FRD;

4.17 Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por BIA-MPA métodos publicados anteriormente

A Tabela 9 apresenta algumas comparações entre as características do método analítico proposto (BIA-AMP) com métodos já publicados para a determinação de FRD e HCT.

Tabela 9: Comparação do método BIA-AMP com outros métodos publicados.

Método	Analito	Faixa Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	r	LD	LQ	F.A.	Ref.
HPLC	FRD	0,60 - 6,05	0,999	0,178	0,589	-	62
VPD	HCT	0,50 – 19	0,999	0,38	-	-	8
FIA	FRD	0,15 – 3,63	0,999	0,045	0,15	-	63
BIA-AMP	HCT	10 – 30	0,997	0,27	-	100	7
BIA-AMP	FRD	36 – 480	0,996	0,94	3,13	72	8
UV	HCT	10 – 200	0,997	0,27	-	-	64
FIA-FRM	FRD	0,1 – 10	0,998	0,01	0,03	60	65
BIA-AMP	HCT	2 – 100	0,999	0,89	1,92	120	Este
	FRD	2 – 300	0,999	0,65	1,98	120	Este

r = Coeficiente correlação; LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação; F.A. = Frequência analítica; Ref. = Referência; HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência; VPD = Voltametria de pulso diferencial; FIA = Análise de injeção em fluxo; UV = Espectrofotometria UV; FIA-FRM = Análise por injeção em fluxo acoplado a fluorimetria.

A comparação entre o método proposto e os métodos descritos anteriormente para determinação simultânea de FRD e HCT foi limitada, pois não foram apresentadas algumas informações, tais como frequência analítica e limite de quantificação em alguns desses trabalhos, contudo, os trabalhos publicados anteriormente, em geral, apresentaram linearidade similar, com limites de detecção similares com os obtidos pelo método proposto.

No entanto, os valores obtidos neste trabalho por BIA-AMP são adequados para análises farmacêuticas, pois se mostraram precisos, sensíveis (baixos limites de detecção) e com elevada frequência analítica. Por fim, o método proposto apresentou várias vantagens sobre os métodos relatados, tais como frequências analíticas elevadas (acima de 100 injeções h^{-1}), manipulação de amostras mínima (apenas dissolução e diluição, não é necessária filtração), não há necessidade o uso de solventes orgânicos e baixa geração de resíduos químicos (pequenos volumes de amostras e reagentes são utilizados).

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi apresentado um método rápido, preciso e com baixos limites de detecção e quantificação para a determinação simultânea de FRD e HCT utilizando-se o sistema BIA-AMP empregando o eletrodo BDD como eletrodo de trabalho. Após a otimização dos parâmetros experimentais sobre o eletrodo de BDD, realizou-se os testes de validação do método BIA-AMP, onde obteve-se ótimos resultados, tais como alta frequência analítica, baixos limites de detecção e quantificação, ótimos coeficientes de correlação ($r > 0,99$), baixo desvio padrão e exatidão satisfatória para ambos os compostos em estudos. Além disso, a exatidão do método proposto foi testada tanto por comparação com o método de referência quanto por testes de adição e recuperação, não havendo a necessidade do uso de pulsos de potenciais de limpeza e condicionamento na superfície do eletrodo de BDD. Os resultados foram considerados concordantes ao compará-los com o método oficial descrito pela farmacopeia brasileira a um nível de confiança de 95%, apresentando exatidão adequada, com erros relativos não maiores que $\pm 5\%$.

Adicionalmente o método proposto apresentou recuperação satisfatória variando de 90 a 114% e sem interferência significativa quando aplicado em amostras farmacêuticas, com exclusão de solventes orgânicos no preparo de FRD e HCT, sendo considerado rápido, simples e de baixo custo. Em amostra biológica (urina sintética), o método BIA-AMP mostrou-se bastante satisfatório, pois apresentou uma recuperação variando de 96 a 109,5%.

