



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas**  
**Gerais**

**“Determinação eletroanalítica de Losartana<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Alisquireno<sup>®</sup> em fluidos biológicos e em formulações comerciais.”**

ALESSANDRA CRISTINA CINTRA

Dissertação de Mestrado

Prof.Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior

Orientador

Uberaba – MG

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas**  
**Gerais**

**“Determinação eletroanalítica de Losartana<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Alisquireno<sup>®</sup> em fluidos biológicos e em formulações comerciais.”**

*Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Química, sob orientação do Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior.*

**Mestranda:** Alessandra Cristina Cintra.

**Orientador:** Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior.

**Área de Concentração:** Eletroanalítica.

**Uberaba – MG**

**2016**

**Alessandra Cristina Cintra**

***“Determinação eletroanalítica de Losartana<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Alisquireno<sup>®</sup> em fluidos biológicos e em formulações comerciais.”***

*Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Química, sob orientação do Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior.*

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

***Prof. Dr. Robson Tadeu Soares de Oliveira Júnior***  
(Orientador – PPGMQ-MG / UFTM)

---

***Prof. Dr. Luís Antônio da Silva***  
(ICENE / UFTM)

---

***Prof. Dr. Sérgio Marcos Sanches***  
(IFTM / Ituiutaba - MG)

*A presente dissertação é dedicada primeiramente á Deus e á meu doce Jesus, sem os quais não teria conseguido. A dedico também à minha mãe Inês, minha avó Marlene, meu filho Juan, minha filha Serena, que está para nascer e ao meu grande amor, Tarcísio. Também não posso deixar de dedicar a presente, ao meu orientador Robson, por tanta paciência e esforço para comigo. Para mim, tais pessoas são exemplos de força e determinação. Logo, merecem todo o mérito de meu sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, ao meu doce Jesus e sua Santíssima Mãe, Maria. Estes sempre guiaram meus caminhos, e nos momentos mais difíceis, me carregaram em seus braços. Além disso, Deus é o Senhor da Química, uma vez que cada átomo, cada molécula, cada reação, acontece de forma divina.

Devo minha vida à minha mãe Maria Inês, que nunca desistiu de mim e sempre foi meu porto seguro. Mãe, obrigada pela sua paciência em ouvir meus lamentos e cuidar tão de perto de meus problemas, como se fossem seus.

Á minha avó Marlene, que é um exemplo vivo de garra e determinação. Sempre nos auxiliando em todos os sentidos. Vovó, sem você, nada teria sido possível.

Meu filho amado Juan Pablo, que é um exemplo de compreensão e doçura. Ele entendeu cada falta minha, cada fim de semana que não pude brincar com ele, por estar trabalhando. Obrigada meu filho, você é meu tudo!

Mesmo estando ainda em meu ventre, cada chutinho seu, minha amada filha Serena, me deixa cheia de alegria. Obrigada por ter vindo no momento em que mais necessitei, você também é meu tudo!

Tarcísio, apesar de tantos momentos difíceis, tantas desavenças, tantos desencontros, te agradeço imensamente por fazer parte de minha vida. Jamais amei alguém como o amo. Sem seu auxílio, em ouvir tantas vezes meus relatos e ocorridos nos laboratórios, eu não teria tido força para prosseguir. Obrigada por também me amar tanto.

Agradeço aos meus tios maternos, minha irmã Raquel, meu cunhado Fabiano e sobrinho Guilherme; pelas palavras de força e incentivo, a mim transmitidas.

Ao meu orientador, Robson, devo todo esse trabalho. Muito obrigada pela paciência e dedicação comigo. Muitas vezes fraquejei e quase desisti, mas mesmo ficando nervoso comigo, jamais desistiu de mim.

Agradeço á toda equipe de trabalho do ICBN / UFTM, que se tornaram amigos especiais. A alguns amigos que sempre estiveram presente me ajudando, agradeço pela dedicação. Um muito obrigada especial à minha amiga e companheira de laboratório, Bruna Ceraso.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), agradeço pelo espaço cedido para as pesquisas.

Aos membros da Comissão Examinadora, agradeço pela aceitação em participar da defesa desta dissertação.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização de mais uma etapa tão importante em minha vida.

*“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.”*

*Mahatma Gandhi*

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

*Chico Xavier*

*“... direi do Senhor: Ele é meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei...”*

*Salmo 91:2*

## RESUMO

Pressão arterial (PA) alterada, é um importante fator de risco para complicações cardiovasculares e renais. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem sido o alvo no centro da fase para todas as complicações cardiovasculares e cardio-renais. Neste sentido, Losartana<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Alisquireno<sup>®</sup> são medicamentos da classe dos antagonistas dos receptores da angiotensina (ARAs). Deste modo, a presente dissertação visa apresentar métodos de análises fundados em técnicas eletroquímicas por voltametria de onda quadrada (SWV), no intuito de facilitar e viabilizar financeiramente as análises dos fármacos em questão. Os sinais eletroquímicos foram obtidos, através da oxidação eletroquímica dos fármacos, em eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). As análises foram feitas em meio eletrolítico de tampão de Britton-Robinson (BR) em diferentes pH's, onde fixou-se os melhores parâmetros de análise (frequência, amplitude e incremento de varredura). Uma vez otimizados os parâmetros de onda quadrada, foi definida a região linear entre corrente de pico ( $I_p$ ) vs. concentração. A oxidação dos fármacos revelam picos de oxidação bem definidos e irreversíveis. Para o Alisquireno<sup>®</sup>, a curva analítica é obtida no intervalo de concentração de  $1,81 \times 10^{-5}$  a  $1,63 \times 10^{-4}$  mol/L ( $r = 0,997$ ), com limites de detecção e quantificação de  $2,5 \times 10^{-8}$  e  $8,4 \times 10^{-8}$  mol/L, respectivamente. Os valores de recuperação alcançam de 98,2% a 100,2%. Para a Losartana<sup>®</sup>, a curva analítica é obtida no intervalo de concentração de  $9,38 \times 10^{-6}$  a  $8,75 \times 10^{-5}$  mol/L ( $r = 0,997$ ), com limites de detecção e quantificação de  $2,64 \times 10^{-8}$  e  $8,82 \times 10^{-8}$  mol/L, respectivamente. Os valores de recuperação alcançam de 96,2% a 113,5%. E finalmente, para o Captopril<sup>®</sup>, a curva analítica é obtida no intervalo de concentração de  $2,70 \times 10^{-5}$  a  $2,30 \times 10^{-4}$  mol/L ( $r = 0,995$ ), com limites de detecção e quantificação de  $6,67 \times 10^{-8}$  e  $2,22 \times 10^{-7}$  mol/L, respectivamente. Os valores de recuperação alcançam de 99,7% a 101,0%. Os resultados de recuperação obtidos indicam que não há efeitos de interferência da matriz dos fármacos sobre a determinação analítica dos mesmos. Na análise de Alisquireno<sup>®</sup> e Captopril<sup>®</sup> em plasma humano os interferentes comuns do soro não alteraram insignificamente as análises, rendendo boas médias de recuperação de 95,5% a 97,8%, para Alisquireno<sup>®</sup> e de 100,6%, para Captopril<sup>®</sup>. Também pode-se afirmar que o eletrodo de DDB exibiu uma resposta estável, sendo este considerado seletivo e sensível para os fármacos estudados.

*Palavras-chave: Eletroquímica, Losartana<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup>, Alisquireno<sup>®</sup>, SWV, DDB.*

## ABSTRACT

Blood pressure (BP) change is an important risk factor for cardiovascular and renal complications. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) has been the target in the center of phase for all the cardiovascular and cardio-renal complications. In this sense, Losartan<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> and Aliskiren<sup>®</sup> are drugs in the class of angiotensin receptor (ARBs). Thus, this thesis aims to present methods of analysis grounded in electrochemical techniques by square wave voltammetry (SWV) in order to facilitate and financially viable analysis of the drugs in question. The electrochemical signals were obtained by electrochemical oxidation of drugs in diamond electrode doped with boron (BDD). Analyses were made of electrolytic means of Britton-Robinson buffer (BR) in different pH's where we fixed the best analysis parameters (frequency, amplitude and scan increment). Since the square wave optimized parameters, the linear region was defined between peak current ( $I_p$ ) vs. concentration. Oxidation of drugs show well defined and irreversible oxidation peaks. For Aliskiren<sup>®</sup>, the calibration curve is obtained in the concentration range of  $1.81 \times 10^{-5}$  to  $1.63 \times 10^{-4}$  mol/L ( $r = 0.997$ ), with limits of detection and quantification of  $2.5 \times 10^{-8}$  and  $8.4 \times 10^{-8}$  mol/L, respectively. The recovery values reaching 98.2% to 100.2%. For Losartan<sup>®</sup>, the calibration curve is obtained in the concentration range of  $9.38 \times 10^{-6}$  to  $8.75 \times 10^{-5}$  mol/L ( $r = 0.997$ ), with limits of detection and quantification of  $2.64 \times 10^{-8}$  and  $8.82 \times 10^{-8}$  mol/L, respectively. The recovery values reaching 96.2 % to 113.5 %. And finally for Captopril<sup>®</sup>, the calibration curve is obtained in the concentration range of  $2.70 \times 10^{-5}$  to  $2.30 \times 10^{-4}$  mol/L ( $r = 0.995$ ), with limits of detection and quantification of  $6.67 \times 10^{-8}$  and  $2.22 \times 10^{-7}$  mol/L, respectively. The recovery values reaching 99.7 % to 101.0 %. These results indicate that there is no interference effects of the array of drugs on the analytical determination of the same. In Aliskiren<sup>®</sup> analysis and Captopril<sup>®</sup> interferents in human plasma serum is common insignificantly altered the analysis, yielding good average recovery of 95.5 % to 97.8 % for Aliskiren<sup>®</sup> and 100.6 % for Captopril<sup>®</sup>. It can also say that the BDD electrode showed a stable response, which is considered selective and sensitive to the drugs studied.

*Keywords: Electrochemistry , Losartan<sup>®</sup> , Captopril<sup>®</sup> , Aliskiren<sup>®</sup> , SWV , DDB.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema do processo de conversão da angiotensina em seu sítio ativo, em outras espécies de angiotensina I, II e III (altamente agravantes da PA), através das enzimas conversoras correspondentes em cada etapa do processo.....22
- Figura 2 Estrutura química da molécula de Alisquireno<sup>®</sup>, fármaco inibidor direto da renina, no tratamento da HAS.....25
- Figura 3 Estrutura química da molécula de Captopril<sup>®</sup>, fármaco inibidor da enzima de conversão da angiotensina.....29
- Figura 4 Estrutura química da molécula de Losartana<sup>®</sup>, fármaco alternativo em pacientes que não se adequam mais a inibidores da ECA. A Losartana<sup>®</sup> é um antagonista do receptor (tipo AT<sub>1</sub>) da angiotensina II.....32
- Figura 5 Representação esquemática de uma onda quadrada (a) função monotônica de período  $\tau$  com incremento de varredura  $E_s$ , (b) função periódica de amplitude  $E_{sw}$ , (c) função resultante da sobreposição de (a) e (b).....39
- Figura 6 Representação esquemática de um voltamograma de onda quadrada, em que  $n$  representa a corrente resultante,  $f$  a direta e  $r$  a reversa.....40
- Figura 7 Processos ocorridos na voltametria de onda quadrada, segundo Ramaley e Krause. Numerados: 1) potencial em forma de onda; 2) escada de potencial; 3) aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total.....41
- Figura 8 Célula eletroquímica utilizada nos experimentos eletroquímicos para a determinação dos fármacos. Indicados têm-se: 1 – Eletrodo de trabalho (DDB), 2 – Contra-eletrodo (placa de Pt), 3 – Eletrodo de referência (Ag /AgCl) e 4- Entrada e saída de gás e adição de soluções padrões dos analitos.....49
- Figura 9 Eletrodo de diamante dopado com boro (8.000 ppm) utilizado para a determinação eletroquímica de Alisquireno<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Losartana<sup>®</sup>, em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas.....50
- Figura 10 Efeito do tipo de pré-tratamento realizado, na janela eletroquímica de potencial apresentada por eletrodos de DDB com 8000 ppm de boro em uma solução aquosa 0,5 M de HClO<sub>4</sub> registradas a  $\nu = 100$  Mv/s. As voltametrias cíclicas foram realizadas sobre um eletrodo como recebido, e sobre amostras depois de 30 min de pré-tratamentos: anódico (3,0 V), catódico (-3,0V) e térmico (400 °C).....54

- Figura 11 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica do Captopril<sup>®</sup> (18,2 mg L<sup>-1</sup>) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada vermelha).....57
- Figura 12 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de Alisquireno<sup>®</sup> (4,5 mg L<sup>-1</sup>) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada).....59
- Figura 13 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica para a Losartana<sup>®</sup> (45,5 mg L<sup>-1</sup>) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 10,00) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada).....61
- Figura 14 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de Captopril<sup>®</sup> sobre um eletrodo de DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) contendo de Captopril<sup>®</sup> (18,2 mgL<sup>-1</sup>) em diferentes velocidades de varredura: 100, 200, 300, 400 e 500 mV s<sup>-1</sup>. Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.....62
- Figura 15 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de Alisquireno<sup>®</sup> sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) contendo 4,5 mg L<sup>-1</sup> de Alisquireno<sup>®</sup> em diferentes velocidades de varredura : 50 , 100 , 150 , 200 e 250 mV s<sup>-1</sup>. Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.....63
- Figura 16 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica da Losartana<sup>®</sup> sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 10,01) contendo 45,5 mg L<sup>-1</sup> de Losartana<sup>®</sup> em diferentes velocidades de varredura : 100, 200, 300, 400 e 500 mV s<sup>-1</sup>. Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.....64
- Figura 17 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de Captopril<sup>®</sup> a 18,2 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 8,0. Frequência ótima – 10,0 Hz.....68
- Figura 18 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de Alisquireno<sup>®</sup> a 4,5 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 8,0. Frequência ótima – 100,0 Hz.....70
- Figura 19 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de Losartana<sup>®</sup> a 45,5 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 10,0. Frequência ótima – 100,0 Hz.....72
- Figura 20 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com amplitude fixada em 10,0 Hz em solução de Captopril<sup>®</sup> a 18,2 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 8,0. Amplitude ótima – 50 mV.....74

- Figura 21 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com frequência fixada em 100,0 Hz em solução de Alisquireno<sup>®</sup> a 4,5 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 8,0. Amplitude ótima – 50 mV.....76
- Figura 22 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com frequência fixada em 100,0 Hz em solução de Losartana<sup>®</sup> a 45,5 mg L<sup>-1</sup> e tampão BR pH 10,0. Amplitude ótima – 50,0 mV.....77
- Figura 23 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de Captopril<sup>®</sup> em tampão BR, pH 8,0. Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de captopril. F = 10,0 Hz; amplitude = 50 mV , Es = 5 mV.....81
- Figura 24 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de Alisquireno<sup>®</sup> em tampão BR, pH 8,0. Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de Alisquireno<sup>®</sup>. F = 100,0 Hz; amplitude = 50 mV , Es = 5 mV.....83
- Figura 25 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de Losartana<sup>®</sup> em tampão BR, pH 10,0. Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de Losartana<sup>®</sup>. F = 100,0 Hz; amplitude = 50 mV , Es = 5 mV.....85
- Figura 26 Estudos de recuperação e determinação analítica de Captopril<sup>®</sup> em tampão BR de 0,04 M, pH 8,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de Captopril<sup>®</sup> de 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,1; (C) 0,2; (d) 0,3; (e) 0,4; (f) 0,5; (g) 0,6; (h) 0,7; (i) 0,8; (j) 0,9 e (k) 1,0 mL.....91
- Figura 27 Estudos de recuperação e determinação analítica de Alisquireno<sup>®</sup> em tampão BR de 0,04 M, pH 8,0 sobre o eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração do Alisquireno<sup>®</sup> de 50 mg L<sup>-1</sup>. Solução padrão de adição: (a) amostra, (b) 9,91, (C) 19,61, (d) 29,13, (e), 38,46 e (f) 47,62 mL.....93
- Figura 28 Estudos de recuperação e determinação analítica de Losartana<sup>®</sup> em tampão BR de 0,04 M, pH 10,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de Losartana<sup>®</sup> de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,1; (C) 0,2; (d) 0,3; (e) 0,4 e (f) 0,5 mg L<sup>-1</sup> .....95
- Figura 29 Estudos de recuperação e determinação analítica de Captopril<sup>®</sup> em plasma humano, com tampão BR de 0,04 M, pH 2,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de Captopril<sup>®</sup> de 32,14 mg L<sup>-1</sup>. Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,6; (C) 1,2; (d) 1,8; (e) 2,4; (f) 3,0; (g) 3,6; (h) 4,2; (i) 4,8; (j) 5,4 e (k) 6,0 mL.....101

Figura 30 Estudos de recuperação e determinação analítica do Alisquireno<sup>®</sup> em tampão 0,04 M BR, pH 8,0; em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A (soro humano). Concentração da solução padrão de Alisquireno<sup>®</sup> adicionados: (a) amostra (9,0 mg L<sup>-1</sup>). (B) 27,7; (C) 50,0; (D) 69,23; (E) de 87,7 e (f) 100 mg L<sup>-1</sup>.....103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da pressão arterial em adultos maiores de 18 anos, de acordo com o Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.....	24
Tabela 2	Varição dos pH's de estudo em Captopril® 18,2 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	56
Tabela 3	Varição dos pH's de estudo em Alisquireno® 4,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	58
Tabela 4	Varição dos pH's de estudo em Losartana® 45,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	60
Tabela 5	Varição da frequência de pulsos, de estudo em Captopril® 18,2 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	67
Tabela 6	Varição da frequência de pulsos, de estudo em Alisquireno® 4,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	69
Tabela 7	Varição da frequência de pulsos, de estudo em Losartana® 45,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	71
Tabela 8	Varição da amplitude de pulsos, de estudo em Captopril® 18,2 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	74
Tabela 9	Varição da amplitude de pulsos, de estudo em Alisquireno® 4,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	75
Tabela 10	Varição da amplitude de pulsos, de estudo em Losartana® 45,5 mg/L, segundo sua respectiva corrente de pico.....	77
Tabela 11	Parâmetros de onda quadrada e valores de pH ótimos para determinação de Captopril®, Alisquireno® e Losartana®, em meio de tampão BR.....	78
Tabela 12	Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para Captopril® 5,9 mg/L em tampão BR pH 8,0.....	82
Tabela 13	Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para Alisquireno® 0,550 mg/L em tampão BR pH 8,0.....	84
Tabela 14	Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para Losartana® 3,97 mg/L em tampão BR pH 10,0.....	86
Tabela 15	Recuperação do analito em função da concentração.....	89

Tabela 16 Resultados de cinco recuperações para Captopril® 4,0 mg/L, em eletrólito de tampão BR pH 8,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.....	91
Tabela 17 Recuperações de amostras de Captopril® em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições: $f = 10,0$ Hz; $E_{sw} = 50$ mV; $E_S = 5$ mV ( $n = 5$ ); intervalo de confiança de 95% = $4,018 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,140$ .....	92
Tabela 18 Resultados de cinco recuperações para Alisquireno® 50 mg/L, em eletrólito de tampão BR pH 8,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.....	93
Tabela 19 Recuperações de amostras de Alisquireno® (Rasilez®) em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições: $f = 100,0$ Hz; $E_{sw} = 50$ mV; $E_S = 5$ mV ( $n = 3$ ).....	94
Tabela 20 Resultados de cinco recuperações para Losartana® 10,0 mg/L, em eletrólito de tampão BR pH 10,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.....	95
Tabela 21 Recuperações de amostras de Losartana® em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições: $f = 100,0$ Hz; $E_{sw} = 50$ mV; $E_S = 5$ mV ( $n = 5$ ), intervalo de confiança de 95% = $10,36 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,105$ .....	96
Tabela 22 Resultados de cinco recuperações em plasma para Captopril® 32,14 mg/L, em eletrólito de tampão BR pH 2,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.....	100
Tabela 23 Recuperações de amostras de Captopril® em plasma humano, que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições: $f = 10,0$ Hz; $E_{sw} = 50$ mV; $E_S = 5$ mV ( $n = 5$ ); intervalo de confiança de 95% = $32,34 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,04$ .....	101
Tabela 24 Resultados de três recuperações para Alisquireno® 9,0 m/L, em eletrólito de tampão BR pH 8,0 e plasma humano, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.....	102
Tabela 25 Recuperações de amostras de Alisquireno® em plasma humano que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições: $f = 100,0$ Hz; $E_{sw} = 50$ mV; $E_S = 5$ mV ( $n = 5$ ).....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária.

AOAC – *Association of official analytical chemists*.

ARA's – Antagonistas dos receptores da angiotensina.

BR – Britton-Robinson.

CLAE – Cromatografia líquida de alta-eficiência.

CVD – Deposição química por vapor, do inglês *chemical vapor deposition*.

DCV – Doenças cardiovasculares.

DDB – Diamante dopado com boro.

DM – Dinâmica molecular.

DOU – Diário oficial da união.

E – Potencial.

$E_f$  – Potencial final.

$E_i$  – Potencial de início.

$E_{inv.}$  – Potencial de inversão.

$E_p$  – Potencial de pico.

$E_s$  – Incremento de varredura.

$E_{sw}$  – Amplitude do pulso de onda quadrada.

$F$  – Frequência do pulso de onda quadrada.

HAS – Hipertensão arterial sistêmica.

I – Corrente.

IECA – Inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

$I_p$  – Corrente de pico.

LD – Limite de detecção.

LQ – Limite de quantificação.

PA – Pressão arterial.

pH – Potencial hidrogeniônico.

RDO – Reação de desprendimento de oxigênio.

RMN – Ressonância magnética nuclear.

SRAA – Sistema renina angiotensina-aldosterona.

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês *square wave voltammetry*.

t – Tempo.

$\tau$  - Período.

UV-Vis – Ultra violeta-visível.

$v$  – Velocidade de varredura.