O método proposto apresenta inúmeras vantagens em relação a outros métodos disponíveis na literatura, tais como: simplicidade, portabilidade, alta frequência analítica, baixo custo (aquisição e manutenção), uso de pequenas quantidades de reagentes e amostras (geração mínima de resíduos por análise), etapas simples de preparo das amostras (somente dissolução e/ou diluição) e potencialidade para ser empregado em análises fora do laboratório (em campo).

6. REFERÊNCIA

- 1- RANG, H. P. et al. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 904.
- 2- CORBETT, C.E., Farmacodinâmica. 5ed. 1977, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 3- FUCHS, F.D. & WANNMACHER, L., Farmacologia Clínica - fundamentos da Terapêutica Racional. 2 ed. 1999, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 4- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; As bases farmacológicas da terapêutica, 10^a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003.
- 5- BOGUZ, M. J.; HASSAN, H.; AL-ENAZI, E.; IBRAHIM, Z.; AL-TUFAIL, M.; Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, v. 41p. 554-564, 2006.
- 6- BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationary Office, 2009. v.1.
- 7- United States Pharmacopeia: USP 37; National Formulary 32. Rockville: United States Pharmacopeia, 2014. 3000p.
- 8- SALAMANCA-NETO, C. A. R.; EISELE, A. P. P.; RESTA, V. G.; SCREMIN, J.; SARTO, E. R. Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. Sensors and actuators. B, chemical, pag. 630-638, 2016.
- 9- GIMENES, D. T., MARRA, M. C., FREITAS, J. M., MUÑOZ, R. A. A., RICHTER, E. M., Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. Sensors and Actuators B: Chemical, Sensors and Actuators B, 411–418, 2015.
- 10- GHOLIVAND, M B.; TORKASHVAND, M.; MALEKZADEH, G. Fabrication of na electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymers for determination of cyanazine in food samples, Analytical Chemical Acta, v. 713, p. 36-44, 2012.
- 11- PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P.; MARRA, M. C.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; A high-throughput BIA-MPA method for the simultaneous determination of amiloride and furosemide. Analytical Methods, 2016, 8, 7959.

- 12-ISSOPOULOS, P. B. Spectrophotometric determination of microquantities of frusemide using iso and heteropolyanions of molybdenium (VI) as oxidising agents. *Frezenius Z. Anal. Chem.*, Wiesbaden, v. 334, p. 554-557, 1989.
- 13-LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; FILHO, O. F., Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a boron doped diamond electrode undergoing cathodic treatment. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 754, p. 154-159, 2015.
- 14-MANSANO G. R., EISELE, A. P. P. and SARTORI, E. R. Electrochemical evaluation of a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of an antihypertensive ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan in pharmaceuticals. *Analytical Methods*, 2015, v 7, p 1053.
- 15-WANG J, TAHA Z: Batch injection analysis. *Analytical chemistry* 1991, 63(10):1053- 1056.
- 16-PECKOVA K, MUSILOVA J, BAREK J: Boron-doped diamond film electrodes new tool for voltammetric determination of organic substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2009, 39(3):148-172.
- 17-CINKOVA K, SATKOVSKA P, SVORC LU: Determination of folic acid in pharmaceutical preparations by square-wave voltammetry using a boron-doped diamond electrode. *Chemicke Listy* 2015, 109(10):788-793.
- 18-ZHANG T. L. C., MAO B, AN Y: Determination of Cd²⁺ by ultrasound-assisted square wave anodic stripping voltammetry with a boron-doped diamond electrode. *Ionics* 2015, 21(6):1761-1769.
- 19-HONORIO GG, AZEVEDO GC, COSTA MATOS MA, LEAL DE OLIVEIRA MA, MATOS RC: Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry. *Food Control* 2014, 36(1):42-48.
- 20-KONDO T, SAKAI K, WATANABE T, EINAGA Y, YUASA M: Electrochemical detection of lipophilic antioxidants with high sensitivity at boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta* 2013, 95:205-211.
- 21-SVORC L, KALCHER K: Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of

guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode.

Sensors and Actuators B-Chemical 2014, 194:332-342.