VC – Voltametria cíclica.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>19</b>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>44</b>
OBJETIVOS.....	44
2 OBJETIVOS .....	45
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>46</b>
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	46
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	47
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>51</b>
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	52
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>103</b>
CONCLUSÕES.....	103
5 CONCLUSÕES .....	104
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>107</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
<b>ANEXOS .....</b>	<b>116</b>

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 INTRODUÇÃO

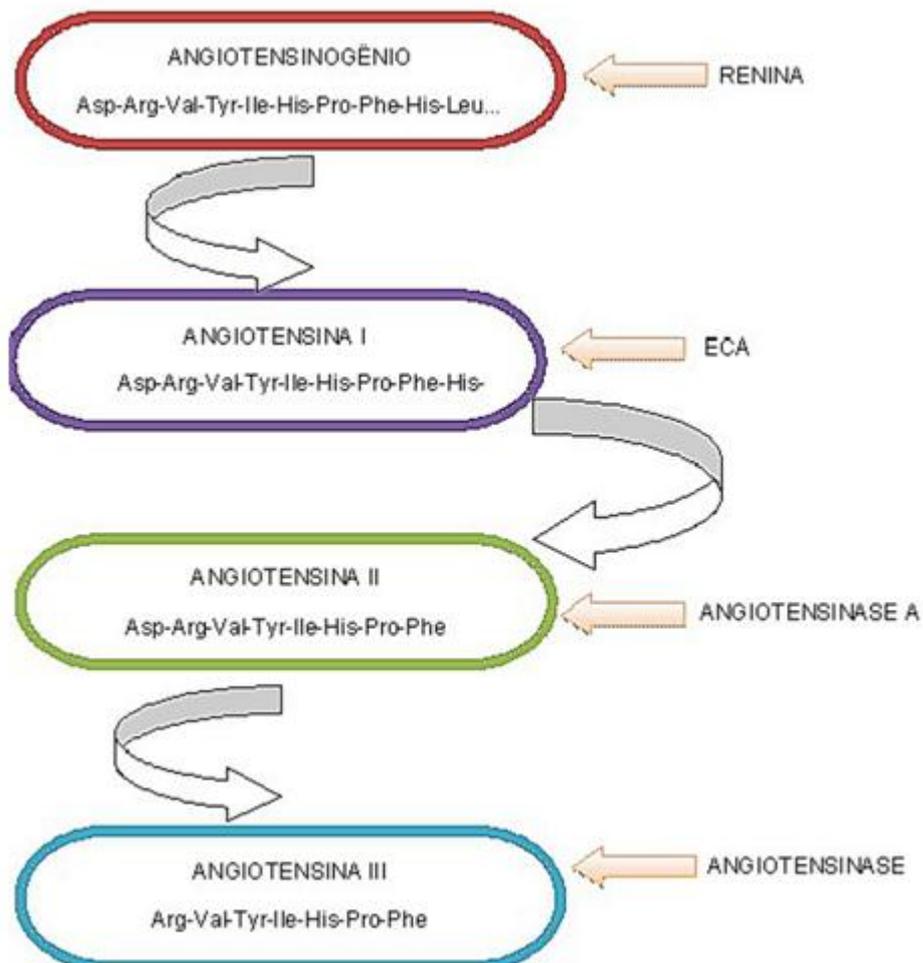
Até cerca de uma década atrás a medicina acreditava que as doenças cardiovasculares tinham como principal fator, a genética familiar. Logo, tornava-se inviável a realização de prevenção ou tratamentos aos acometidos por tais problemas. Todavia, com o avanço da ciência, observou-se que alguns comportamentos e dietas adotadas por um paciente, diminuía em bons índices os riscos de doenças cardiovasculares, mesmo em pessoas que possuíam genes predispostos ao desenvolvimento de tais problemas (Golan *et al.* 2009).

Assim sendo, indivíduos que apresentam disfunções no sistema cardiovascular devem, além de manter contato periódico com médico especializado, fazer uso de fármacos apropriados bem como acompanhamento nutricional e realização de atividades físicas. Dentre as prevenções e tratamentos hoje adotados, contamos com regulação nutricional, realização de atividades físicas sem excessos, visitas periódicas ao profissional especializado em cardiologia, manutenção da saúde através da realização de exames diagnósticos e no caso de pacientes que já possuam algum tipo de doença cardiovascular, o uso periódico de fármacos capazes de alcançar, tratar e manter a saúde do paciente, aumentando sua longevidade (Guyton & Hall 2010).

Neste sentido, os medicamentos empregados na regulação da pressão arterial são geralmente da classe dos antagonistas dos receptores da angiotensina (ARAs) e da enzima conversora da angiotensina (ECA). Tais fármacos ocupam um local específico dentro do sítio enzimático, bloqueando, assim, a função da enzima, reduzindo a produção de angiotensina II resultando na redução da pressão arterial (PA). A Figura 1 apresenta o esquema do processo de conversão da angiotensina no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que tem sido um alvo central das complicações cardiovasculares e cardio-renais. A renina controla o passo limitante na cascata SRAA e, portanto, é o alvo mais favorável para a supressão do mesmo, uma vez que cliva o angiotensinogênio para formar o decapeptídeo inativo angiotensina I, a qual é então convertida pela ECA, para o ativo octapeptídeo angiotensina II, que interage com os receptores de tipo 1 da angiotensina. Isto leva a vasoconstrição e aumento da pressão arterial, promovendo a secreção de

aldosterona adrenal renal, reabsorção de sódio e liberação de catecolaminas a partir da medula adrenal e terminações nervosas prejunçãoais (Guyton & Hall 2010; Carvalho *et al.* 2015; Tortora & Derrickson 2013).

Figura 1 Esquema do processo de conversão da angiotensina em seu sítio ativo, em outras espécies de angiotensina I, II e III (altamente agravantes da PA), através das enzimas conversoras correspondentes em cada etapa do processo.



Fonte: (Braun-Menendez *et al.* 1940).

O termo pressão arterial, em uso clínico, refere-se à pressão exercida nas artérias gerada pelo ventrículo esquerdo no momento da sístole, e à pressão restante nas artérias quando o ventrículo realiza diástole. Nas artérias, o sangue é influenciado pela pressão exercida pelo sistema cardiocirculatório, elevando-se e diminuindo em sequência, a cada batimento cardíaco. A pressão mais elevada alcançada pela aorta e artérias periféricas acontece no momento em que há a

contração ventricular esquerda (sístole), após o sangue ser impulsionado às artérias, o ventrículo esquerdo sofre um relaxamento (diástole). Em um homem jovem, saudável e em condições de repouso, a pressão sistólica (contração ventricular) é cerca de 120 mmHg ( $\pm 10$  mmHg); enquanto que a pressão diastólica (relaxamento ventricular) é cerca de 80 mmHg (Page & Helmer 1940; Negrão *et al.* 2001; Ministério da Saúde 2006; Brasil 2001).

Tem-se por hipertensão arterial sistêmica (HAS), a condição clínica multifatorial marcada por níveis elevados da pressão arterial (PA). Tal alteração é devida a fatores como, defeitos estruturais de órgãos alvo (coração, encéfalo, artérias e rins), alterações metabólicas, alimentação indevida e obesidade, intolerância a glicose, dislipidemia, tabagismo, sedentarismo e genética; causando débitos crônicos e/ou agudos, no organismo humano, podendo, por muitas vezes, serem fatais (Ministério da Saúde 2006; Brasil 2001; Grupo Hospitalar Conceição 2009).

Em maio de 2003, o *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, uma organização de avaliação e aprovação das medidas de prevenção, detecção, avaliação e tratamento da HAS, publicou novas diretrizes e parâmetros das questões da hipertensão arterial. As mesmas estão dispostas na Tabela 1, onde os níveis ótimos estabelecidos para a PA, são de <120 mmHg para pressão sistólica e de <80 mm Hg para a diastólica. Já em níveis elevados e patológicos, tais índices compreendem valores acima de 180 para pressão sistólica e acima de 110 para diastólica (Golan *et al.* 2009; Guyton & Hall 2010; Tortora & Derrickson 2013; Negrão *et al.* 2001; Ministério da Saúde 2006; Chobanian *et al.* 2003).

Tabela 1 Classificação da pressão arterial em adultos maiores de 18 anos, de acordo com o Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.

<b>Classificação</b>	<b>PS (mm Hg)</b>	<b>PD (mm Hg)</b>
<b>Otima</b>	< 120	< 80
<b>Normal</b>	< 130	< 85
<b>Limitrofe</b>	130 – 139	85 – 89
<b>Hipertensão estágio 1</b>	140 – 159	90 – 99
<b>Hipertensão estágio 2</b>	160 – 179	100 – 109
<b>Hipertensão estágio 3</b>	≥ 180	≥ 110
<b>Hipertensão sistólica isolada</b>	≥ 140	< 90

Fonte: (Chobanian *et al.* 2003).

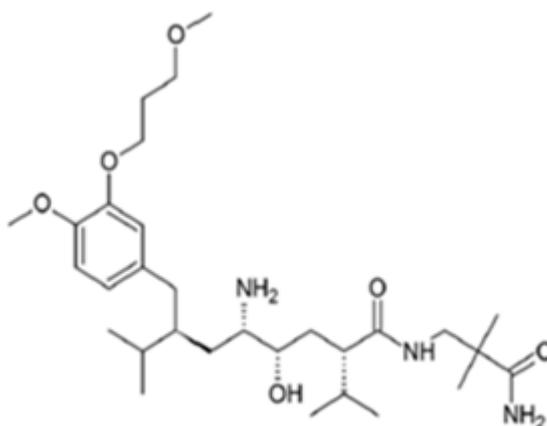
A terapêutica é fundamentada no risco vascular global, considerando-se os fatores de risco do indivíduo em questão, lesões aos órgãos vitais e níveis apresentados da PA. O objetivo da terapêutica é a redução da PA e em contrapartida, redução de eventos cardiovasculares. As modificações no estilo de vida do paciente, melhoria alimentar, realização de atividades físicas e redução de peso, também devem ocorrer, pois tais medidas influenciam fortemente os riscos promovidos pelas doenças cardiovasculares (DCV) e HAS. Os níveis de mortalidade e morbidade diminuem com o uso de diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio (Golan *et al.* 2009; Guyton & Hall 2010; Carvalho *et al.* 2015; Tortora & Derrickson 2013; Braun-Menendez *et al.* 1940; Page & Helmer 1940; Negrão *et al.* 2001; Ministério da Saúde 2006; Brasil 2001; Grupo Hospitalar Conceição 2009; Chobanian *et al.* 2003).

Cada vez mais tem-se noticiado em jornais, revistas e redes televisivas, os perigos quanto ao uso de medicamentos adulterados. Medicamentos diferentes do que são apresentados nos rótulos das caixas e concentrações abaixo do descrito na embalagem são algumas das adulterações que fazem com que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determine a suspensão da venda e distribuição de tais medicamentos. Deste modo, o controle de qualidade de anti-hipertensivos é fundamental para assegurar sua eficácia e, conseqüentemente, a segurança do paciente que faz uso desta classe de medicamentos (Grupo Hospitalar Conceição

2009; Barroso 2013; Lotufo *et al.* 1998). Todavia, em 21 de dezembro de 2015, o *Diário Oficial da União* (DOU) publicou uma medida cautelar com validade de 90 dias, de interdição de Captopril 25 mg da EMS S/A, do Lote nº L627883 com validade em 04/2016, em todo território nacional, ordenado pela Anvisa. Segundo a mesma, um dos componentes do fármaco estava fora do padrão, invalidando seu poder de ação no organismo humano. O laudo emitido pela Fundação Ezequiel Dias, de Minas Gerais, reportou “resultado insatisfatório de teor e limite de dissulfeto de captopril”. Em informação para a Agência Brasil, a EMS S/A informou ter solicitado contraprova dos testes, para certificação dos resultados e um possível ajuste dos mesmos, ressaltando que seus padrões de controle de qualidade são rigorosos e precisos (<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/anvisa-interdita-lote-de-medicamento-indicado-para-hipertensao>); (<http://exame.abril.com.br/brasil/noticias/anvisa-interdita-lote-de-medicamento-para-hipertensao>).

Dentre os medicamentos geralmente empregados no controle da hipertensão arterial, podem-se destacar Alisquireno<sup>®</sup>, Captopril<sup>®</sup> e Losartana<sup>®</sup>. O Alisquireno<sup>®</sup> (Figura 2) é um inibidor direto da renina, ocupando um local específico no interior do sítio enzimático do sistema renina / pró-renina do receptor, bloqueando, assim, a função desta enzima, reduzindo eficazmente a atividade da renina no plasma, resultando na supressão completa do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Carvalho *et al.* 2015).

Figura 2 Estrutura química da molécula de Alisquireno<sup>®</sup>, fármaco inibidor direto da renina, no tratamento da HAS.



Fonte: (Anon n.d.).

O fármaco inativa a renina que cliva o angiotensinogênio que irá formar a angiotensina I, a qual é então convertida para angiotensina II pela enzima conversora da angiotensina (Carvalho et al. 2015). Tratando-se de um inibidor de renina, haverá o bloqueio quase completo do sistema renina-angiotensina-aldosterona, melhor que inibidores da ECA, uma vez que a angiotensina II pode também ser formada por vias alternativas. Como efeitos positivos no tratamento com inibidores de renina, também podem ser causados pela ativação contínua dos receptores  $AT_2$ , que mediam efeitos desejáveis de vasodilatação, efeitos antiproliferativos, diferenciação celular e reparo tecidual. Além disso, estudos apontam que a administração conjunta de tais fármacos com inibidores de ECA, resultam em efeitos mais intensos que doses maiores de cada droga individualmente. Como principal efeito colateral de seu uso contínuo, têm-se a ocorrência apenas de pequenas tonturas posturais (Golan *et al.* 2009; Page & Helmer 1940; Friedrich & Schmieder 2013). O alisquireno é comumente analisado por meio de técnicas espectroscópicas como espectrofluometria, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região ultravioleta (UV-VIS) e por métodos cromatográficos.

Segundo Politi (*et al.* 2011), a elucidação da estrutura do fármaco e sua análise conformacional eram estudadas por espectroscopia RMN 1D e 2D, como também através de simulações aleatórias em dinâmica molecular (DM). Neste sentido, finalmente, pela primeira vez, os cálculos DM foram realizados para alisquireno no local do receptor específico, a fim de revelar sua base molecular de ação. Através dos estudos realizados, o autor afirma que o fármaco se liga numa conformação prolongada onde é envolvido por várias interações de ligações de hidrogênio com ligações em cavidade (Asp32 / 255, Gly34) e (Arg74, Ser76, Tyr14), que garantem maior estabilidade à molécula. O trabalho realizado foi de suma importância, uma vez que o fármaco consiste de resíduos de Ser76, que determina o aprisionamento de alisquireno no sítio ativo da renina.

Aydo (2015) aplicou a técnica de cromatografia líquida em fase reversa, na determinação simultânea de alisquireno, amlodipino e hidroclorotiazida em plasma humano e urina. O método emprega uma eluição em gradiente utilizando para isto, ácido fosfórico 10 mM, em que continha 0,1% de trietilamina pH 2,5 e acetonitrila. As faixas lineares obtidas foram da ordem de 0,01-10  $\mu\text{g/mL}$ , na urina, tanto para alisquireno quanto para amlodipino. Já para hidroclorotiazida, o autor obteve uma

faixa de 0,0125-2,5 µg/mL em plasma e urina, e os coeficientes de correlação foram superiores a 0,9983 para todos os analitos. Através do mesmo método de análise, El-Bagary (*et al.* 2014) determinou hemifumarato de alisquireno, besilato de amlodipino e hidroclorotiazida, respectivamente, usando acetonitrila como fase móvel. Os limites de detecção e quantificação foram da ordem de 0,855 e 2,951 mg/mL, respectivamente para alisquireno; 0,061 e 0,202 ng/mL, respectivamente para amlodipino e de 0,052 e 0,174, respectivamente para hidroclorotiazida.

Mannemala & Nagarajan (2015) investigou alisquireno simultaneamente a amlodipino em plasma humano, utilizando por meio de CLAE acoplado a um detector PDA. As amostras foram coletadas a partir de proteínas plasmáticas. Os valores de recuperação foram satisfatórios, da ordem de 97,11% a 98,45% para alisquireno e 97,5% a 99,12% para amlodipino. Os limites de quantificação foram de 30 e 1,0 ng/mL para alisquireno e amlodipino, respectivamente. Akyu (2014) também analisou alisquireno em concomitância a besilato de amlodipino utilizando CLAE usando trietilamina como fase móvel. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,51, 0,95, 1,70 e 3,18 mg / mL para o besilato de amlodipino e hemifumarato alisquireno, respectivamente. Ainda empregando CLAE, o alisquireno foi analisado em concomitância a outras seis drogas destinadas ao tratamento da PA, por Salim (*et al.* 2014), cuja faixa linear foi da ordem de 20-250 g/mL.

Segundo Burckhardt (*et al.* 2014), não havia nenhum estudo em que determinava alisquireno em concomitância a enalapril e enalaprilato em urina. Neste sentido, os autores desenvolveram um método de análise sensível empregando CLAE para determinação e quantificação dos fármacos em urina, concomitantemente. Os efeitos de matriz foram reduzidos por meio de extração em fase sólida. Sob condições de gradiente a uma velocidade de fluxo de 0,4 mL/min, em que o efluente da coluna foi monitorado por espectrometria de massa. As curvas de calibração foram obtidas de 9,4 a 9600 ng / mL para alisquireno, 11,6 até 12000 ng / mL para o enalapril e 8,8 até 9000 ng / mL para enalaprilato.

Adireddy (*et al.* 2013) propôs a análise de alisquireno em plasma humano empregando CLAE com monitoramento em espectrometria de massa. A curva de calibração construída foi linear sob intervalo de confiança nas concentrações entre 0,10-1013 ng/mL. Sob o método de análise de cromatografia líquida, Goyani (*et al.* 2013) quantificou alisquireno, valsartana e sitagliptina em plasma de rato empregando uma coluna cromatográfica C18 e detector de fluorescência. As curvas

de calibração obtidas foram lineares, da ordem de 25 a 2,000 ng mL<sup>-1</sup> para alisquireno e sitagliptina e de 50 a 4,000 ng mL<sup>-1</sup> para valsartana. Os limites de quantificação foram de 25 ng mL<sup>-1</sup> para alisquireno e sitagliptina e de 50 ng mL<sup>-1</sup> para valsartana. Ashok (*et al.* 2012) separou enantiômeros de alisquireno sob metodologia de cromatografia em camada. A resolução obtida entre os dois enantiômeros foi maior que 3,0. O método detectou o isômero R a um nível de 0,2 mg / mL.

Através do método de eletroforese capilar, Salim (*et al.* 2014) determinou hemifumarato de alisquireno, amlodipino besilato e hidroclorotiazida, simultaneamente. Os limites de detecção obtidos foram da ordem de 0,11; 0,33 e 5,83 g/mL para o besilato de amlodipino, hidroclorotiazida e hemifumarato de alisquireno, respectivamente.

Através do método de fluorescência Aydogmus (*et al.* 2012) determinou alisquireno em urina humana, a partir da reação ocorrida entre o fármaco e a fluorescamina em tampão borato pH 9. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram da ordem de 13,47 ng / mL e de 40,81 ng / mL, respectivamente.

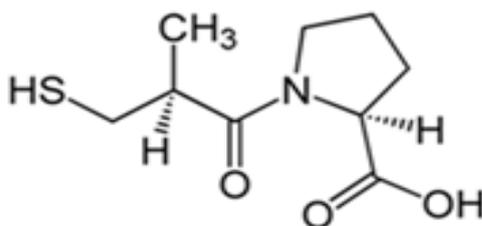
Aydogmus (2012) determinou alisquireno em plasma humano, a partir da reação do fármaco com cloreto de dansilo, em presença de solução de bicarbonato de sódio pH 10,5 e posteriormente analisada em espectroscopia UV-VIS. As curvas de calibração obtidas se mostraram lineares ao longo dos intervalos de concentração de 100-700 e 50-150 ng / mL para a solução padrão e em plasma, respectivamente. Os limites de detecção foram de 27,52 ng / mL em solução padrão, 4,91 ng / ml no plasma, com índices de recuperação de 100,10 e 97,81%, respectivamente, para a solução padrão e em plasma.

O comportamento eletroquímico do alisquireno foi estudado por Pamuk (*et al.* 2013). O estudo se baseou em redução reversível controlada por adsorção em eletrodo gotejante de mercúrio, e por oxidação eletroquímica em eletrodo de carbono vítreo em tampão de Britton-Robinson nos pH's 10 e 8, respectivamente. Através das análises determinou-se que o alisquireno é oxidado irreversivelmente na posição benzílica e reversivelmente reduzido nos grupos carbonila da amida. Os limites de detecção e de quantificação foram de  $6,3 \times 10^{-8}$  e  $2,1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> por voltametria de pulso diferencial em HMDE e  $1,2 \times 10^{-8}$  e  $3,9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva.

Visando empregar um eletrodo com elevada estabilidade, fraca adsorção de substâncias orgânicas e com ampla janela eletroquímica, os autores da presente dissertação Carvalho (*et al.* 2015) empregaram o eletrodo de diamante dopado com boro na detecção eletroquímica de alisquireno. Neste sentido, foi empregada a voltametria de onda quadrada juntamente com um eletrodo de diamante dopado com boro, cujo nível de dopagem foi de 8.000 ppm. A detecção eletroquímica de alisquireno foi analisada em formulações comerciais e em plasma humano. Recentemente esse estudo foi publicado em um periódico científico, que se encontra em anexo na dissertação.

O captopril (Figura 3) (2S)-3-mercapto-2-methyl-1-oxo-propionyl-L-proline é o primeiro inibidor oral específico da enzima conversora de angiotensina, bloqueando a conversão de angiotensina I em angiotensina II através da inibição da enzima conversora da angiotensina. A atividade hipotensora do captopril provavelmente resulta da ação inibitória sobre o sistema renina angiotensina aldosterona (*Golan et al.* 2009; *Ciências et al.* 2011).

Figura 3 Estrutura química da molécula de captopril, fármaco inibidor da enzima de conversão da angiotensina.



Fonte: (*Ciências et al.* 2011).

O fármaco é um inibidor ativo por via oral, da enzima de conversão da angiotensina em que tem sido amplamente utilizado no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Segundo Mansour & Danielson (2012), as pesquisas acerca da determinação quantitativa de captopril ocorrem a mais de 20 anos. As técnicas de análise de controle de qualidade industrial mais utilizadas e discutidas na literatura são a cromatografia gasosa, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), colorimetria, espectrofluorimetria, quimioluminescência, fotoluminescência e por meio de técnicas eletroquímicas.

Khan (*et al.* 2014) utilizou uma sonda fotoluminescente na determinação de captopril, onde obteve uma curva de calibração linear até a concentração de  $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . O autor obteve um limite de detecção de  $2,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Os testes foram realizados em formulações farmacêuticas. Para análise de captopril em urina humana Kuśmierk & Bald (2007), desenvolveram um método simples e rápido para determinação do fármaco em cromatografia em fase reversa, monitorada por detector espectrofotométrico. A curva de calibração obtida mostrou linearidade entre as concentrações de 0,1 a 200 mol / L, com r de 0,9999. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,05 e 0,1 mol / L, respectivamente.

Através de métodos espectrofotométricos, Tzanavaras (*et al.* 2003), determinou captopril através de sua oxidação por ferro (III). O ferro produzido reage com parte da molécula do fármaco em meio ácido, formando um complexo colorido que foi monitorado espectrofotometricamente em 535 nm. O limite de detecção foi de 3,0 mg / L e os testes de recuperação ficaram entre 98,1% a 102,5%, sendo os resultados, considerados como satisfatórios. Amostras de captopril foram ainda quantificadas por espectroscopia Raman em formulações farmacêuticas e em plasma humano por Long (*et al.* 2015). As recuperações alcançadas foram de 94,3% a 109,8% e os limites de detecção e quantificação, estimados em 0,149  $\mu\text{M}$  e 0,451  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

A análise eletroquímica do captopril é geralmente realizada empregando como técnicas a voltametria linear, cíclica, onda quadrada, pulso diferencial e também por meio de espectroscopia de impedância.

Ensafi & Arabzadeh (2012) analisou captopril empregando voltametria cíclica, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizando clorpromazina como eletrocatalisador e eletrodo de carbono vítreo. Segundo o autor, a clorpromazina catalisou a oxidação do captopril em solução aquosa produzindo um pico de oxidação com corrente em cerca de 0,625 V. O limite de detecção obtido foi da ordem de 4,8 mM e o desvio padrão relativo de 0,66% (n = 9).

Ziyatdinova (*et al.* 2006), empregando um eletrodo de platina em solução de 0,1 M de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (vs. Ag / AgCl), analisou captopril em formulações comerciais. A curva de calibração manteve a linearidade nos intervalos de concentração de  $1,2 \times 10^{-6}$  a  $3,2 \times 10^{-4}$  M. O limite de detecção foi de  $9,2 \times 10^{-7}$  M e o desvio padrão relativo entre 1% e 4%. Rajabzadeh (*et al.* 2015) desenvolveu um método eletroanalítico por técnica de voltametria de onda quadrada, para

determinação simultânea de isoprenalina, captopril e triptofano através de sua oxidação em eletrodo de pasta de carbono modificado através da redução de óxido de grafeno, nanotubos de carbono e cobalto (II). O limite de detecção para o captopril foi da ordem de 50 nM. A técnica foi aplicada em amostras biológicas, com o uso do eletrodo desenvolvido, apresentando bons resultados.

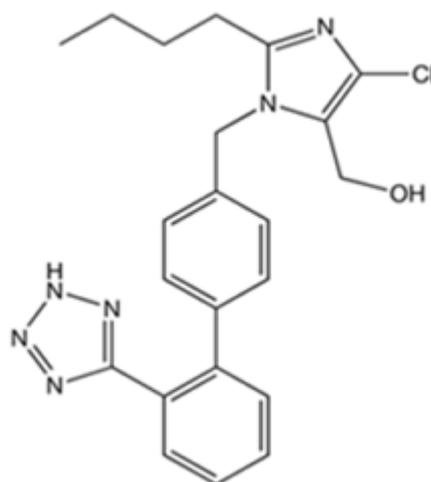
O fármaco foi ainda eletrooxidado por voltametria de onda quadrada em eletrodo de pasta de carbono modificado com ZnO-CuO por Beitollahi (*et al.* 2015), apresentando um limite de detecção de 90,0 nm. Karimi-Maleh (*et al.* 2014) quantificou captopril eletroquimicamente, em formulações farmacêuticas e em urina humana, através das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, cronoamperometria e cronocolometria, utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado por incorporação de nanotubos de carbono com poliamida. A curva analítica é linear nas concentrações entre 0,2-200  $\mu\text{M}$  com limite de detecção de 0,08  $\mu\text{M}$ . Jalali & Ranjbar (2014) quantificou captopril empregando eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato de cobre e cobalto, por eletrooxidação catalítica. A linearidade da curva analítica se mantém nas concentrações de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $3,1 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$  com um limite de detecção de 4,2 pM. Captopril também foi quantificado simultaneamente com a hidroclorotiazida por métodos voltamétricos em amostras farmacêuticas e biológicas. Gholivand & Khodadadian (2013) analisou os fármacos com eletrodo de pasta de carbono modificado com grafeno / ferroceno em voltametria de pulso diferencial, obtendo uma linearidade na curva analítica nas concentrações de 1,0 a 430 mM para captopril e de 0,5 a 390 mM para hidroclorotiazida.

Ferreira Vitoreti (*et al.* 2014) realizou a determinação eletroquímica de captopril em formulações comerciais empregando o eletrodo de diamante dopado com boro juntamente com a técnica de voltametria de onda quadrada. O eletrólito empregado foi o tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 9,0. O perfil eletroquímico evidenciou a presença de um pico irreversível de corrente proveniente da oxidação do fármaco. Os autores obtiveram linearidade da curva analítica entre as concentrações de 20 mg L<sup>-1</sup> a 100 mg L<sup>-1</sup> (R = 0,9986). O limite de detecção encontrado foi 36,0 mg L<sup>-1</sup> (0,165 mol L<sup>-1</sup>). Os valores de recuperação obtidos foram ficaram entre 96,6-98,5%.

Outro fármaco que foi objeto de estudo na presente dissertação foi a Losartana potássica (Figura 4), que é indicada para o tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca em casos de pacientes que não se adequam mais a

fármacos inibidores da ECA. Sendo assim, a Losartana será indicada pelo profissional de saúde, quando o intuito é retardar a progressão de doenças renais avaliadas pela redução da incidência combinada de duplicação da creatinina sérica, insuficiência renal terminal e riscos de morte. Estudos clínicos apontam que ao administrar uma dose única diária, há reduções significativas da pressão arterial sistólica, e o efeito anti-hipertensivo perdura por até um ano. Losartana é o primeiro fármaco de uma nova classe de agentes para o tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, sendo um antagonista do receptor (tipo  $AT_1$ ) da angiotensina II. A angiotensina II, como já mencionado é um potente vasoconstritor, sendo o principal hormônio do sistema renina-angiotensina e o maior determinante da fisiopatologia da hipertensão. A angiotensina II se liga a receptores  $AT_1$  presente em vários tecidos do corpo, desencadeando reações biológicas importantes, como vasoconstrição e liberação de aldosterona (Nikkho & Ltda n.d.). O fármaco remete a primeira droga aprovada no tratamento da hipertensão arterial por ter ação biológica eficaz na inibição da angiotensina II no receptor ( $AT_1$ ). Por ser um importante fármaco na ação da qual foi destinado, a elucidação de sua estrutura molecular se faz necessário. Sendo assim, sua conformação foi determinada em espectroscopia RMN e análise computacional (Golan *et al.* 2009).

Figura 4 Estrutura química da molécula de losartana, fármaco alternativo em pacientes que não se adequam mais a inibidores da ECA. A losartana é um antagonista do receptor (tipo  $AT_1$ ) da angiotensina II.



Fonte: (Nikkho & Ltda n.d.).

Através de tais estudos, determinou-se que a losartana favorece uma conformação pouco energética, onde os anéis imidazol e tetrazole são postados opostamente, relativos ao plano espaçador do anel fenil. Distante a esse anel fenil, consta o grupo hidroximetil e a cadeia alquila, acima do anel espaçador fenil. Segundo os estudos realizados por Mavromoustakos (*et al.* 1999), as estruturas enantioméricas de losartana, não são equivalentes, logo conclui-se que a quiralidade da molécula auxilia na sua função biológica.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos (pró-genéricos), em 2015 dez medicamentos ditos “inovadores” tiveram seu direito de patente vencida, acumulando ao mercado um valor de R\$ 761,6 milhões de receitas. Neste sentido, losartana perdeu seu poder de patente no ano de 2010, sendo então vendido ao consumidor apenas em forma genérica e similares. A losartana potássica, de todos os fármacos que perderam suas patentes, lidera o ranking das prescrições médicas, com 1,422 milhão de receitas (<http://www.guiadafarmacia.com.br/edicao-254-especial-farmaceutico/7388-patentes-de-medicamentos>).

A Losartana pode ser indicada juntamente com outros fármacos, deste modo, alguns trabalhos na literatura abordam a quantificação da losartana (em formulações comerciais ou em fluidos biológicos) individualmente ou em concomitância a outro fármaco indicado para o tratamento da hipertensão arterial, como por exemplo, a hidroclorotiazida. O estudo da quantificação e detecção da losartana é amplo, onde se podem destacar estudos empregando-se técnicas como a cromatografia, eletroforese capilar, espectrofotometria, conductometria e voltametria de pulso diferencial. Todavia, o método oficial de quantificação individual de losartana determinada pelos Estados Unidos Pharmacopeia (United States Pharmacopoeia, 2009), é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Santos *et al.* 2013).

Através de técnica espectrofotométrica, Bolattin (*et al.* 2015) estudou a oxidação de losartana diperiodatocuprate (III) na presença e ausência de rutênio (III) como catalisador. Os produtos reacionais foram quantificados em cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear. Os fármacos fumarato de clemastina de hidrogênio, desloratadina, losartana potássica e moxepiril HCl, foram complexados com eosina e quantificados em análises espectrofotométricas de UV-Vis por El-hay (*et al.* 2011). Graças ao uso de um agente tensoativo não iônico de metilcelulose, não foi necessário fazer uso de solvente de extração na técnica. As curvas analíticas

se mantiveram lineares nas concentrações de 1,25 g / mL a 11,25 g / mL para fumarato de clemastina de hidrogênio; de 0,31 g / mL a 2,81 g / mL para desloratadina; de 1,25 g / mL a 15,0 g / mL para losartana potássica e de 2,5 g / mL a 20,0 g / mL para moxepiril HCl. Através da técnica de cromatografia de interação hidrófila acoplada a espectrometria de massa, Lee (*et al.* 2009) analisou losartana em concomitância a irbesartana em amostras de formulações farmacêuticas e em plasma humano. A curva analítica se manteve linear na gama de concentrações de 10 a 2500 ng / mL para a losartana e limite de quantificação de 10 ng / mL.

Losartana e seu metabólito E 3174 foram analisados em formulações farmacêuticas e em plasma humano, através do método de cromatografia líquida acoplada a um CLAE. Segundo Shah (*et al.* 2009) o método ofereceu linearidade na curva analítica no intervalo de 2,5 a 2000 ng / mL para losartana e de 5,0 a 3000 ng / mL para E 3174 com coeficiente de correlação de 0,9993. As recuperações obtidas foram da ordem de 99,86% para losartana e de 94,16% para E 3174. Losartana foi ainda analisada em concomitância a hidroclorotiazida, em formulações farmacêuticas e em plasma humano, em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por Shah (*et al.* 2015). A curva analítica se manteve linear entre as concentrações de 0,5 a 500 ng / mL para losartana e de 0,25 a 150 ng / mL para hidroclorotiazida.

Um trabalho de determinação de losartana e de seu metabólito E 3174 em urina de rato foi proposto por Pronina (*et al.* 2012), através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. O limite de detecção para losartana e E 3174 foi da ordem de 2,5 ng / mL e 5 ng / mL, respectivamente. De Oliveira Rossini (*et al.* 2012) conduziu uma titulação condutimétrica na análise e quantificação de losartana em formulações farmacêuticas, através da protonação do fármaco que produz um precipitado branco, provocando um aumento lento na condutividade. O método ofereceu recuperações entre 99% a 102,4%, sendo considerado, de acordo com os dados já apontados por análises cromatográficas, recomendado pela Farmacopéia dos Estados Unidos.

A metodologia eletroquímica também foi empregada na análise da losartana juntamente com o triamtereno. Neste caso, foi empregada a voltametria de onda quadrada, em eletrodo de mercúrio em meio de tampão de Britton-Robinson pH 3,0, como eletrólito de suporte. Segundo Ensafi & Hajian (2008), a curva analítica se manteve linear nas concentrações de 30,0 a 270,0 nmol / L para losartana e de 5,0 a

400,0 nmol / L para triamtereno. Os limites de detecção encontrados foram da ordem de 9,7 e 0,3 nmol / L para losartana e triamtereno, respectivamente. As análises foram realizadas em formulações farmacêuticas e em urina humana.

Santos (*et al.* 2013) desenvolveu um método eletroquímico empregando voltametria de pulso diferencial, para a análise de losartana em concomitância a hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas empregando o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). O eletrólito de suporte utilizado foi o tampão de Britton-Robinson em pH 9,5. A curva analítica se manteve linear nas concentrações de  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $7,4 \times 10^{-5}$  mol / L para ambos os fármacos. Os limites de detecção apresentados foram de  $1,2 \times 10^{-6}$  mol / L para hidroclorotiazida e de  $9,5 \times 10^{-7}$  mol / L para losartana.

### **O eletrodo de diamante dopado com boro**

O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) vem despertando a atenção na área de eletroquímica e eletroanalítica em função de várias propriedades atrativas que incluem sua vasta janela eletroquímica de potencial em meio aquoso e não aquoso, alta estabilidade e resistência em meios agressivos, inércia química, longo tempo de vida útil, eficiência de corrente da ordem de 90%, baixas correntes capacitivas, eletrogeração de radicais hidroxila e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido (Santos *et al.* 2013). Até certo tempo, o diamante não era visto como um bom eletrodo de trabalho por sua grande capacidade isolante, bem como o fato de se tratar de um material exótico de difícil acessibilidade. Essa realidade mudou a partir do momento em que houve a implementação da tecnologia de produção de finos filmes de diamante sintético (dopado) a partir de reagentes gasosos, pela técnica de CVD – Chemical vapor deposition (Einaga *et al.* 2014; De Barros *et al.* 2005). No Brasil há o preparo de eletrodos de diamante dopado com boro fazendo uso da técnica de CVD sob diferentes substratos, sendo estes utilizados em vários âmbitos da eletroquímica.

O número de publicações envolvendo o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) vem crescendo nos últimos anos. Neste sentido podemos destacar publicações do DDB envolvendo eletroquímica, bioeletroquímica, eletroanálise, eletrossíntese, eletrocatalise, fotoeletrocatalise e eletroquímica ambiental

(degradação de poluentes e tratamento de água), assim como aplicações correlatas (Carvalho *et al.* 2015).

Neste sentido, devido às suas propriedades únicas, o DDB está sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de vários fármacos, como analgésicos (Pereira *et al.* 2016; Aydın Yiğit, Yavuz Yardım, Zühre Şentürk 2015; Chaves *et al.* 2015; Santos *et al.* 2015; He *et al.* 2015; Sartori *et al.* 2009; Lima *et al.* 2014; Lourenção 2009), anti-hipertensivos (Salamanca-Neto *et al.* 2016; Guedes *et al.* 2015; Lourencao *et al.* 2015; El-Bagary *et al.* 2014; Ebeid *et al.* 2014; Salim *et al.* 2014; Aydo 2015; Aydın Yiğit, Yavuz Yardım, Zühre Şentürk 2015; Ferreira Vitoreti *et al.* 2014; Lima *et al.* 2014; Silva *et al.* 2014; Mansano & Sartori 2015; Melorose *et al.* 2015; Santos *et al.* 2013), vitaminas (Stanković *et al.* 2016; Santos & Rangel 2015; Lourenção 2009; Teófilo *et al.* n.d.; Freitas 2015), hormônios (Pereira *et al.* 2012; Perez *et al.* 2015; Yan *et al.* 2012; Paterakis *et al.* 2012; He *et al.* 2015; Melorose *et al.* 2015), anti-histamínicos (Sartori *et al.* 2009; Freitas 2015; El-hay *et al.* 2011), anti-asmáticos (Abt *et al.* 2016; Lima *et al.* 2014); entre outras.

Devido às vantagens inerentes ao DDB e sua grande versatilidade na eletroanálise de diferentes substâncias, a proposta deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para quantificar os anti-hipertensivos alisquireno, captopril e losartana em formulações comerciais e em fluidos biológicos (plasma).

### **Técnicas voltamétricas**

Com o avanço tecnológico da informática e a necessidade de desenvolvimento das técnicas eletroquímicas, surgiram inovações que possibilitaram maiores alcances no que diz respeito às análises eletroquímicas. Uma grande vantagem das técnicas voltamétricas, é a possibilidade de interfaceamento de um computador com equipamentos eletroquímicos, para o controle do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho para obtenção de um sinal confiável de corrente. As técnicas voltamétricas mais empregadas são: a voltametria cíclica e linear, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, multipulsos entre outras. Com exceção da voltametria cíclica e linear, as demais técnicas citadas são caracterizadas por serem técnicas de pulso. Em tais técnicas o potencial aplicado no eletrodo não é função

linear do tempo de varredura, uma vez que a variação do potencial aplicado segue uma sequência de pulsos, já que a corrente de pico obtida estará diretamente condicionada à forma de aplicação dos pulsos potenciais (Souza *et al.* 2004; Bard *et al.* 1944; Electrochemistry 2000).

As diferenças nas várias técnicas de pulso está na forma da excitação da onda de pulsos de potenciais aplicada a cada sistema.

### 1.1.1 Voltametria cíclica (VC)

Dentre todas as técnicas voltamétricas, a voltametria cíclica (VC) é a mais utilizada para obtenção de respostas qualitativas a respeito do analito investigado, fornecendo informações a respeito da termodinâmica dos processos redox, cinética reacional, reações de transferência de elétrons, reações de acoplamento e processos de adsorção na interface eletrodo-solução. Poderá também ser aplicado em processos quantitativos em que esteja estabelecido a linha de base adequada ao analito investigado (Bard *et al.* 1944; Electrochemistry 2000). O processo de varredura consiste na medição da corrente resultante do potencial aplicado. A técnica correlaciona três variáveis: potencial (E), corrente (I) e tempo (t) em uma série de experimentos eletroquímicos, descrevendo a interdependência entre o potencial do eletrodo e a variação na corrente observada na célula eletroquímica. A VC se caracteriza pela imposição de uma varredura cíclica de potencial inferida ao eletrodo de trabalho e a variação na corrente observada durante um dado período de tempo. A técnica é descrita basicamente pelo potencial de início ( $E_i$ ), potencial de inversão ( $E_{inv}$ ), potencial final ( $E_f$ ) e velocidade de varredura ( $v$ ), resultando em uma curva eletroquímica que fornece informações a respeito do potencial vs corrente, denominada de voltamograma cíclico (Bard *et al.* 1944).

Nos voltamogramas cíclicos, as reações eletroquímicas de interesse acontecem no eletrodo de trabalho, onde o potencial aplicado está diretamente relacionado a um sistema de referência. A corrente imposta ao eletrodo de trabalho, devido à transferência de elétrons, é designada corrente faradaica. O contra-eletrodo é utilizado para equilibrar o processo faradaico no eletrodo de trabalho, favorecendo a transferência de elétrons em direções opostas, ou seja, se a redução ocorre no eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo sofrerá oxidação, e vice-versa. Porém, o processo ocorrido no contra-eletrodo não tem interesse prático, ou seja, é apenas

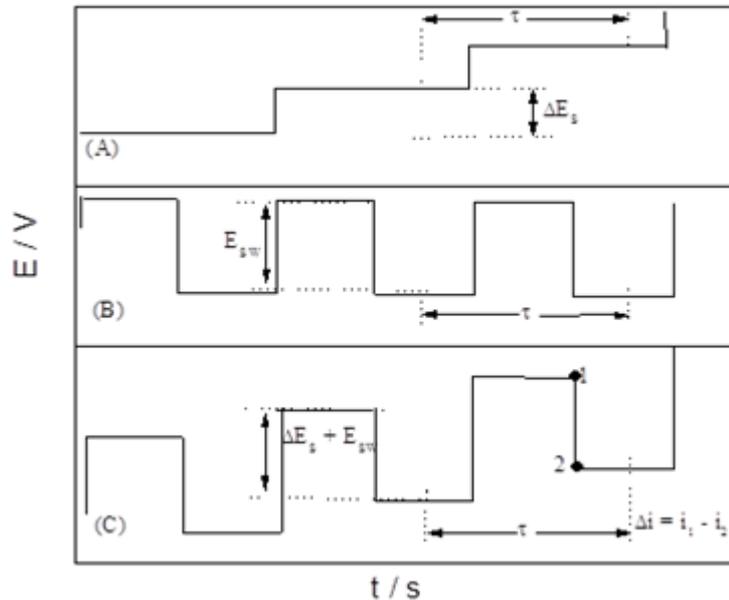
para estabilizar a corrente. As informações relevantes obtidas virão dos processos ocorridos no eletrodo de trabalho (Electrochemistry 2000; Bard *et al.* 1944).

No presente trabalho, a voltametria cíclica foi empregada para analisar a eletroatividade dos fármacos sobre o DDB em diferentes, pHs, eletrólitos de suporte e concentrações. Também se utilizou a voltametria cíclica para avaliar a reversibilidade dos processos eletroquímicos.

### 1.1.2 Voltametria de onda quadrada (SWV)

Uma das técnicas de pulso mais sensíveis, rápidas e eficientes que existe, é a voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “Square Wave Voltammetry”. Atualmente, é uma das técnicas de pulso mais usadas em fins analíticos, devido à sua sensibilidade e resolução frente as técnicas de corrente contínua (Manoel 1922). Tal técnica alcança limites de detecção tão baixos (próximos a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) que podem ser comparadas às técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Todavia, se sobrepõe a estas por vantagens como agilidade, sensibilidade, sem necessidade de pré-tratamentos de amostra, viável financeiramente, entre outros. Além disso, também fornece ao analista, informações importantes a respeito da cinética e mecânica do processo de varredura. Em tese, trata-se de uma técnica diferencial sofisticada, que faz uso de tecnologia computacional na implementação de experimentos e na realização da modelagem teórica experimental. Considerada como uma técnica de grande amplitude no qual resulta em uma onda quadrada simétrica, sobreposta a um potencial aplicado diretamente no eletrodo de trabalho, sendo composta por uma função monotônica (Figura 5 (a)) superposta a uma função periódica de amplitude  $E_{sw}$  (Figura 5 (b)), dando origem à onda quadrada representada na Figura 7 (Electrochemistry 2000; Bard *et al.* 1944).

Figura 5 Representação esquemática de uma onda quadrada (a) função monotônica de período  $\tau$  com incremento de varredura  $E_s$ , (b) função periódica de amplitude  $E_{sw}$ , (c) função resultante da sobreposição de (a) e (b).