- 22-PETRUCCI E, DI PALMA L, LAVECCHIA R, ZUORRO A: Treatment of diazo dye reactive green 19 by anodic oxidation on a boron-doped diamond electrode. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2015, 26:116-121.
- 23-PINO F, IVANDINI TA, NAIKATA K, FUJISHIMA A, MERKOCI A, EINAGA Y: Magnetic enzymatic platform for organophosphate pesticide detection using boron-doped diamond electrodes. *Analytical Sciences* 2015, 31(10):1061-1068.
- 24- TEIXEIRA ME, SEDENHO GC, STRADIOTTO NR: Detection of several carbohydrates using boron-doped diamond electrodes modified with nickel hydroxide nanoparticles. *Analytical Sciences* 2015, 31(8):773-780.
- 25- POFERL DJ, GARDNER NC, ANGUS JC. Growth of Boron-Doped Diamond Seed Crystals by Vapor-Deposition. *Journal of Applied Physics*, v. 44, p. 14281434, 1973.
- 26- MIGLIORINI, F. L. Production and characterization of boron doped diamond electrodes grown on titanium, applied in the degradation of textile dye. Thesis (Master degree). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2011.
- 27- KRAFT, A. Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 2, p. 355-385, 2007.
- 28- SUFFREDINI, H.B. et al. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. *Electrochimica Acta*, v. 49, n. 2223, p. 4021-4026, 2004.
- 29- MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C.
&
FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Talanta*, 97: 291, 2012.
- 30- LOURENCAO, B.C.; BACCARIN, M.; MEDEIROS, R.A.; ROCHAFILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Differential pulse voltammetric determination

- of albendazole in pharmaceutical tablets using a cathodically pretreated borondoped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, 707 : 15, 2013.
- 31- SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, 81 (4-5): 1418, 2010.
- 32-HAGHIGHI, B. et al. Carbon ceramic electrodes modified with laccase from *Trametes hirsuta*: fabrication, characterization and their use for phenolic compounds detection. *Electroanalysis*, v. 19, n. 9, p. 907-917, 2007.
- 33-RAMSING, A., J. RŮŽIČKA, and E. HANSEN, The principles and theory of high-speed titrations by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1981. 129: p. 1-17.
- 34- QUINTINO, M.S.M. and L. ANGNES, Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. *Electroanalysis*, 2004. 16(7): p. 513-523.
- 35- GONG, J., Z. GUAN, AND D. SONG, Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 39(1): p. 320-323.
- 36- BEZERRA DA SILVA, R.A., et al., Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes. *Electroanalysis*, 2011. 23(11): p. 2601-2606.
- 37- PEREIRA, P.F., et al., Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. *Talanta*, 2012. 90(0): p. 99102.
- 38- DA SILVA, R.A.B., et al., Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. *Analytical Methods*, 2011. 3(12): p. 2804-2808.
- 39- PEREIRA, P.F., et al., Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2014. 713(0): p. 32-38.
- 40- HEIDARIMOGHADAM, R.; FARMANY, A. Rapid determination of furosemide in drug and blood plasma of wrestlers by a carboxyl-MWCNT

- sensor. *Materials Science & Engineering, C: Materials for Biological Applications*, v.58, p.1242–1245, 2016
- 41- KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. *Talanta*, v.146, p.181–187, 2016
- 42- FARMACOPEIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Fundação Oswaldo Cruz, 2010. 1448p
- 43-DIAS, I.L.T.; OLIVEIRA NETO, G.; MARTINS, J.L.S. Metodologias analíticas para a determinação da furosemida. *Lecta*, v.22, n.1/2, p.19–26, 2004.
- 44- HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G.; GOODMAN E GILMAN: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 10^a ed., 2003, p. 1647.
- 45- NIEMEYER, C.; HASENFUSS, G.; WAIS, U.; KNAUF, H.; SCHAFERKORTING, M. & MUTSCHLER, E. "Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in relation to renal-function". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 24 (5): 661, 1983.
- 46- LIU, S-Y.; WOO, S-O.; KOW, H-L.; HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, v. 24p. 938-992, 2001.
- 47- JORNAL BRASILEIRO DE NEFROLOGIA - VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. 2010.
- 48- STAS, S.; APPEESH, L. & SOWERS, J. "Metabolic safety of antihypertensive drugs: Myth versus reality". *Curr. Hypertens. Rep.*, 8 (5): 403, 2006.
- 49- FARMACOPEIA INTERNACIONAL. 3 ed. ed. Vol. 2. 1983, Genebra: Organización Internacional da Salud.
- 50- KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A.A. & ENSAFI, H.R. "Ferrocenedicarboxylic Acid Modified Carbon Paste Electrode: A Sensor for Electrocatalytic Determination of Hydrochlorothiazide". *J. Braz. Chem. Soc.*, 20 (5): 880, 2009. 85.
- 51- RAZAK, O.A. "Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (2): 433, 2004.

- 52-REZAEI, B. & DAMIRI, S. "Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode as a Sensor for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide". *IEEE Sens. J.*, 8 (9-10): 1523, 2008.
- 53-DOS SANTOS, W. T. P. et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.
- 54-THANGARAJ, R. et al. A flow injection analysis coupled dual electrochemical detector for selective and simultaneous detection of guanine and adenine. *Electrochimica Acta*, v. 123, p. 485-493, 2014.
- 55-BRITTON, H. T. S. and R. A. ROBINSON, CXCVIII – Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1931: p. 1456-1462.
- 56-RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS C. H.; JARDIM I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química nova*, v. 27, n 5, p. 771-780, 2004.
- 57-ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 22 de maio de 2003.
- 58-INMETRO: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE-008. Edição 04 - Julho/2011.
- 59-NIJHUIS, A.; KNAAP, H. C. M. Van der; JONG, S. de; VANDEGINSTE, B. G. M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 187-202, 1999.
- 60-VAN DER HEYDEN, Y.; JIMIDAR, M.; HUND, E.; NIEMEIJER, N.; PEETERS, R.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; HOOGMARTENS, J. Determination of system suitability limits with a robustness test. *J. Chromatogr. A.*, v. 845, p. 145-154, 1999.
- 61-Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Vol. 2. pag. 989-992 e 1035-1037, 2010.
- 62-IBRAHIM A. NAGUIB; EGLAL A. ABDELALHEEM; AML A. EMAM; NOURUDDIN W. ALI; FATMA F. ABDALLAH. Development and validation of HPTLC and green HPLC methods for determination of furosemide, spironolactone and canrenone, in pure forms, tablets and spiked human plasma. *Biomedical Chromatography*, 2018.

- 63- E. J. LLORENT-MARTÍNEZ . P. ORTEGA-BARRALES. A. Molina-Día. Multicommutated flow-through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene. Pag. 797-803, 2005.
- 64- I. PANDER, M.; Parissipoulou, Determination of captopril and hydrochlorothiazide combination in tables by derivate UV spectrophotometry. Int. J. Pharm. 86, pag. 99-106, 1992.
- 65- SEMAAN, F. S.; NOGUEIRA, P. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; Flow-Based Fluorimetric Determination of Furosemide in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples: Use of Micelar Media to Improve Sensitivity, Pharmaceutical Analysis, pag. 66-79, 2008.
- 66- Laube, N.; Mohr, B.; Hesse, A.; J. Cryst. Growth 2001, 233, 367.
- 67- Larisa P. Caetano; Ana P. Lima; Thiago F. Tormin; Eduardo M. Richter; Foued S. Espindola; Françoise V. Botelho; Rodrigo A. A. Munoz. Electrode printed on carbon nanotube screen modified for the simultaneous determination of nitrite and uric acid in biological fluids using amperometric detection by batch injection. Electroanalysis, vol. 30, ed. 8, 2018.
- 68- Douglas A. Skoog; Donald M. West; F. James Holler; Stanley R. Crouch. Fundamentos de química analítica. Ed. 8, v 1, 2012.