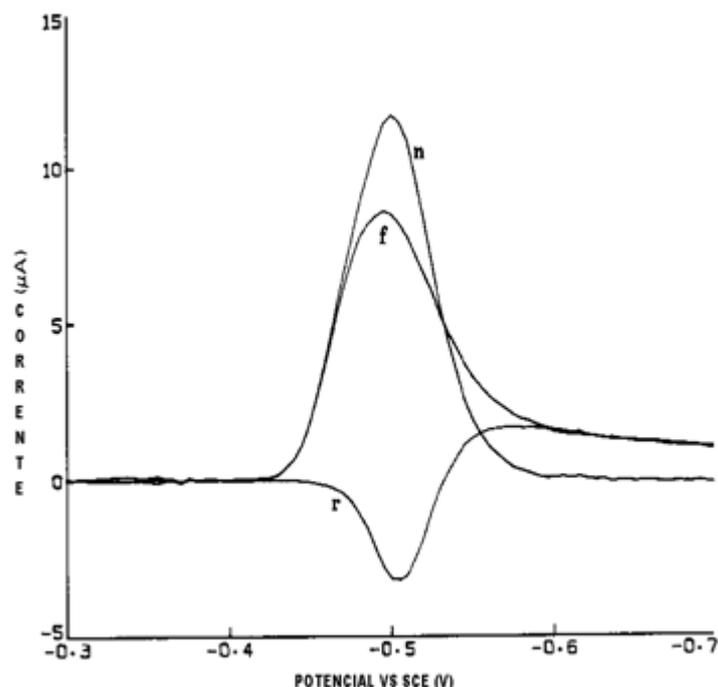
Fonte: (Souza et al. 2004).

Onde  $E_{sw}$  é a amplitude do pico de potencial,  $\tau$  o período (se mantém constante),  $\Delta E_s + E_{sw}$  a altura do pico e  $E_s$  o incremento de varredura. No voltamograma ilustrado, os valores de  $E_s$  e  $E_{sw}$  são de  $10 / n$  mV e  $50 / n$  mV para  $\tau = 10$  ms, em que  $n$  é o número de elétrons transferidos. Neste sentido a corrente  $I$  será aferida como função do potencial que será aplicado, determinando as correntes direta, inversa e resultante; como mostrado na Equação 1 (Souza et al. 2004).

$$\text{Equação 1} \quad I_{\text{resultante}} = I_{\text{direta}} - I_{\text{reversa}}$$

Na Figura 6 têm-se a representação de um voltamograma de onda quadrada que evidencia os parâmetros de onda descritos acima. No esquema,  $n$  representa a corrente resultante,  $f$  a corrente direta e  $r$  a corrente reversa.

Figura 6 Representação esquemática de um voltamograma de onda quadrada, em que  $n$  representa a corrente resultante,  $f$  a direta e  $r$  a reversa.



Fonte: (Souza *et al.* 2004).

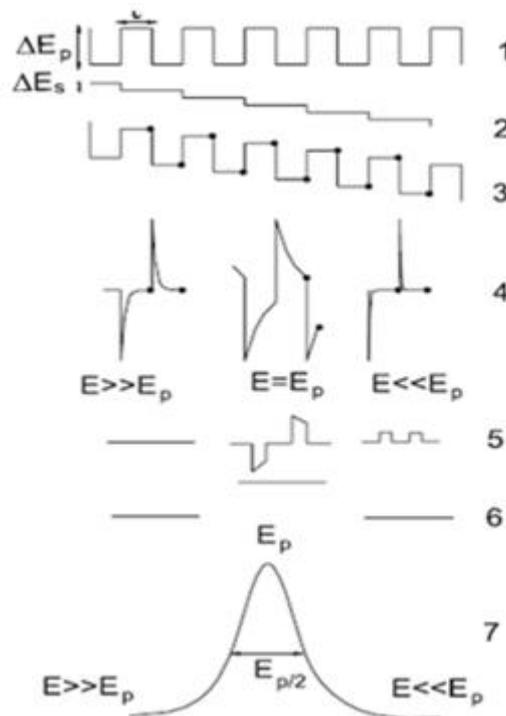
O uso de voltametria de onda quadrada teve início em 1957 com os estudos de Baker, todavia seu uso ainda era limitado pela tecnologia eletrônica ainda arraigada. Com os progressos analógicos e digitais, a técnica passou a ser incorporada a polarógrafos, em varreduras rápidas, podendo até mesmo modelar sistemas irreversíveis ou que fossem relacionados a processos de transferência de elétrons (Souza *et al.* 2004; Manoel 1922).

Apesar de ter início tão tardio, a técnica começou a ser estudada em 1922 por Heyrovsky e Kuceras, onde fizeram uso de um eletrodo gotejante de mercúrio, como o de trabalho e um eletrodo de calomelano saturado, como o de referência. A primeira curva obtida, corrente vs voltagem foi chamada de polarograma por ter sido desenvolvida em polarografia (Manoel 1922). Após os estudos e aperfeiçoamentos feitos por Barker, durante longos 15 anos, poucos trabalhos, a respeito da técnica de polarografia de onda quadrada, foram publicados. Com o passar dos anos a técnica foi sendo aprimorada e aperfeiçoada, como por exemplo os trabalhos realizados por Ramaley e Krause, em 1969. Eles conseguiram eliminar a influência dos ruídos intensificados pelo uso de capilares de mercúrio, na técnica. Também trabalharam na substituição da rampa linear de potencial por uma variação em forma de escada.

A partir de então, surgiu a atual técnica voltamétrica de onda quadrada, que utiliza a variação do potencial em forma de onda aliada à rampa potencial em forma de escada, gerando ao final do processo, um pico simétrico que é utilizado em determinações analíticas, como por exemplo, a concentração do analito que está sendo investigado (Souza *et al.* 2004).

Na Figura 7 têm-se a representação do processo que ocorre em SWV na técnica proposta por Ramaley e Krause. Indicados têm-se: em 1, o potencial aplicado em forma de onda quadrada; em 2, a variação do potencial aplicado em forma de escada; em 3, o potencial de onda quadrada acrescido à variação em forma de escada; em 4, a resultante de corrente de onda, em que  $E \ll E_p$  refere-se a potenciais menos negativos que o de pico,  $E = E_p$  ao potencial de pico e  $E \gg E_p$ , a potenciais mais negativos que o de pico; em 5, as medidas de corrente referentes aos momentos antes do pico, no pico e após o pico; em 6, a corrente diferencial e finalmente em 7, a corrente total derivada (Souza *et al.* 2004).

Figura 7 Processos ocorridos na voltametria de onda quadrada, segundo Ramaley e Krause. Numerados: 1) potencial em forma de onda; 2) escada de potencial; 3) aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total.



Fonte: (Souza *et al.* 2003).

Tal estudo ainda possuía uma pequena limitação, em que as correntes eram medidas próximas ao centro de pulso e as varreduras limitadas a pequenos valores de amplitude e baixas velocidades de varredura, o que provocava perda de sensibilidade. Em 1977 tais limitações foram sanadas. A partir dos estudos de Christie, Turner e Osteryoung, que chegaram ao modelo atual da SWV, foi possível que as medidas de corrente fossem realizadas a velocidades de varredura maiores que  $100 \text{ mV s}^{-1}$  e ao final do pulso de potencial, onde já acontece a minimização da corrente capacitiva. A descoberta facilitou a melhoria da sensibilidade da técnica, tornando-a favorável para aplicações eletroanalíticas (Souza *et al.* 2003).

A técnica atualmente se baseia em curva resultante determinada por corrente-potencial proveniente da aplicação de potencial de altura (determinado pela amplitude do pulso de potencial a que for sofrer), variando com a escada de potencial aplicada à largura  $a$ , e à duração do experimento. A corrente resultante dos pulsos diretos e reversos, é obtido segundo a intensidade ao final dos pulsos. A curva obtida ao final do experimento em SWV possui alta definição e simetria, uma vez que as correntes são estabilizadas ao final de cada pulso e as variações de largura e altura, se mantém sempre constantes (Souza *et al.* 2003).

Uma pequena desvantagem da técnica é a sensibilidade à corrente capacitiva que constitui a corrente residual. A corrente surge devido à formação da dupla camada elétrica, ou seja, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho adquire uma carga devido ao carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica. Neste sentido, na SWV a cada etapa de aplicação de potencial ao eletrodo, haverá o carregamento e descarregamento da dupla camada, que desenvolverá uma corrente chamada de corrente capacitiva. Outra corrente de fundo de voltamogramas é a faradaica, que é proveniente de impurezas presentes no eletrólito de suporte ou em outros reagentes. No caso, o oxigênio dissolvido também formará corrente faradaica, mas no presente trabalho, foi usado eletrodo de diamante dopado com boro, que não é sensível ao oxigênio dissolvido no seio da solução. Logo, não se fez necessário a deaeração do sistema. Caso o analista trabalhe com reagentes mais puros e realize a deaeração, quando necessário, a corrente faradaica relacionada ao oxigênio dissolvido será reduzida, tornando-se irrelevante na resposta final de corrente de pico da curva resultante. Logo, sabe-se que a única corrente de fundo que prejudica na sensibilidade da técnica, é a corrente capacitiva (Manoel 1922).

Como mencionado, através do voltamograma de onda quadrada resultante, é possível se obter relações lineares entre a corrente de pico ( $I_p$ ) vs a concentração da espécie eletroativa que está sendo investigada. Tal linearidade pode ser observada segundo a Equação 2.

$$\text{Equação 2} \quad \Delta I_p = 0,928 n F A C (2 D_r / \pi \tau)^{\frac{1}{2}}$$

Onde:

$\Delta I_p$  – Variação da corrente de pico;

$n$  - Número de elétrons;

$A$  – Área do eletrodo;

$F$  – Constante de Faraday;

$D_r$  – Coeficiente de difusão;

$\tau$  - Período;

$C$  – Concentração da espécie eletroativa no seio da solução.

A corrente resultante é inversamente proporcional ao período, logo, com a diminuição deste tende-se a ter um aumento da sensibilidade.

A vantagem mais atrativa da técnica de SWV é referente à sua alta velocidade na realização de leitura de pico dos voltamogramas. Os parâmetros recém definidos pelo analista, são dados por  $f$  (frequência de onda quadrada, em Hz),  $E_s$  (incremento de varredura, em mV) e  $E_{sw}$  (amplitude de onda quadrada, em mV) (Souza *et al.* 2004).

Dentre tantas vantagens apresentadas pela SWV, podemos também destacar o fato não apresentar leitura de interferentes provindos da corrente capacitiva, uma vez que as correntes são aferidas ao final do degrau de potencial onde a corrente capacitiva já é irrelevante na leitura do pico, o que melhora a resolução da curva, aumenta a sensibilidade e diminui o tempo de análise, que é realizada em altas velocidades de varredura. Também podemos citar o fato das análises de corrente direta e reversa serem capazes de fornecer dados a respeito da cinética e mecanística do processo, em alta sensibilidade e resolução devido, também, à diminuição do sinal de corrente capacitiva (Souza *et al.* 2004).

Na presente dissertação, foi empregada a voltametria de onda quadrada juntamente com o eletrodo de diamante dopado com boro para quantificar losartana, captopril e alisquireno em formulações comerciais e em plasma humano.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral da presente dissertação é o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica visando quantificar Captopril, Alisquireno e Losartana em amostras de formulações comerciais e em fluidos biológicos.

Neste contexto, estamos propondo empregar o eletrodo de diamante dopado com boro na eletroanálise dos fármacos.

*Os objetivos específicos são:*

Analisar a influência de variáveis como pH do meio, eletrólito de suporte, nível de dopagem dos DDBs sobre a eletroatividade dos fármacos propostos. A influência de variáveis como a velocidade de varredura, frequência, amplitude e incremento de varredura de potenciais serão variados visando aumentar consideravelmente a detectabilidade para o emprego desejado.

## **CAPÍTULO 3**

### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Padrões analíticos dos fármacos: Todos os reagentes usados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas em água ultrapura empregando um sistema Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore. Os padrões analíticos dos fármacos empregados foram fornecidos pela Novartis (Alisquireno; 99,8 %) e Sigma-Aldrich (Losartana; 99,8% e Captopril 99,9%).

Eletrólito de suporte: O eletrólito de suporte empregado foi o tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 M. A resposta eletroquímica dos fármacos tanto em formulações comerciais quanto em fluidos biológicos (plasma) foi avaliada entre os valores de pH de 2,0 a 12,0; visando obter a maior corrente de pico. Os pH's foram ajustados a cada unidade com adição de pequenos volumes de uma solução de NaOH a 4 mol/L.

Análise em formulações comerciais: Para as análises em formulações comerciais, os comprimidos de cada fármaco foram pulverizados em almofariz com auxílio de um pistilo, até obtenção de um pó ultrafino. Em seguida, as soluções estoques foram preparadas com os padrões analíticos para a obtenção das curvas analíticas. As determinações dos teores dos fármacos nas formulações comerciais foram avaliadas através de dissolução do sólido, em quantidade apropriada, em água purificada pelo sistema MilliQ empregando o método da adição de padrão.

Soro humano: O soro humano foi recolhido, a partir da própria autora da presente dissertação, em tubos de coleta contendo citrato de sódio (agente anticoagulante) e, subsequentemente, centrifugados a 3.500 rpm durante 10 minutos para se obter o plasma. Um volume de plasma foi tomado e adicionado ao eletrólito de suporte nos devidos pH's para atingir o volume total de 9,0 mL e 5,0 mL, para alisquireno e captopril; respectivamente. Volumes das alíquotas das amostras de soro foram misturados com alisquireno e captopril em tampão BR para manter uma concentração de 9,0 mg L<sup>-1</sup> ( $1,63 \times 10^{-5}$  M) e de 32,14 mg L<sup>-1</sup> ( $1,48 \times 10^{-4}$  M),

respectivamente. Devido a vários fatores, os testes em plasma foram realizados apenas com captopril e alisquireno.

### 3.2 EQUIPAMENTOS

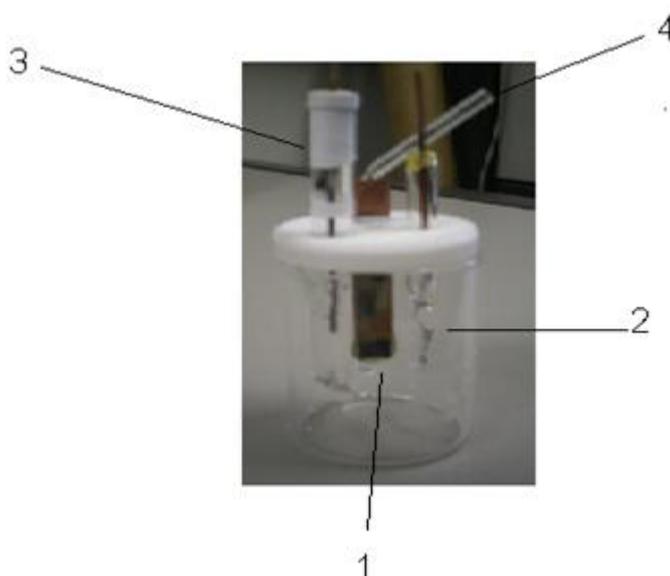
Os experimentos eletroquímicos em questão, foram realizados utilizando um instrumento eletroquímico de potenciostato EMSTAT3+ interfaceado a um microcomputador pessoal através do Software PSTtrace 4.6.

### 3.3 CÉLULA ELETROQUÍMICA

Os fármacos foram analisados utilizando-se uma célula eletroquímica de vidro Pyrex<sup>®</sup> com um compartimento de capacidade de 10 mL, dotada de tampa de Teflon<sup>®</sup> com orifícios para os três eletrodos e um orifício específico para entrada e saída de gás, bem como das adições dos padrões dos fármacos.

A Figura 8 mostra a célula utilizada neste trabalho, com os três eletrodos inseridos na solução, e o orifício de entrada de analitos.

Figura 8 Célula eletroquímica utilizada nos experimentos eletroquímicos para a determinação dos fármacos. Indicados têm-se: 1 – Eletrodo de trabalho (DDB), 2 – Contra-eletrodo (placa de Pt), 3 – Eletrodo de referência (Ag /AgCl) e 4- Entrada e saída de gás e adição de soluções padrões dos analitos.



Fonte: Dos autores (2016).

### 3.4 ELETRODOS

#### 3.4.1 Eletrodo de trabalho

O eletrodo de diamante dopado com boro empregado foi adquirido do Centro Suíço de Eletroquímica e Microtécnica AS (CSEM), Neuchâtel, Suíça, cujo nível de dopagem foi 8000 ppm. O DDB foi confeccionado por meio de uma placa de DDB de área geométrica de  $0.09 \text{ cm}^2$ . Esta placa foi colada com tinta prata na superfície de uma placa de cobre texturizado que, posteriormente foi recoberta com resina epóxi. O eletrodo de diamante dopado com boro utilizado é mostrado na Figura 9.

O eletrodo de DDB sofreu pré-tratamento em  $-3,0$  e  $3,0$  Volts durante 300 segundos, numa solução de  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Figura 9 Eletrodo de diamante dopado com boro (8.000 ppm) utilizado para a determinação eletroquímica de alisquireno, captopril e losartana, em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas.



Fonte: Dos autores (2016).

#### 3.4.2 Eletrodo de referência

Como eletrodo de referência, foi utilizado o eletrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  ( $\text{KCl } 3,0 \text{ M}$ ), confeccionado no próprio laboratório Figura 8 (em 3).

### 3.4.3 Contra-eletrodo

Como contra eletrodo, utilizou-se uma placa de Pt de 2,0 cm<sup>2</sup> de área geométrica, conforme observado na Figura 8 (em 2).

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

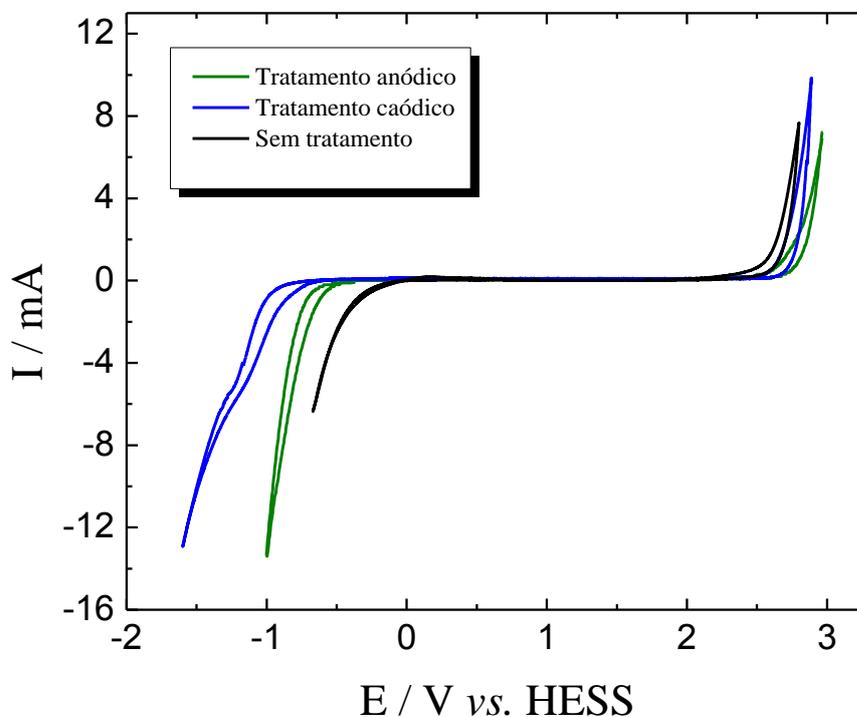
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Pré-tratamentos anódicos ou catódicos sobre o DDB podem aumentar consideravelmente a resposta eletroquímica para um dado analito. Também é importante salientar que, por meio destes pré-tratamentos pode-se ampliar as janelas eletroquímicas tanto no sentido positivo quanto negativo de potenciais. Visando investigar a influência destes pré-tratamentos sobre a janela eletroquímica, foram realizados os tratamentos catódico, anódico e térmico sobre os DDBs empregados na presente dissertação. A polarização do eletrodo de DDB provoca uma modificação na superfície do mesmo, uma vez que, no caso do tratamento catódico, a superfície do eletrodo apresenta terminações de hidrogênio, e no caso do tratamento anódico terminações de oxigênio (Einaga *et al.* 2014; Melorose *et al.* 2015).

Deste modo, foi estudado o comportamento eletroquímico dos eletrodos de diamante dopado com boro, empregando a voltametria cíclica, em meio de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ). Sendo assim, foram realizados pré-tratamentos por meio de polarizações catódicas e anódicas em meio de  $\text{HClO}_4$  (0,5 M em -3,0 V e +3,0 V (vs HESS), durante 300 segundos cada. A Figura 10 mostra os voltamogramas do eletrodo de diamante dopado com boro após os pré-tratamentos anódico, catódico e térmico em meio  $\text{HClO}_4$  (0,5 M).

Figura 10 Efeito do tipo de pré-tratamento realizado, na janela eletroquímica de potencial apresentada por eletrodos de DDB com 8000 ppm de boro em uma solução aquosa 0,5 M de  $\text{HClO}_4$  registradas a  $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . As voltametrias cíclicas foram realizadas sobre um eletrodo como recebido, e sobre amostras depois de 30 min de pré-tratamentos: anódico (3,0 V) e catódico (-3,0 V).



Fonte: Dos autores (2016).

Embora tenha apresentado uma redução na janela eletroquímica no sentido anódico, a polarização catódica se fez necessária para o condicionamento de superfície do DDB antes das determinações eletroanalíticas. Tal pré-tratamento melhorou significativamente a resposta voltamétrica do DDB frente aos analitos investigados, resultando em baixos limites de detecção e quantificação. Antes da realização do estudo voltamétrico dos fármacos, os DDB's foram submetidos ao tratamento anódico já mencionado, visando deslocar a reação de desprendimento de oxigênio (RDO) para valores mais positivos, uma vez que a eletroxidação dos fármacos se apresentaram em potenciais próximos RDO. Na Figura 10, pode-se observar que há uma expansão da janela anódica de potenciais à medida que o eletrodo de diamante dopado com boro (sem tratamento térmico) recebe um tratamento anódico em +3,0 V (vs HESS). A expansão observada foi da ordem de 400 mV em relação ao DDB tratado catódicamente e de aproximadamente 600 mV em relação ao DDB tratado termicamente. Na polarização catódica observou-se uma

diminuição da janela catódica em aproximadamente 700 mV em comparação com o eletrodo tratado anódicamente, e 400 mV em comparação com os eletrodos tratados termicamente e sem pré-tratamento. Todavia, mesmo obtendo uma janela eletroquímica mais vasta, descartamos o uso do tratamento anódico em virtude de sua reprodutibilidade.

Após estipulado o melhor tratamento para os analitos de interesse, o eletrodo de DDB sofreu tratamento catódico em -3,0 V por 300 segundos, já no eletrodo de suporte escolhido. As polarizações realizadas também serviram para limpeza do eletrodo, eliminando substâncias adsorvidas sobre a superfície do eletrodo.

## 4.2 ESTUDO DA ELETROATIVIDADE EM FUNÇÃO pH E ELETROLITO DE SUPORTE

A eletroatividade dos fármacos sobre o DDB foi avaliada por meio da técnica de voltametria cíclica. Neste sentido, foi possível avaliar a reversibilidade dos processos eletroquímicos, no que tange a investigação dos processos de oxidação do alisquireno, captopril e losartana.

Neste sentido, a primeira etapa da otimização dos estudos voltamétricos, foi buscar pelo melhor eletrólito de suporte que resultaria nos maiores picos de corrente, bem definidos e reprodutíveis. Foram testados pH's de 2,0 a 12,0 empregando-se os tampões: Britton-Robbinson (tampão BR), Tris-HCl e fosfato. O tampão escolhido foi o Britton-Robbinson (tampão BR), por apresentar voltamogramas com melhor resolução e sem ruídos nas faixas de potenciais de interesse. Os perfis voltamétricos mostrados nas Figuras 11, 12 e 13; revelam picos de oxidação irreversíveis e bem definidos para os três fármacos, baseados nos dados de corrente de pico apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5, empregando o DDB.

Os estudos voltamétricos preliminares dos fármacos foram realizados sobre o tampão BR levando-se em consideração o pH ótimo para cada fármaco, visando obter um pico máximo de corrente.

### 4.2.1 Captopril

Para o captopril, foram avaliados os pH's de 2,0 a 12,0, segundo a Tabela 2, há uma variação significativa de corrente de pico a cada mudança de pH. Para tais

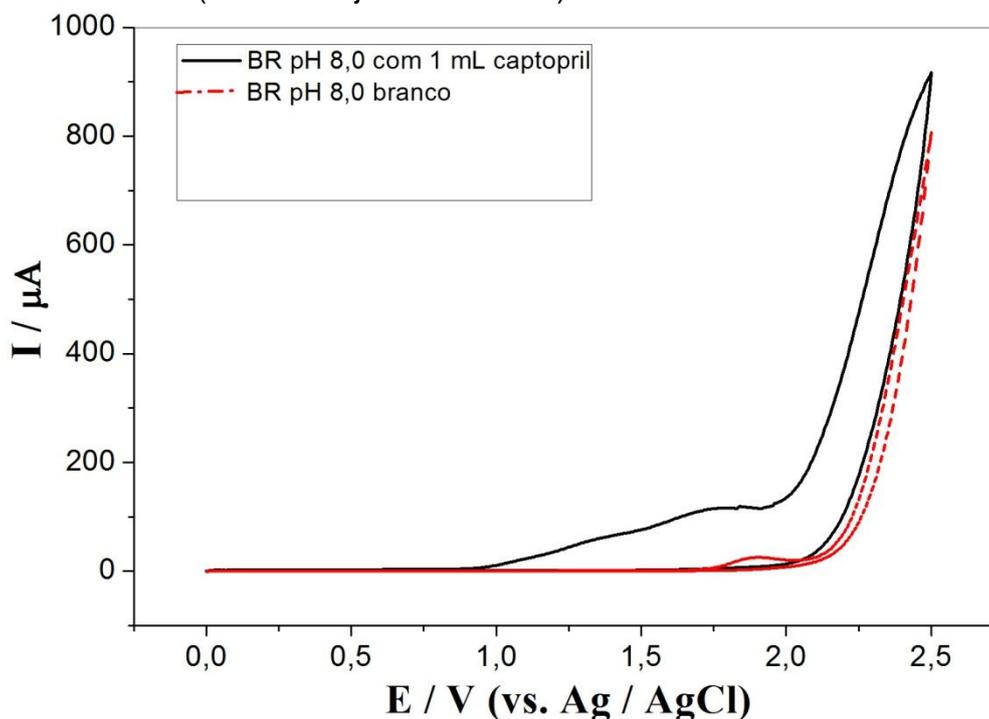
análises, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, empregando-se uma solução de captopril  $18,2 \text{ mg L}^{-1}$  em meio de tampão BR.

Tabela 2 Variação dos pH's de estudo em captopril  $18,2 \text{ mg L}^{-1}$ , segundo sua respectiva corrente de pico.

pH do tampão BR	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )
2,0	65,87
3,0	81,60
4,0	79,08
5,0	136,43
6,0	116,63
7,0	136,30
8,0	241,96
9,0	231,53
10,0	236,14
11,0	226,84
12,0	236,74

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 11 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica do Captopril ( $18,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada vermelha).



Fonte: Dos autores (2016).

A Tabela 2 apresenta a variação das correntes de pico versus pH, onde pode-se observar que a maior corrente de pico se deu em pH 8,0. A Figura 11 mostra o voltamograma cíclico do captopril em pH 8,0, onde percebe-se um pico bem definido e irreversível de corrente em 1,6 V (vs. Ag/AgCl).

#### 4.2.2 Alisquireno

No caso do alisquireno, os mesmos valores de pH foram avaliados, sendo que o máximo da corrente de pico também se deu no pH 8,0. Na Tabela 3 estão apresentados os dados de corrente de pico obtidos a cada voltamograma. Aqui também se observou que houve um aumento da corrente de pico acompanhado do aumento dos valores de pHs, sendo que a maior corrente de pico foi observada em pH 8,0.

Para analisar as correntes de pico de alisquireno em função do pH, utilizou-se uma solução de alisquireno cuja concentração final foi de  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que foi adicionada à célula, 1 mL do fármaco a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e 10 mL do respectivo tampão.

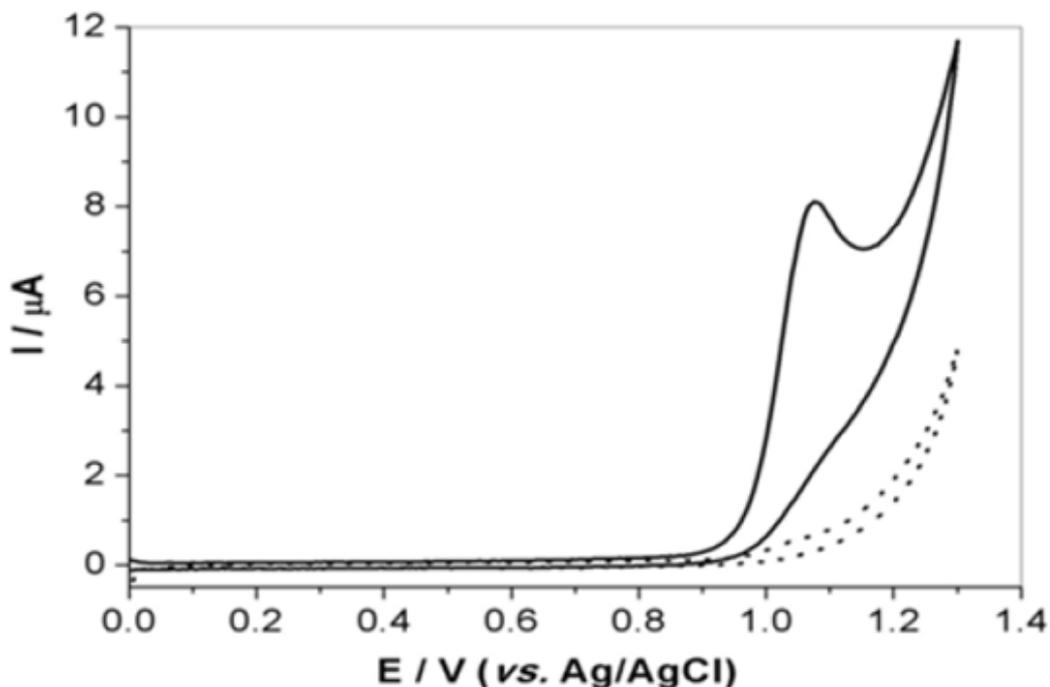
Tabela 3 Variação dos pH's de estudo em alisquireno 4,5 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

pH do tampão BR	I <sub>p</sub> (μA)
2,0	2,98
3,0	3,52
4,0	4,24
5,0	6,93
6,0	5,98
7,0	7,82
8,0	8,54
9,0	7,38
10,0	8,02
11,0	5,76
12,0	3,45

Fonte: Dos autores (2016).

A Figura 12 apresenta o perfil voltamétrico do alisquireno em meio de tampão BR (0,04 M) pH 8,0 sobre o DDB. A oxidação do alisquireno apresentou um pico irreversível e bem definido em 1,1 V (vs. Ag/AgCl). É importante salientar que, na eletroanálise do alisquireno, o DDB empregado também foi submetido ao tratamento catódico previamente descrito.

Figura 12 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de alisquireno ( $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada).



Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.2.3 Losartana

Para a losartana, o pH ideal foi mais alcalino do que para os demais fármacos, sendo este o pH 10,0. A Tabela 4 apresenta as correntes de pico, obtidas por meio de voltametria cíclica, em função do pH para o fármaco em questão. A concentração da losartana, em meio de tampão BR, empregada nos experimentos foi  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ , uma vez que foi adicionado à célula eletroquímica, inicialmente, 1 mL do fármaco a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  em 10 mL de seu respectivo tampão.

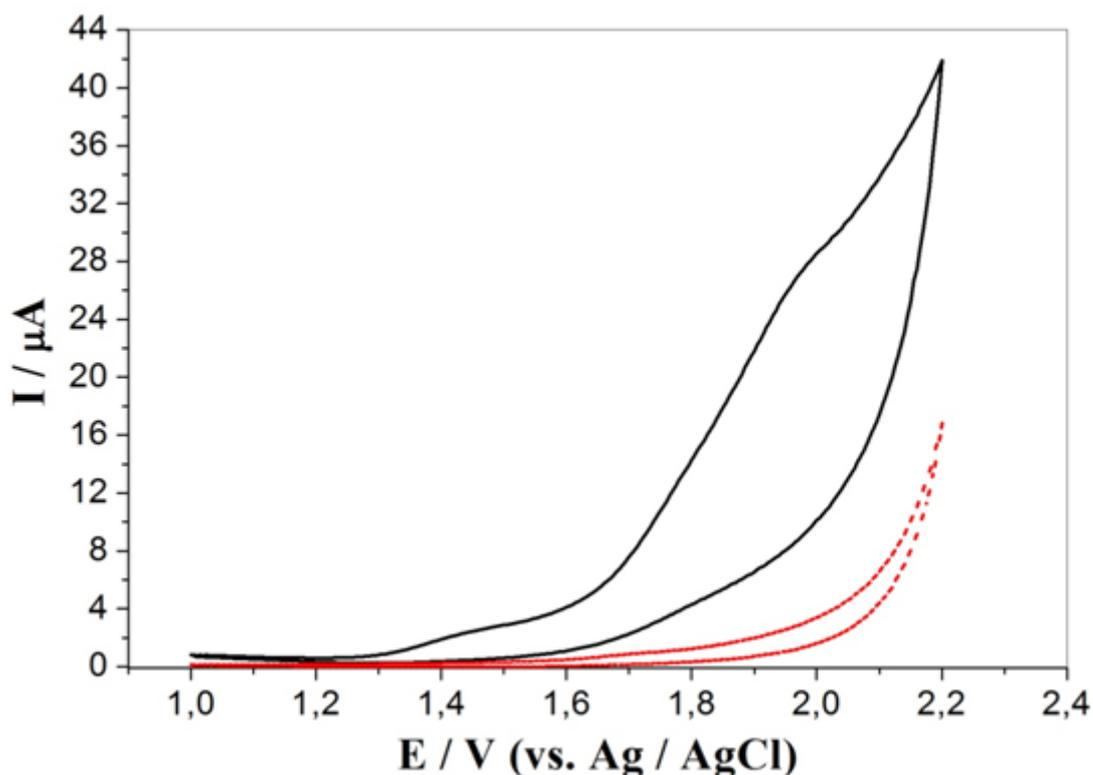
Tabela 4 Variação dos pH's de estudo em losartana 45,5 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

pH do tampão BR	Ip (µA)
2,0	17,06
3,0	14,32
4,0	16,05
5,0	17,74
6,0	17,60
7,0	17,83
8,0	11,98
9,0	17,61
10,0	22,04
11,0	21,58
12,0	19,32

Fonte: Dos autores (2016).

O perfil voltamétrico da losartana, apresentado na Figura 13, mostra dois picos, um menos intenso em aproximadamente 1,4 V e um outro mais intenso e bem definido em 1,8 V (vs. Ag/AgCl). Para fins de quantificação do fármaco em formulações comerciais, optou-se pela escolha do pico mais intenso e bem definido, ou seja, em 1,8 V (vs. Ag/AgCl).

Figura 13 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica para a Losartana ( $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 10,00) (linha sólida) e para o eletrodo de DDB (linha tracejada).



Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.3 VELOCIDADE DE VARREDURA

Os processos eletroquímicos, referentes às oxidações dos fármacos investigados, foram avaliados por meio da variação da velocidade de varredura. Deste modo, sabe-se que a oxidação dos fármacos sobre o DDB é caracterizada pela presença do pico a 1,1 V (vs. Ag / AgCl) para alisquireno; 1,6 V para captopril e 1,8 V para losartana. As velocidades de varredura foram variadas entre 0,05-0,25  $\text{V s}^{-1}$  na sobre o DDB, foi investigada empregando-se soluções de alisquireno, captopril e losartana; em meio de tampão BR no pH ótimo para fármaco.

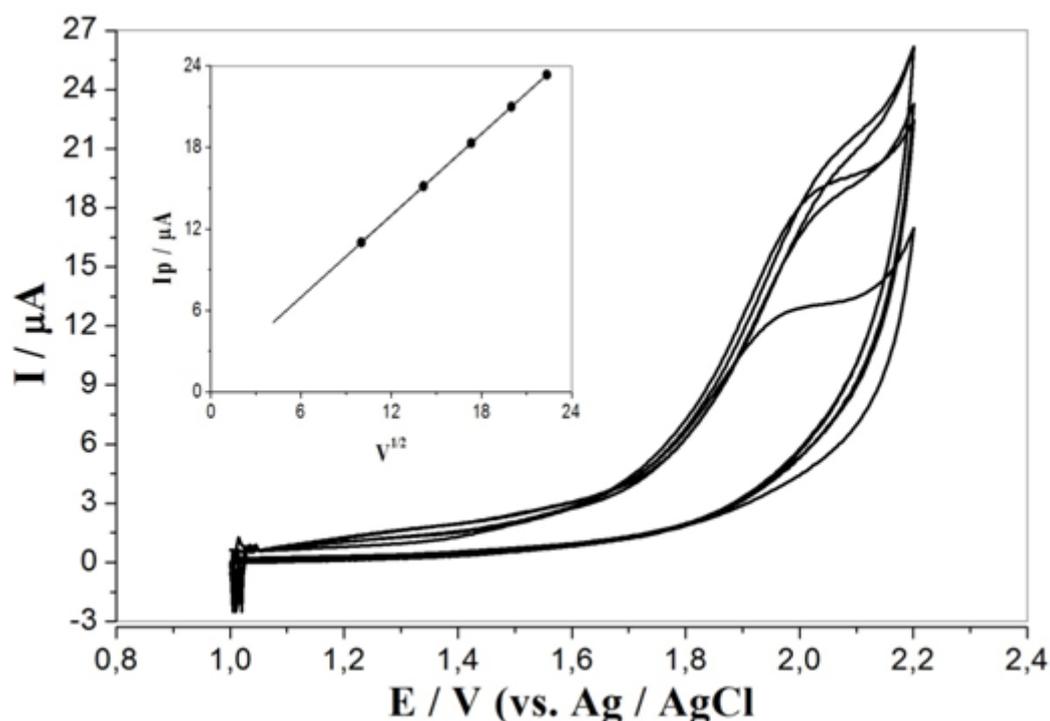
O estudo realizado através da variação da velocidade de varredura, também nos fornece importantes informações a respeito da reversibilidade do processo oxidativo. Se o processo for reversível, o potencial de oxiredução independe da velocidade de varredura por não haver nenhuma contribuição cinética. Já para processos irreversíveis, o potencial de pico é diretamente proporcional à velocidade de varredura, o que comprova que alisquireno, losartana e captopril, seguem

processos irreversíveis, uma vez que os potenciais de picos de cada um dependem fortemente da velocidade de varredura aplicada no sistema e que não apresentam picos na varredura reversa (Manoel 1922; Perez *et al.* 2015; Souza *et al.* 2003).

### 4.3.1 Captopril

Para captopril, foi utilizada uma solução estoque de concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>, com concentração final de 18,2 mg L<sup>-1</sup>, onde a velocidade de varredura foi variada de 100 a 500 mV s<sup>-1</sup>, onde obtivemos como resposta, um gráfico linear que mostra a dependência do potencial de pico à variação da raiz quadrada da velocidade de varredura, como mostrado na Figura 14.

Figura 14 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de captopril sobre um eletrodo de DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) contendo de captopril (18,2 mgL<sup>-1</sup>) em diferentes velocidades de varredura: 100, 200, 300, 400 e 500 mV s<sup>-1</sup>. Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.

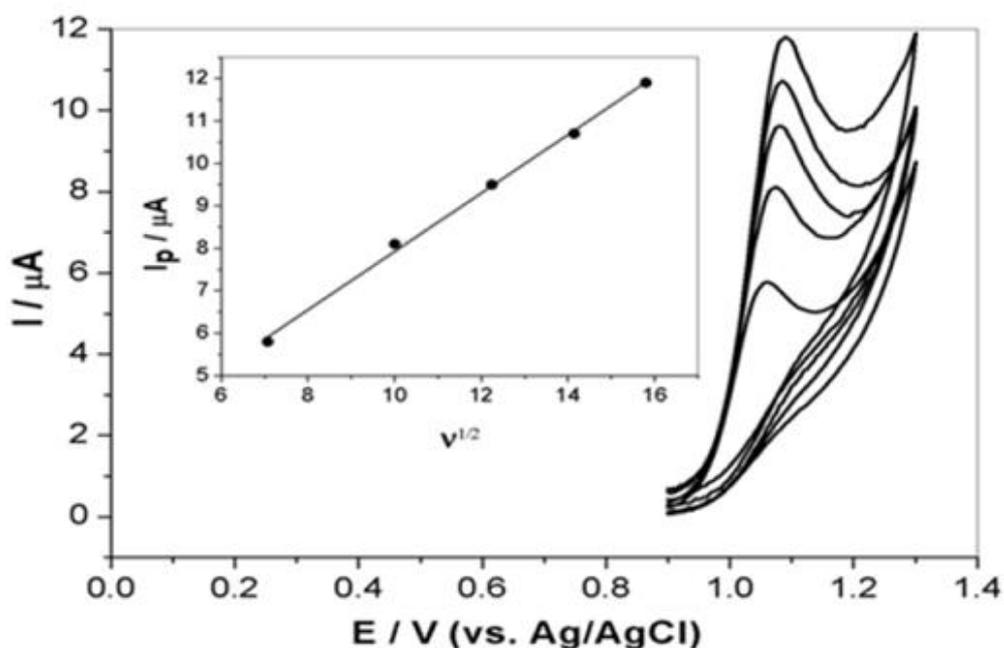


Fonte: Dos autores (2016).

### 4.3.2 Alisquireno

Ao investigar o processo de regulação da oxidação de alisquireno segundo a variação da velocidade de varredura, utilizamos uma solução estoque do fármaco em concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com concentração final de  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ , em que a velocidade foi variada de  $50$  a  $250 \text{ mV s}^{-1}$ . O alisquireno também apresentou uma relação linear entre corrente versus a raiz quadrada da velocidade de varredura, como mostrado na Figura 15.

Figura 15 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica de alisquireno sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 8,0) contendo  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$  de alisquireno em diferentes velocidades de varredura :  $50$ ,  $100$ ,  $150$ ,  $200$  e  $250 \text{ mV s}^{-1}$ . Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.



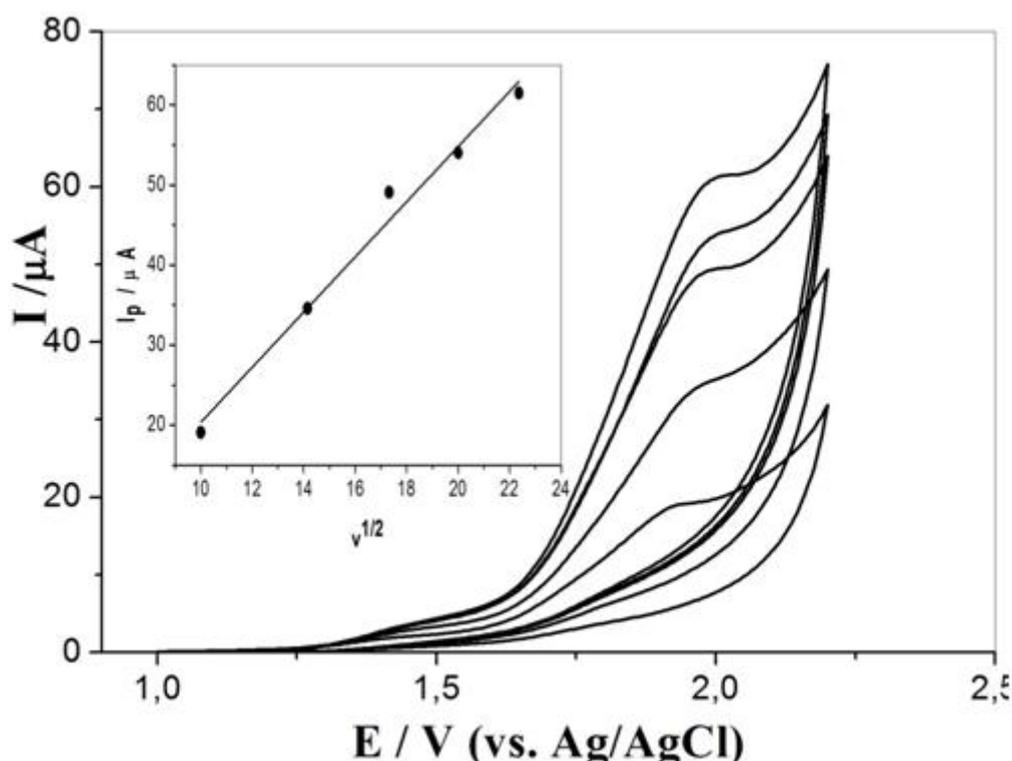
Fonte: Dos autores (2016).

### 4.3.3 Losartana

Para investigar a dependência do potencial de pico à variação da velocidade de varredura da losartana, fizemos uso de uma solução estoque do fármaco a uma concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e concentração final de  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ . No caso da losartana, a velocidade de varredura foi variada de  $100$  a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Um gráfico foi

traçado no intuito de mostrar também a relação de linearidade entre a corrente de pico de oxidação da losartana, com a raiz quadrada da velocidade de varredura, como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 Voltamogramas cíclicos de oxidação eletroquímica da losartana sobre um eletrodo DDB em meio de tampão BR (pH 10,01) contendo  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$  de losartana em diferentes velocidades de varredura : 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ . Detalhe: relação linear entre corrente de pico vs  $v^{1/2}$  observado nas mesmas condições experimentais.



Fonte: Dos autores (2016).

Ao observar as Figuras 14, 15 e 16, nota-se que os potenciais de oxidação dos três fármacos se deslocam para valores mais positivos segundo o aumento da velocidade de varredura. Os voltamogramas apresentados nas Figuras 14, 15 e 16 indicam que os três fármacos, apresentaram processos irreversíveis nas oxidações.

A dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura apresentou relação linear para os três fármacos, com coeficientes de correlação ( $r$ ) de 0,998 para captopril, 0,989 para alisquireno e 0,980 para losartana, indicando que os processos de oxidações sofridos pelos fármacos são controlados por difusão.

#### 4.4 VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA - FREQUÊNCIA DE APLICAÇÃO DOS PULSOS DE POTENCIAL

A voltametria de onda quadrada foi empregada no estudo da quantificação dos fármacos captopril, losartana e alisquireno em formulações comerciais e em fluidos biológicos. Deste modo, a otimização do processo analítico, com o objetivo de obter o sinal analítico máximo e sensível, envolveu um estudo sistemático dos parâmetros experimentais que afetam a resposta dos voltamogramas de onda quadrada, ou seja, a frequência ( $f$ ), a amplitude do pulso ( $E_{WS}$ ) e o incremento de varredura ( $ES$ ). Neste sentido, os parâmetros de onda quadrada para os fármacos, foram investigados de acordo com os estudos previamente realizados, ou seja, empregando-se o melhor meio eletrolítico (tampão) e pH, visando uma resposta eletroquímica ótima. Com o eletrodo de DDB tratado catódicamente, realizamos testes referentes à frequência, fixando os demais parâmetros; o mesmo foi feito com relação a amplitude de potenciais.

O parâmetro equivalente à velocidade de varredura da voltametria cíclica, na voltametria de onda quadrada (SWV), é a frequência de aplicação dos pulsos,  $f$ . A otimização deste parâmetro é de fundamental importância pois, para a maioria dos processos eletródicos, a corrente de pico é diretamente proporcional ao seu valor. Assim, com a maximização do valor de  $f$ , aumenta-se, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica experimental.

A frequência de aplicação de pulsos em onda quadrada determina a quantidade de pulsos de potencial que serão aplicados no eletrodo de trabalho, a cada segundo, bem como a intensidade dos sinais analíticos e, por conseguinte, a sensibilidade da técnica. Segundo Souza (*et al.* 2003), algumas preciosas informações a respeito do processo redox, podem ser obtidos através de estudos da influência da frequência de pulsos. A linearidade da corrente de pico e a frequência de pulsos nos fornecem informações a respeito do grau de reversibilidade da reação redox e se existem espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. As correntes de pico em função da frequência de pulsos para sistemas irreversíveis são de até cinco vezes menor que as correntes de pico obtidas pelas mesmas frequências, em processos reversíveis. Isto se deve ao fato de a corrente reversa fornecer uma menor contribuição ao valor da corrente resultante coincidente com o da corrente

direta (Manoel 1922; Perdew *et al.* 1996; Electrochemistry 2000; Bard *et al.* 1944; Souza *et al.* 2003).

Para os fármacos aqui estudados, avaliou-se que a corrente de pico varia linearmente com a frequência, o que mostram as Figuras 17, 19 e 21, demonstrando se tratar de um processo irreversível controlado por difusão. Na técnica de SWV, observou-se que conforme a frequência aumenta, temos também um aumento da corrente anódica, todavia, cada fármaco apresenta um valor de frequência ótimo. A frequência apresenta um comportamento linear com a corrente de pico ( $I_p$ ) até 100 Hz para os três fármacos, enquanto que para valores superiores ao citado, não se observa nenhuma contribuição na resposta eletroanalítica.

Em frequências mais altas, foram observados alargamentos e distorções dos voltamogramas, podendo resultar em redução nas resoluções dos picos. Neste sentido, a melhor frequência, para cada fármaco, foi determinada, seguindo a melhor resposta eletroquímica para cada um. Os voltamogramas representativos de cada fármaco indicam que o pico de corrente obtido em cada um, é uma função linear da frequência. De acordo com as teorias aceitas para SWV, este comportamento corresponde a um processo totalmente irreversível.

À medida que se aumenta a frequência de aplicação dos pulsos de potencial, obtém-se um aumento no sinal de corrente para processos controlados por difusão, uma vez que com o aumento da frequência, mais espécies do analito podem sofrer a reação de oxidação na superfície do eletrodo, o que amplifica a sensibilidade da técnica. Ao contrário, no entanto, ocorreu com o captopril. Este necessitou de uma frequência mínima na otimização de seus parâmetros, fornecendo voltamogramas com melhor resolução.

#### **4.4.1 Captopril**

Para avaliar a frequência ótima referente ao captopril, fixou-se a amplitude em 50 mV. Uma solução estoque de concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>, com concentração final de 18,2 mg L<sup>-1</sup>, foi empregada nas análises. Por meio dos voltamogramas de onda quadrada pode-se observar que há uma relação linear entre  $I_p$  vs. Frequência até 40 Hz. Todavia, para captopril, para fins analíticos, foi escolhida a frequência de 10 Hz (Figura 17), a qual levou aos melhores resultados referente a quantificação do

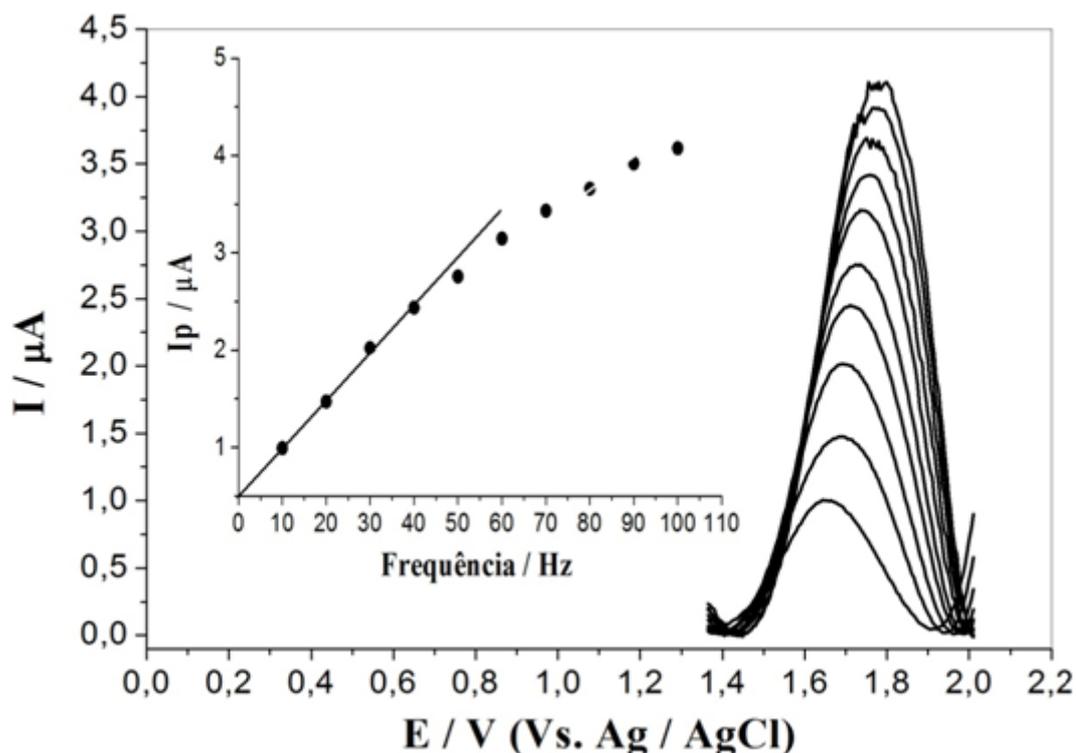
fármaco. Na Tabela 5, constam as informações acerca da corrente de pico obtida, após tratamento dos dados, a cada variação de frequência, sofrida durante a análise do fármaco.

Tabela 5 Variação da frequência de pulsos, de estudo em captopril 18,2 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

Frequência (Hz)	I <sub>p</sub> (μA)
10,0	0,993
20,0	1,470
30,0	2,021
40,0	2,437
50,0	2,756
60,0	3,147
70,0	3,433
80,0	3,660
90,0	3,920
100,0	4,077

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 17 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de captopril a  $18,2 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 8,0. Frequência ótima – 10,0 Hz.



Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.4.2 Alisquireno

Para o alisquireno, a amplitude de pulsos também foi fixada em 50 mV, onde foram realizados testes referentes à frequência, em uma solução estoque do fármaco de concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , e concentração final de  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o fármaco em questão, a frequência foi variada de 10 a 100 Hz, uma vez que para frequências maiores, os voltamogramas perdem resolução, sem aumentos significativos na corrente de pico.

Para o alisquireno, a melhor frequência obtida, em função da corrente de pico máxima, foi a de 100 Hz. As informações referentes à frequência em função da corrente de pico obtida pós-tratamento dos dados, constam na Tabela 6.

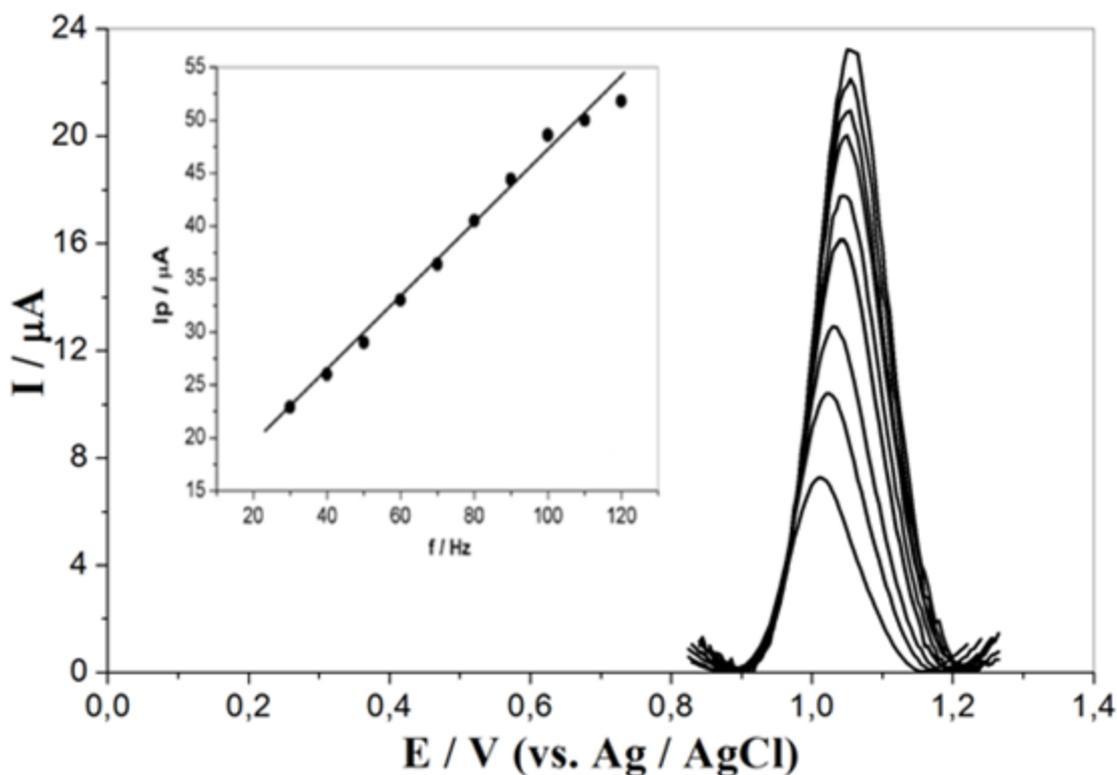
Tabela 6 Variação da frequência de pulsos, de estudo em alisquireno 4,5 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

Frequência (Hz)	Ip (μA)
10,0	7,184
20,0	10,253
30,0	12,832
40,0	15,961
50,0	16,881
60,0	17,647
70,0	19,635
80,0	20,804
90,0	21,566
100,0	22,983

Fonte: Dos autores (2016).

A oxidação do fármaco também é regida por um processo controlado por difusão, sendo também um processo totalmente irreversível, como previamente demonstrado no comportamento eletroquímico deste frente aos experimentos de voltametria cíclica realizados sobre o DDB, e confirmado pela relação linear entre Ip vs. Frequência em meio de tampão BR pH 8, como demonstrado na Figura 18.

Figura 18 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de alisquireno a  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 8,0. Frequência ótima – 100,0 Hz.



Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.4.3 Losartana

A losartana apresentou valores de corrente de pico ótimos, em uma frequência de 100 Hz, quando testada em uma solução estoque de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  com concentração final de  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ , com a amplitude de pulso fixada em 50 mV. A frequência foi variada de 10 a 100 Hz, sendo que após este valor, os voltamogramas se mostraram distorcidos e sem diferenças significativas na corrente de pico. O fármaco também sofre processo de difusão em uma reação de oxidação totalmente irreversível, fato este comprovado pela linearidade presente no gráfico da corrente de pico em função da frequência e, também, pelo gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência, onde houve perda da linearidade. As informações referentes à frequência em função da corrente de pico obtida pós-tratamento dos dados, constam na Tabela 7, e os voltamogramas, na Figura 19.

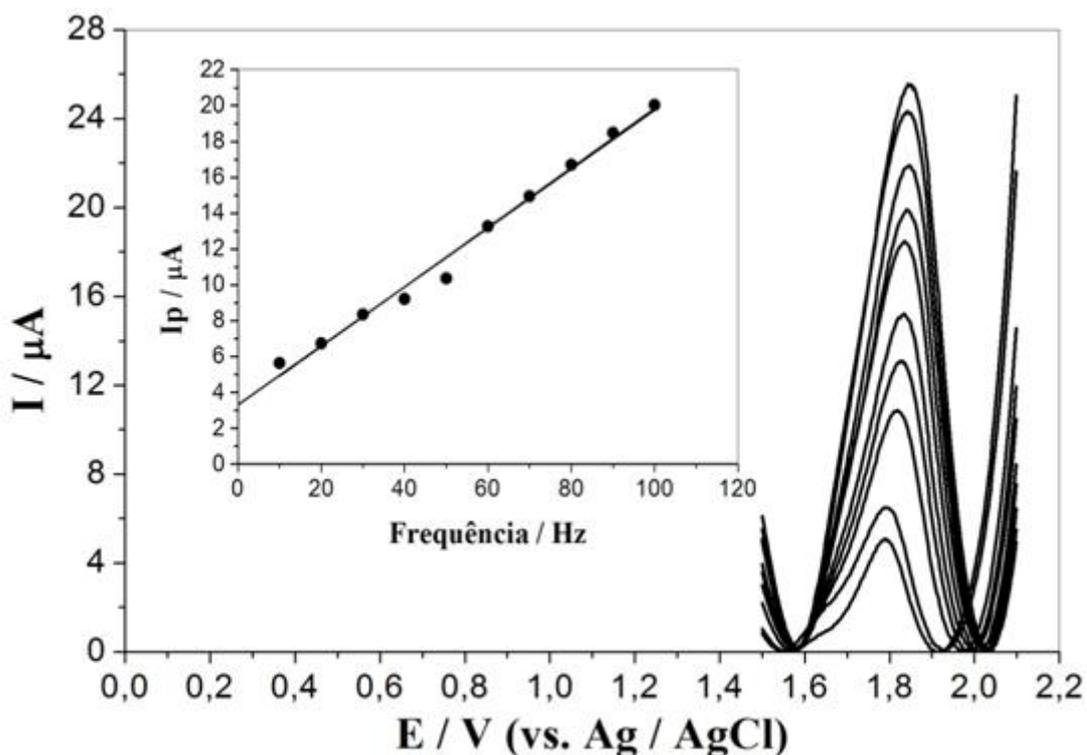
Tabela 7 Variação da frequência de pulsos, de estudo em losartana 45,5 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

Frequência (Hz)	I <sub>p</sub> (μA)
10,0	5,648
20,0	6,740
30,0	8,360
40,0	9,220
50,0	10,368
60,0	13,276
70,0	14,950
80,0	16,708
90,0	18,492
100,0	20,036

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 19 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de losartana a  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 10,0. Frequência ótima – 100,0 Hz.

Figura 20 Dependência da corrente de pico na frequência de onda quadrada, variando de 10 a 100 Hz, com amplitude fixada em 50 mV em solução de losartana a  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 10,0. Frequência ótima – 100,0 Hz.



Fonte: Dos autores (2016).

As linearidades obtidas nos gráficos referentes às correntes de pico em função das frequências de pulso de onda quadrada, para os três fármacos estudados, apresentaram valores de  $R$  de 0,971 para captopril, 0,947 para alisquireno e 0,987 para losartana.

Os três fármacos mostraram voltamogramas distorcidos após aplicação de frequência de 100 Hz. Segundo a teoria de voltametria de onda quadrada, tal fato acontece graças a efeitos de resistência da solução. Neste sentido, os valores ótimos de frequência escolhidos para os três fármacos foram de, 10,0 Hz para captopril e de 100,0 Hz para alisquireno e losartana.

Após realizadas as determinações dos melhores valores de frequência, foram estudados os valores de amplitude de pulso, já fixando os valores de frequência escolhidos para cada fármaco.

#### 4.5 AMPLITUDE DE APLICAÇÃO DOS PULSOS DE POTENCIAL

Uma outra forma de melhorar a sensibilidade analítica na SWV com processos redox totalmente irreversíveis é aumentar a amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais, isto porque, para valores de amplitudes maiores que 20 mV, a largura de meia-altura ( $\Delta E_p/2$ ) se mantêm constante. Os analitos aqui estudados passam por processos oxidativos totalmente irreversíveis, logo, a sensibilidade da técnica, para este tipo de processo, aumenta linearmente segundo o aumento dos valores de amplitude dos pulsos.

Os valores de amplitude foram variados de 10 a 100 mV, para os três fármacos, com seus respectivos eletrólitos de suporte e valores de frequência pré-determinados. Os voltamogramas obtidos estão ilustrados nas Figuras 20, 21 e 22, sendo que o valor de amplitude escolhido foi de 50 mV para captopril, alisquireno e losartana. Os valores obtidos de  $r$  foram de 0,951 para captopril, 0,962 para alisquireno e 0,977 para losartana.

##### 4.5.1 Captopril

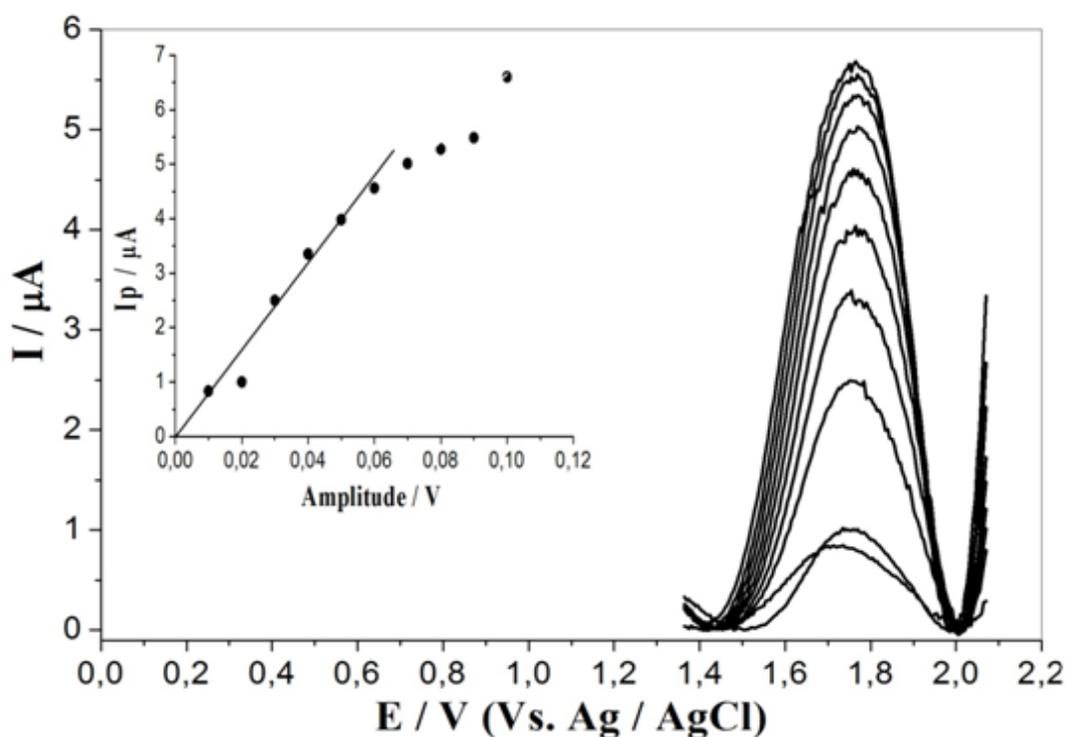
O comportamento de captopril segundo a variação da amplitude, foi estudado sob uma solução estoque de 200 mg L<sup>-1</sup> do fármaco, com concentração final de 18,2 mg L<sup>-1</sup> em tampão BR pH 8,0 e frequência de 10,0 Hz. A corrente de pico variou linearmente com o aumento da amplitude até o valor máximo de 50 mV, valor este escolhido para continuidade dos estudos eletroanalíticos de captopril. Este resultado comprova mais uma vez a irreversibilidade da reação de oxidação do fármaco. Os valores de variação de amplitude e suas respectivas correntes de pico são mostrados na Tabela 8, bem como seus voltamogramas na Figura 20.

Tabela 8 Variação da amplitude de pulsos, de estudo em captopril  $18,2 \text{ mg L}^{-1}$ , segundo sua respectiva corrente de pico.

Amplitude (mV)	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )
10,0	0,836
20,0	1,000
30,0	2,500
40,0	3,353
50,0	3,978
60,0	4,561
70,0	5,014
80,0	5,280
90,0	5,486
100,0	6,605

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 21 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com amplitude fixada em 10,0 Hz em solução de captopril a  $18,2 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 8,0. Amplitude ótima – 50 mV.



Fonte: Dos autores(2016).

#### 4.5.2 Alisquireno

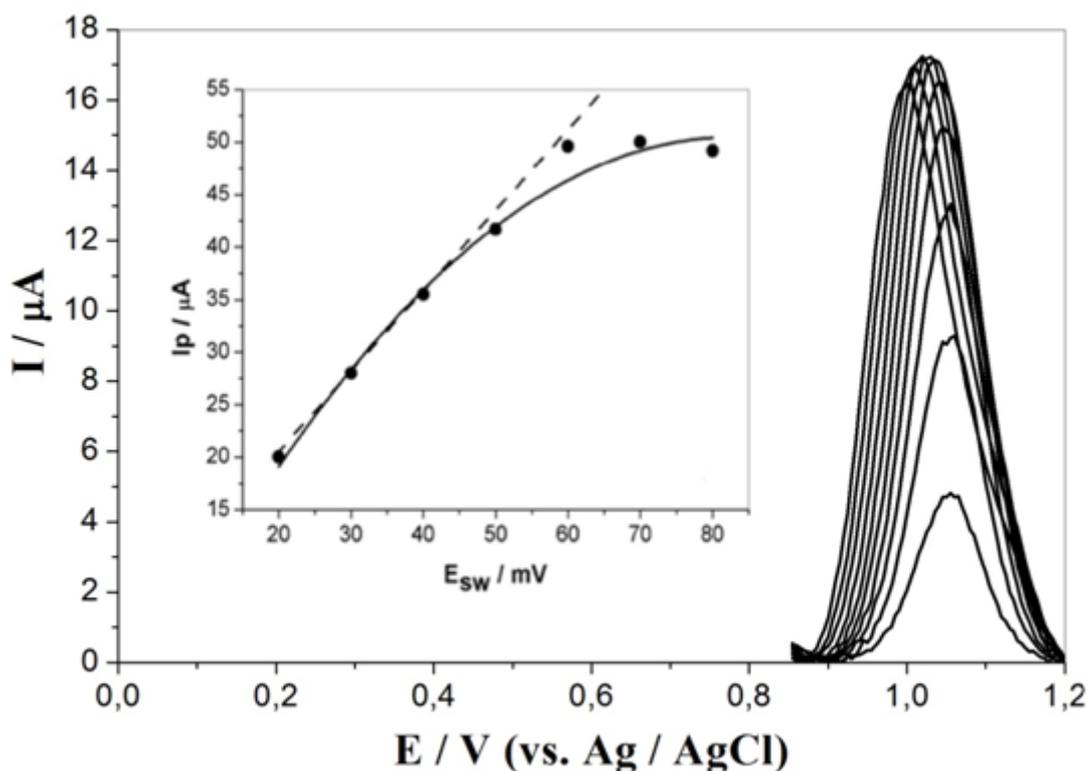
O alisquireno sofreu variação de amplitude de 10 a 100 mV e frequência a 100,0 Hz, onde o valor ótimo da mesma foi de 50 mV, por apresentar linearidade entre a corrente de pico e a amplitude de pulso potencial. Os resultados obtidos para o perfil entre  $I_p$  vs. *Amplitude* se assemelharam aqueles obtidos para o captopril. Os estudos foram realizados em uma solução estoque de 50 mg L<sup>-1</sup> com concentração final de 4,5 mg L<sup>-1</sup>, em tampão BR pH 8,0. Os voltamogramas obtidos também confirmam que o alisquireno sofreu um processo de oxidação irreversível, sendo estes mostrados na Figura 21. Os valores da variação de amplitude com as respectivas correntes de pico estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Variação da amplitude de pulsos, de estudo em alisquireno 4,5 mg L<sup>-1</sup>, segundo sua respectiva corrente de pico.

Amplitude (mV)	$I_p$ ( $\mu$ A)
10,0	4,833
20,0	9,196
30,0	12,956
40,0	14,982
50,0	16,291
60,0	17,088
70,0	17,078
80,0	16,835
90,0	16,789
100,0	16,238

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 22 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com frequência fixada em 100,0 Hz em solução de alisquireno a  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 8,0. Amplitude ótima – 50 mV.



Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.5.3 Losartana

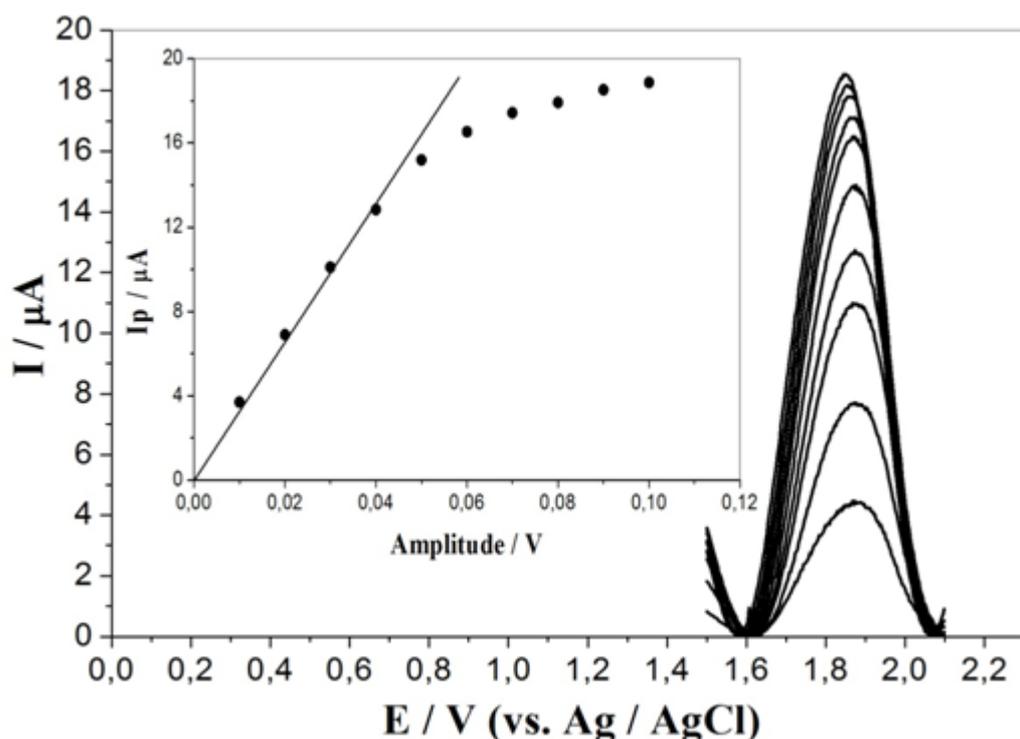
Para promover o estudo de losartana, a amplitude foi variada de 10 a 100 mV, onde a melhor corrente de pico se deu em 50 mV, sob frequência constante de 100,0 Hz, em solução estoque de concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de fármaco, e concentração final de  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ , em solução eletrolítica de tampão BR pH 10,0. Os voltamogramas obtidos apresentaram linearidade com a corrente de pico também até o valor de amplitude de 50 mV, como mostrado na Figura 22, com dados discriminados na Tabela 10, mostrando que o fármaco sofre reação de oxidação do irreversível.

Tabela 10 Variação da amplitude de pulsos, de estudo em losartana  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ , segundo sua respectiva corrente de pico.

Frequência (Hz)	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )
10,0	3,710
20,0	6,900
30,0	10,100
40,0	12,840
50,0	15,200
60,0	16,530
70,0	17,430
80,0	17,920
90,0	18,530
100,0	18,870

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 23 Dependência da corrente de pico na amplitude de onda quadrada, variando de 10 a 100 mV, com frequência fixada em 100,0 Hz em solução de losartana a  $45,5 \text{ mg L}^{-1}$  e tampão BR pH 10,0. Amplitude ótima – 50,0 mV.



Fonte: Dos autores (2016).

Os resultados referentes aos estudos da variação da amplitude foram semelhantes para todos os fármacos, como mostrado nas Figuras 20, 21 e 22, uma vez que acima de 50 mV não foram observados aumentos significativos de  $I_p$ , o que não forneceu nenhuma contribuição à sensibilidade da técnica para fins analíticos, sem contar que os voltamogramas, a amplitudes altas, se tornam largos, reduzindo assim sua resolução. Segundo a teoria da voltametria de onda quadrada, estes resultados são coerentes, já que para valores maiores que 50 mV, a corrente de pico se mantém praticamente constante (Souza *et al.* 2003; Manoel 1922; Wirley & Ribeiro 2010). Ao se propor um método de análise para um dado analito, deve-se comprovar seu desempenho através do levantamento de parâmetros pré-estabelecidas. Uma vez fixados os principais parâmetros de onda quadrada, para os analitos aqui estudados (Tabela 11), foram realizados os estudos com os levantamentos das curvas analíticas de cada um, determinação dos limites de detecção e quantificação, assim como testes de recuperação em amostras comerciais e em plasma humano (spiked).

Tabela 11 Parâmetros de onda quadrada e valores de pH ótimos para determinação de captopril, alisquireno e losartana, em meio de tampão BR.

	Amplitude / mV	Freqüência / Hz	pH
Captopril	50	10	8,0
Alisquireno	50	100	8,0
Losartana	50	100	10,0

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.6 CURVA ANALITICA

A correlação matemática existente entre a intensidade da corrente de pico e a concentração de um dado analito é chamada de curva analítica, em que, na pratica, pode ser construída sobre no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva analítica, graças aos possíveis erros que possam estar associados à varredura. O método consiste na medição da corrente voltamétrica de soluções padrão de várias concentrações do analito de interesse, colocando-se em gráfico de coordenadas cartesianas, concentração ( $\text{mg L}^{-1}$  ou  $\text{mol L}^{-1}$ ) vs corrente de pico ( $\mu\text{A}$ ).

A curva obtida deverá apresentar um comportamento linear, passando pela origem, dentro de uma dada faixa de concentração, que será determinada pelo analítico que a estiver sendo considerado (Wirley & Ribeiro 2010; Souza *et al.* 2003; Manoel 1922; Bard *et al.* 1944).

Uma vez que as curvas analíticas estejam prontas, podem-se obter os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) e os valores do coeficiente de correlação (R), sendo este último o responsável pela eficiência do método aplicado, prestando ao analista informações acerca dos desvios dos pontos de corrente na curva linear. Os valores de R poderão ser obtidos ao final do tratamento dos dados, por cálculo estatístico computacional provindo do programa utilizado para tal. Por definição, LD é a menor concentração do analito investigado, que pode ser detectada pelo eletrodo de trabalho, mas não necessariamente quantificada. Já LQ, é definido como a menor concentração que pode ser quantificada pelo eletrodo (Sartori *et al.* 2009).

Os limites de detecção e quantificação, foram obtidos através das Equações 5 e 6, a seguir:

$$\text{Equação 3} \quad LD = \frac{3 \times S_b}{S}$$

$$\text{Equação 4} \quad LQ = \frac{10 \times S_b}{S}$$

Onde para ambas,  $S_b$  simboliza a média do desvio padrão da análise de dez voltamogramas brancos do meio eletrolítico utilizado e  $S$ , a inclinação da curva analítica (Souza *et al.* 2003; Manoel 1922; Bard *et al.* 1944). As curvas confeccionadas para os três fármacos aqui trabalhados, forneceram excelentes valores de limite de detecção e quantificação, compatíveis com os dados constantes na literatura, bem como bons resultados referentes à linearidade dos pontos de adição de padrão. Também, as curvas se mantiveram lineares em faixas relativamente vastas de concentração das espécies analisadas.

Seguindo o método de adição de padrão, o analista minimiza os efeitos da matriz dos analitos a que investiga, ou seja, os interferentes afetarão as respostas obtidas de cada medida de corrente dos analitos, da mesma forma que afetarão as adições das alíquotas dos mesmos, durante o procedimento voltamétrico (Manoel

1922). Neste sentido, o método de adição de padrão foi usado na confecção das curvas analíticas e nos testes de recuperação para os três fármacos aqui estudados.

O método de adição de padrão é muito vantajoso em caso de matrizes que contenham espécies desconhecidas que possam afetar as respostas de corrente obtidas nos voltamogramas confeccionados, logo, optamos por este método para a quantificação de losartana, captopril e alisquireno. Sendo assim, empregando-se as condições experimentais otimizadas, a curva de calibração para os fármacos foi obtida realizando sucessivas adições de alíquotas de solução padrão de cada fármaco em concentração específica, ao eletrólito de suporte. Desta forma, foram construídas curvas analíticas em água pura (água purificada pelo sistema Milli-Q<sup>®</sup>), em intervalos de concentrações que variaram de  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , para alisquireno;  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , para losartana e  $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , para o captopril. Nas Figuras 23, 24 e 25, são apresentados os voltamogramas de onda quadrada em função do aumento da concentrações dos fármacos. Foi observado um único pico bem definido em +1,0 V, para alisquireno; 1,6 V, para captopril e 1,8 V para losartana.

Uma vez construída a curva de calibração, calculou-se os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD).

Os limites de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente) para os fármacos foram obtidos em amostras de água destilada e deionizada, utilizando o procedimento recomendado pela IUPAC. O desvio-padrão de brancos (SB) foi utilizado em conjunto com a inclinação (B) da reta das curvas analíticas para determinar a quantificação e os limites de detecção. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos para três determinações de alisquireno em água pura, e cinco para captopril e losartana; utilizando eletrodos de DDB e SWV como técnica eletroanalítica. Os valores de LD e LQ, de todos os fármacos estudados, são apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14.

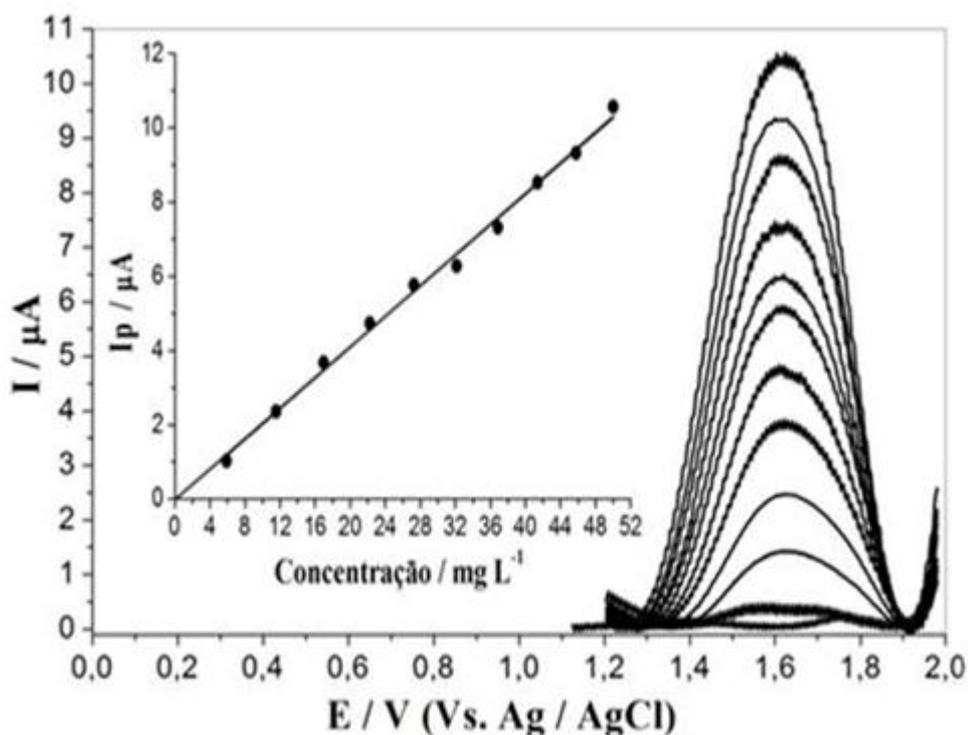
Através das curvas analíticas, foi possível observar que não houve deslocamento dos potenciais de pico, sendo que houve um aumento da corrente de pico em função do aumento da concentração dos fármacos. Neste caso, a relação entre  $I_p$  vs. Concentração se dá em virtude do aumento de espécies eletroativas presentes no seio da solução em torno da superfície do eletrodo de trabalho, que torna possível a oxidação de mais moléculas ali presentes.

A seguir, estão apresentados os voltamogramas e as curvas analíticas para cada fármaco estudado.

#### 4.6.1 Captopril

Para o levantamento da curva de calibração de captopril, empregou-se alíquotas de uma solução em estoque de concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que a concentração na célula eletroquímica referente a primeira alíquota adicionada foi de  $5,9 \text{ mg L}^{-1}$ , em um volume inicial de  $0,1 \text{ mL}$ . O intervalo de volumes adicionados, foi compreendido de  $0,1$  a  $1,0 \text{ mL}$ . O eletrólito utilizado foi o tampão BR pH  $8,0$ , em uma janela eletroquímica estabelecida entre  $1,0$  a  $2,2 \text{ V}$ , com frequência de  $10,0 \text{ Hz}$  e amplitude de  $50 \text{ mV}$ . A cada intervalo de adição de padrão, a solução contida na célula eletroquímica, sofreu agitação e logo após um curto repouso de  $10$  segundos. Os voltamogramas de onda quadrada com a respectiva curva analítica estão apresentados na Figura 23.

Figura 24 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de captopril em tampão BR, pH  $8,0$ . Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de captopril.  $F = 10,0 \text{ Hz}$ ; amplitude =  $50 \text{ mV}$ ,  $E_s = 5 \text{ mV}$ .



Por meio dos voltamogramas de onda quadrada, construiu-se a curva analítica empregando  $I_p$  vs. [captopril]. Deste modo, foi possível determinar os limites de detecção e quantificação do captopril em água pura, empregando os dados referentes a curva analítica obtida dentro da faixa linear entre  $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Os resultados referentes a regressão linear da curva analítica para o captopril, assim como os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para captopril  $5,9 \text{ mg L}^{-1}$  em tampão BR pH 8,0.

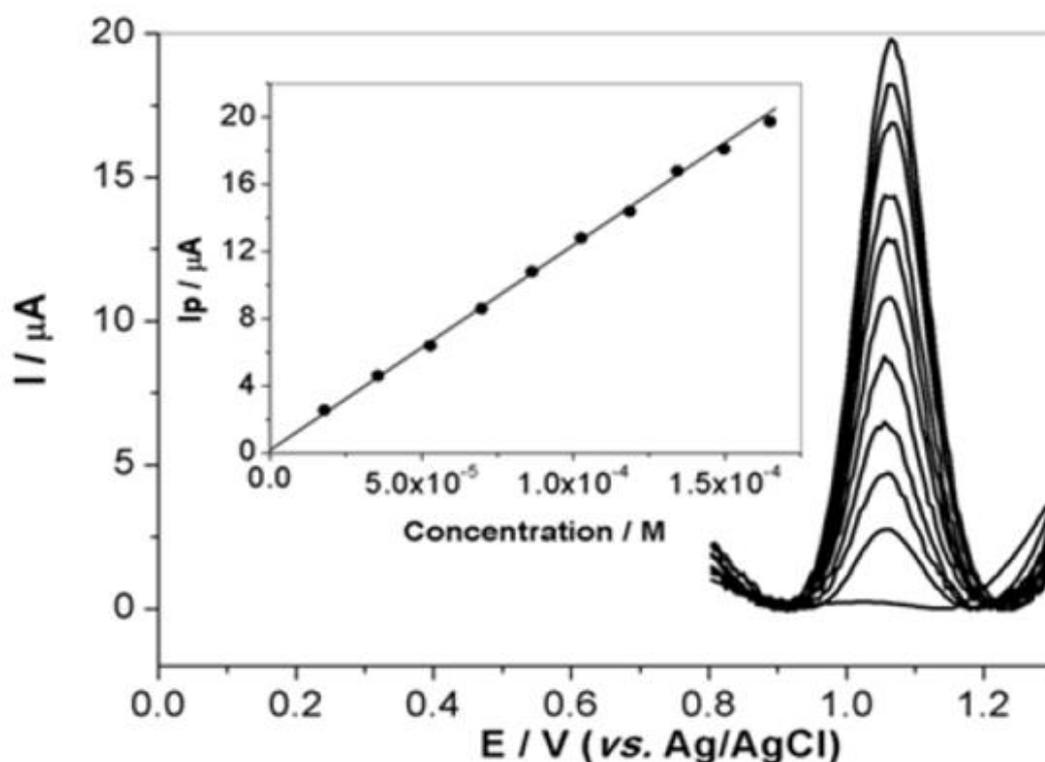
Parâmetro	Valor
Ep	1,6 V
Faixa linear	$1,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ até $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
Coefficiente de correlação (R)	0,995
Coefficiente linear	$0,419 \mu\text{A} \pm 0,0509$
Coefficiente angular	$44958,345 \mu\text{A} \pm 0,002$
SB	$0,001 \mu\text{A}$
LD	$6,67 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$
LQ	$2,22 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$
Número de medidas realizadas (n)	5

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.6.2 Alisquireno

O alisquireno foi estudado sob concentração estoque de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com alíquota adicional de  $0,1 \text{ mL}$  de concentração final  $0,550 \text{ mg L}^{-1}$ . O volume foi variado entre adições de  $0,1$  a  $1,0 \text{ mL}$  da solução do fármaco, em tampão BR pH 8,0, com janela eletroquímica no intervalo de  $0,8$  a  $1,3 \text{ V}$ , frequência de  $100,0 \text{ Hz}$  e amplitude de  $50 \text{ mV}$ . O alisquireno também sofreu agitação a cada adição de padrão e repouso de dez segundos entre cada medida realizada. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos são ilustrados na Figura 24.

Figura 25 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de alisquireno em tampão BR, pH 8,0. Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de alisquireno.  $F = 100,0$  Hz; amplitude = 50 mV,  $E_s = 5$  mV.



Fonte: Dos autores (2016).

Os limites de detecção e de quantificação do alisquireno em água foram obtidos para três determinações do fármaco, com valores de  $2,5 \times 10^{-8}$  e  $8,4 \times 10^{-8}$  M. Embora o valor calculado (LD e LQ) coincidam, praticamente, com os relatados na literatura para eletrodos de Hg e de carbono vítreo, neste estudo foram obtidos valores de desvio padrão relativos inferiores aos obtidos sobre Hg e de carbono vítreo. Estes resultados indicam uma boa estabilidade de eletrodo DDB para as medições analíticas. A curva analítica apresentou linearidade entre  $5,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> até  $1,5 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, com potencial de pico em 1,0 V, com  $r = 0,997$ ; LD =  $2,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e LQ =  $8,4 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, como na Tabela 13.

Tabela 13 Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para alisquireno  $0,550 \text{ mg L}^{-1}$  em tampão BR pH 8,0.

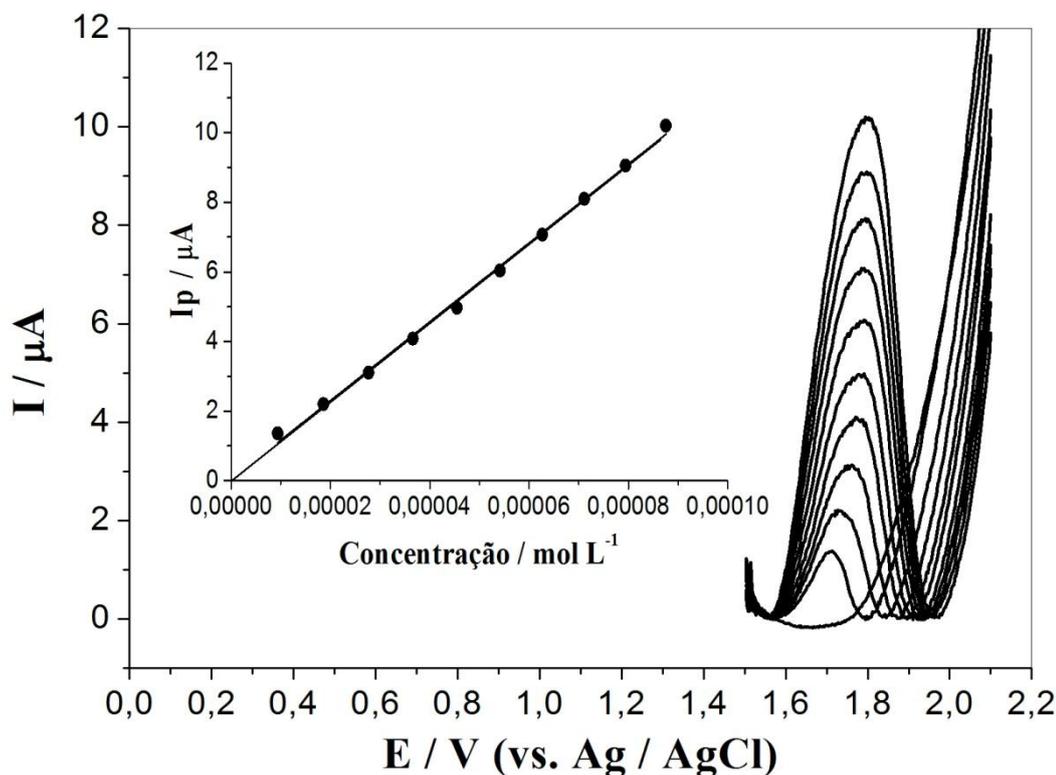
Parâmetro	Valor
$E_p$	1,0 V
Faixa linear	$5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ até $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
Coefficiente de correlação (R)	0,997
Coefficiente linear	$0,400 \mu\text{A} \pm 0,02$
Coefficiente angular	$118668,480 \mu\text{A} \pm 2351,3$
SB	$0,001 \mu\text{A}$
LD	$2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
LQ	$8,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
Número de medidas realizadas (n)	3

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.6.3 Losartana

A confecção da curva analítica de losartana foi construída sob adições de padrão de 0,04 ml até 10 pontos na curva analítica, sob uma solução estoque de concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que a adição inicial compreendia um valor de  $3,97 \text{ mg L}^{-1}$ . O eletrólito de suporte foi o tampão BR no pH 10,0, com janela eletroquímica estabilizada de 1,5 a 2,1 V, com frequência de 100,0 Hz e amplitude de 50 mV. O mesmo procedimento adotado para a obtenção das curvas analíticas do alisquireno e captopril foi adotado no caso da losartana. Os voltamogramas de onda quadrada com a respectiva curva analítica estão apresentados na Figura 25.

Figura 26 Respostas SWV tomadas a um eletrodo de DDB para diferentes concentrações de losartana em tampão BR, pH 10,0. Inserção: dependência linear da corrente de pico nas concentrações de losartana.  $F = 100,0$  Hz; amplitude = 50 mV,  $E_s = 5$  mV.



Fonte: Dos autores (2016).

A curva analítica para a losartana foi obtida por meio de por cinco determinações em água pura, e seus limites de detecção e quantificação, definidos segundo os parâmetros otimizados de onda quadrada. A região linear estudada, referente a curva analítica esteve entre  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  até  $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , onde há o  $E_p$  foi 1,8 V (vs.  $Ag/AgCl$ ), com  $r = 0,997$ ;  $LD = 2,64 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $LQ = 8,82 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ , como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 Resultados da regressão linear da curva analítica obtida para losartana 3,97 mg L<sup>-1</sup> em tampão BR pH 10,0.

Parâmetro	Valor
E <sub>p</sub>	1,8 V
Faixa linear	2,3 x 10 <sup>-6</sup> mol.L <sup>-1</sup> até 1,9 x 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup>
Coeficiente de correlação (R)	0,997
Coeficiente linear	0,033 µA ± 0,115
Coeficiente angular	113345,48 µA ± 2080,90
SB	0,001 µA
LD	2,64 x 10 <sup>-8</sup> mol.L <sup>-1</sup>
LQ	8,82 x 10 <sup>-8</sup> mol.L <sup>-1</sup>
Quantidade de medidas realizadas (n)	5

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4. 7 TESTES DE RECUPERAÇÃO

Ao se propor uma metodologia analítica para uma determinada espécie, deve-se ter por base a validação de tal técnica proposta, através de estudos estatísticos. O valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico constitui a exatidão de uma metodologia para detecção e quantificação do analito em questão, validando a técnica. Os estudos referentes à exatidão de um método são baseados em materiais de referência certificados (MRC), comparando-se o método proposto, com o método de referência que deve estar relacionado com padrões internacionais. Todavia, o alto custo de tais materiais e suas limitações acerca de matrizes e analitos, restringem seu uso.

Neste sentido, a quantificação final do analito, bem como sua recuperação referente à quantidade real presente, ao final de todo o processo analítico, é chamado de teste de recuperação e está intimamente relacionado à exatidão da técnica. Em suma, o estudo de recuperação se baseia na fortificação da amostra analisada, segundo o método de adição de padrão, através do depósito de sucessivas alíquotas de concentrações conhecidas, ao seio da solução, na célula eletroquímica. A concentração percentual recuperada ao final do processo será calculada após no mínimo cinco adições de alíquotas de concentrações conhecidas, através da Equação 5:

$$\text{Equação 5} \quad \% \text{ Rec.} = \frac{a}{b}$$

Onde  $a$  simboliza o valor de intercept e  $b$ , o slope, ambos determinados em programa de tratamento de dados voltamétricos. Logo, em processos analíticos, os estudos referentes à recuperação são os mais utilizados para validação de vários métodos que envolvam diferentes tipos de amostras de pesquisa.

Sendo assim, para prestar confiabilidade à técnica trabalhada, o resultado apresentado deverá ser exato e preciso dentro de um erro experimental aceitável. Para tanto, na presente dissertação, optamos por validar os métodos empregados e resultados obtidos fazendo uso de cálculos de desvio padrão (Equação 6), intervalo de confiança (Equação 7) e percentagem de recuperação (Equação 8), a partir da confecção da reta de teste de recuperação e regressão linear de cada fármaco;

$$\text{Equação 6} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Em que  $X_i$  refere-se aos valores de concentração obtidos de cada uma de pelo menos três corridas;  $\bar{X}$ , à média de concentração das varreduras realizadas e  $n$ , à quantidade de varreduras;

$$\text{Equação 7} \quad \bar{X} \pm Z S / \sqrt{n}$$

Onde  $\bar{X}$ , é a média de concentração das varreduras realizadas;  $Z$ , é o valor tabelado em estatística para o intervalo de confiança a que remete os resultados;  $S$ , á inclinação da curva analítica e  $n$ , à quantidade de varreduras realizadas (Manoel 1922; Electrochemistry 2000; Bard *et al.* 1944).

$$\text{Equação 8} \quad \% R = 100 \times \frac{[\text{FÁRMACOS}]_{\text{encontrada}}}{[\text{FÁRMACOS}]_{\text{adicionada}}}$$

Outra forma de se avaliar a exatidão de uma metodologia é refazê-la por outra metodologia de técnica diferente, já validada, onde os resultados deverão conter baixo erro relativo entre si. Após isso, estabelece-se um nível de confiança que esteja de acordo com o intervalo de concentração das amostras, onde quanto menor

o valor de concentração do analito, maior a dispersão dos dados que aumentam o limite de confiança. Entretanto, no presente trabalho, não foi possível a validação da técnica empregada por uma segunda técnica analítica. Isso se deu ao fato do tempo tardio para realização da mesma.

Em voltametria de onda quadrada, a corrente de pico obtida em cada voltamograma de onda quadrada é diretamente proporcional à atividade e à concentração da amostra investigada. Logo, para determinar a concentração do analito “desconhecido”, dever-se-á calculá-la por meio da interpolação da corrente medida da amostra na curva padrão, ou seja, pela regressão linear. A avaliação da regressão linear pode ser verificada caso as recuperações apresentem distribuição linear com relação aos níveis de fortificação da amostra, onde os principais parâmetros são os coeficientes angulares e lineares das retas. Como o pretendido é se obter percentagens de recuperação numericamente iguais às concentrações de fortificação inicialmente adicionadas, o coeficiente linear deverá ser o mais próximo possível de zero, e o linear; de um; e o gráfico resultante deverá ser linear, como mostram as Figuras 26, 27 e 28, em que a reta foi extrapolada até o eixo da concentração (X) no lado negativo das coordenadas.

O módulo referente ao valor negativo na coordenada X remete ao valor da concentração do analito adicionado inicialmente na célula eletroquímica. Uma vez de posse dos valores de volume total de solução na célula e o volume adicionado de analito inicialmente, pode-se calcular a concentração dos fármacos aqui trabalhados, a partir da Equação 9, onde;

$$\text{Equação 9} \quad C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Em que  $C_i$ , refere-se à concentração em que se encontra o analito;  $V_i$ , à alíquota inicialmente adicionada;  $C_f$ , à concentração final a que se pretende descobrir e  $V_f$ , ao volume total que consta no interior da célula eletroquímica.

Assim sendo, fizemos uso da técnica de voltametria de onda quadrada para determinar o teor dos fármacos em produtos farmacêuticos comerciais, através do método de adição de padrão. Logo, para realização dos testes de recuperação e cálculos estatísticos, enriquecemos a amostra investigada com um volume conhecido dos padrões dos fármacos utilizados nas análises. As amostras dos

fármacos sofreram, então, todo o procedimento de análise em que os voltamogramas foram confeccionados, para levantamento da percentagem de recuperação de cada fármaco. Ao fim das análises, os resultados obtidos para as concentrações de cada analito com as amostras enriquecidas, foram subtraídos dos resultados obtidos das amostras sem tal adição, ou seja, sem o enriquecimento inicial. A diferença forneceu o valor de concentração do padrão adicionado no enriquecimento dentro de um erro experimental aceitável. Os resultados das recuperações são expressos em ordem de percentagem de recuperação dos padrões adicionados. Os valores considerados ótimos se aproximam de 100%.

Depois de realizados os cálculos estatísticos específicos, deve-se analisar o erro relativo que for obtido ao final do processo de recuperação, pois alguns erros críticos são considerados aceitáveis de acordo com a concentração e natureza do analito investigado. Baixa recuperação de extração, medidas volumétricas imprecisas ou interferentes do analito presentes na resultante da corrente de pico, são considerados agravantes responsáveis por erros sistemáticos ocorridos durante os testes de recuperação, que podem provocar a invalidação da técnica. Os valores de erros aceitáveis são compreendidos para análises de elementos majoritários que costumam apresentar erros sistemáticos relativos, inferiores àqueles obtidos em analitos de baixas concentrações. A Tabela 15 reporta-se a tais valores, de acordo com parâmetros fixados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Tabela 15 Recuperação do analito em função da concentração.

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
≥ 0,1	95 – 105
≥ 0,01	90 – 107
≥ 0,001 - ≥ 0,00001	80 – 110
≥ 0,000001	60 – 115
≥ 0,0000001	40 - 120

Fonte: (Brito *et al.* 2003).

Sendo assim, podemos considerar que os valores de recuperação obtidos para losartana, alisquireno e captopril, são satisfatórios, possuem desvio padrão e erros relativos baixos, estando de acordo com dados fornecidos por periódicos, artigos e outros trabalhos realizados para os mesmos analitos; o que provaremos a seguir na discussão dos resultados obtidos durante o presente trabalho.

#### 4.7.1 Captopril

Para realizar os testes de recuperação em captopril, foi preparada uma solução estoque em formulação farmacêutica, de concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , com 4,9 mL de tampão BR pH 8,0, em janela eletroquímica estabilizada de 1,0 á 2,2 V, frequência de 10,0 Hz e amplitude de 50 mV, sob técnica de voltametria de onda quadrada.

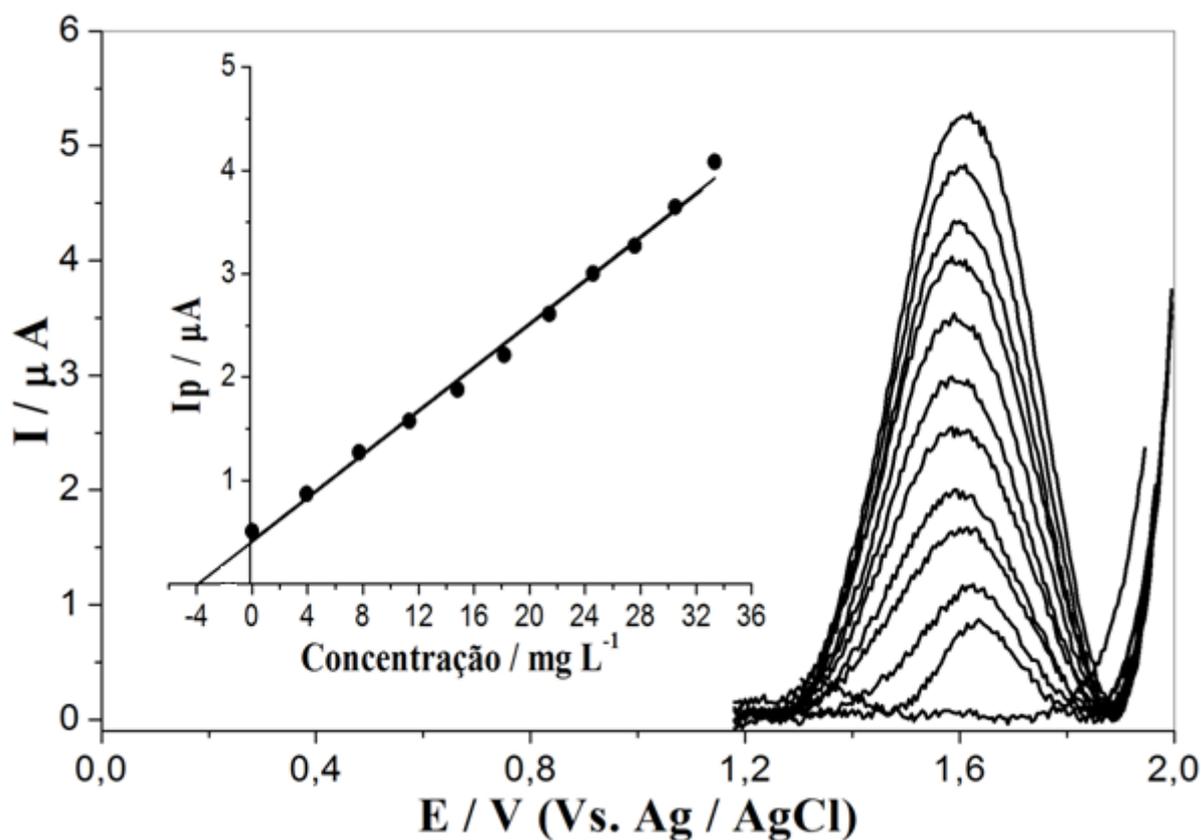
A reta foi levantada sob metodologia de adição de padrão, onde a cada nova adição, a solução sofria uma agitação e após, um descanso de dez segundos. Logo após, um novo voltamograma era confeccionado. As adições dos padrões foram efetuadas em intervalos de 0,1 em 0,1 mL's, onde a concentração inicial na célula eletroquímica, era de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Ao final das análises, foram realizados os cálculos estatísticos, onde as médias das varreduras de recuperação, apontaram um valor de  $4,018 \text{ mg L}^{-1}$ ; com desvio padrão da ordem de 0,02; desvio relativo de 99,55%; percentagem média das recuperações de 100,45% e intervalo de confiança de  $4,018 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,140$ , sob dados restritos em um limite de confiança de 95%. Uma vez realizada a regressão linear através da extrapolação da reta a níveis negativos do gráfico cartesiano, verificou-se que os resultados estatísticos eram coerentes com os constantes no gráfico. As análises para captopril foram feitas em cinco varreduras, onde o melhor voltamograma foi aqui representado pela Figura 26. Na Tabela 16, estão designados os dados das cinco recuperações realizadas por voltametria de onda quadrada com uso de eletrodo DDB, assim como na Tabela 17, constam os valores obtidos pós tratamento dos dados de onda quadrada.

Tabela 16 Resultados de cinco recuperações para captopril  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , em eletrólito de tampão BR pH 8,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.

Replicata	[CAP] <sub>adicionada</sub> / $\text{mg L}^{-1}$	[CAP] <sub>encontrada</sub> / $\text{mg L}^{-1}$	Recuperação (%)
1	4,0	4,03	100,75
2		4,01	100,25
3		4,04	101,00
4		3,99	99,75
5		4,02	100,50
Média		4,018	100,45

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 27 Estudos de recuperação e determinação analítica de captopril em tampão BR de  $0,04 \text{ M}$ , pH 8,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de captopril de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,1; (c) 0,2; (d) 0,3; (e) 0,4; (f) 0,5; (g) 0,6; (h) 0,7; (i) 0,8; (j) 0,9 e (k) 1,0 mL.



Fonte: Dos autores (2016).

A melhor curva escolhida para captopril  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , apresentou uma inclinação em slope de  $0,105 \text{ A / mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,994$ .

Tabela 17 Recuperações de amostras de captopril em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições:  $f = 10,0 \text{ Hz}$ ;  $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ ;  $E_S = 5 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ); intervalo de confiança de 95% =  $4,018 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,140$ .

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (R)	0,994
Concentração adicionada	$4,0 \text{ mg L}^{-1}$
Concentração encontrada (média)	$4,018 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,02$
RDS	0,99%
Recuperação (média)	100,45%
Quantidade de medidas realizadas (n)	5

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.7.2 Alisquireno

Alisquireno foi investigado em relação à sua exatidão, em uma solução preparada a partir de uma formulação farmacêutica de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com volume total no interior da célula, de  $9,9 \text{ mL}$  de tampão BR pH 8,0, em janela eletroquímica estabilizada de  $0,8$  a  $1,3 \text{ V}$ , frequência de  $100,0 \text{ Hz}$  e amplitude de  $50 \text{ mV}$ , sob voltametria de onda quadrada com eletrodo de DDB.

Para realização das varreduras fez-se uso da técnica de adição de padrão, onde a cada nova adição, a solução sofria agitação e posterior descanso de 10 segundos. Logo após, um novo voltamograma era levantado. A concentração inicial no interior da célula eletroquímica, era de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Após a realização dos cálculos estatísticos, a média de recuperação das três medidas realizadas foram de  $49,58 \text{ mg L}^{-1}$ ; desvio padrão de  $0,42$  e RDS de  $0,9\%$ .

Com a extrapolação da reta realizada na regressão linear, podemos perceber que os dados estatísticos conferiam com os dados cartesianos, em todas as três análises realizadas. O melhor voltamograma está representado na Figura 27. A Tabela 18 contém os valores obtidos de recuperação, para os 5 testes realizados.

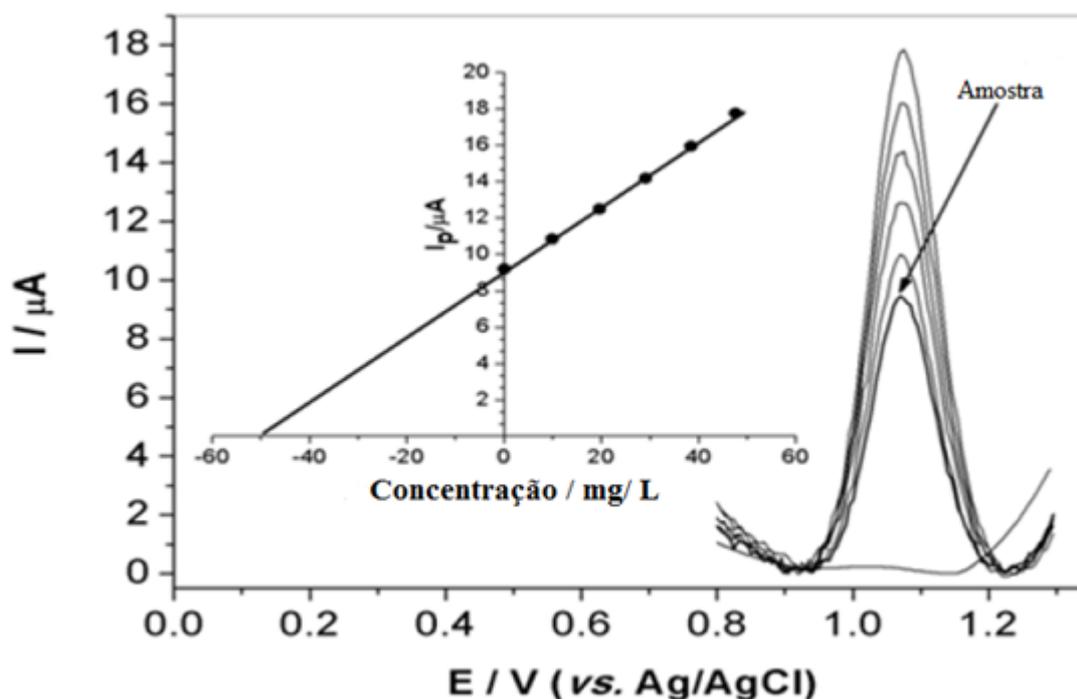
Tabela 18 Resultados de cinco recuperações para alisquireno  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , em eletrólito de tampão BR pH 8,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.

Replicata	$[\text{ALI}]_{\text{adicionada}} / \text{mg L}^{-1}$	$[\text{ALI}]_{\text{encontrada}} / \text{mg L}^{-1}$	Recuperação (%)
1	50,0	49,58	100,84
2		50,9	98,23
3		49,60	100,80
Média		50,02	99,94

Fonte: Dos autores (2016).

O melhor voltamograma obtido segue na Figura 27. Os dados onde constam os resultados da melhor varredura seguem na Tabela 19.

Figura 28 Estudos de recuperação e determinação analítica de alisquireno em tampão BR de 0,04 M, pH 8,0 sobre o eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração do Alisquireno de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Solução padrão de adição: (a) amostra, (b) 9,91, (c) 19,61, (d) 29,13, (e), 38,46 e (f) 47,62 mL



Fonte: Dos autores (2016).

Tabela 19 Recuperações de amostras de alisquireno (Rasilez<sup>®</sup>) em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições:  $f = 100,0$  Hz;  $E_{sw} = 50$  mV;  $E_S = 5$  mV ( $n = 3$ ).

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (R)	0,996
Concentração adicionada	50,0 mg L <sup>-1</sup>
Concentração encontrada (média)	49,76 mg L <sup>-1</sup> ± 0,37 / 49,58 mg L <sup>-1</sup> ± 0,42
RDS	0,80% / 0,90%
Recuperação (média)	99,94%
Quantidade de medidas realizadas (n)	3

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.7.3 Losartana

A losartana foi testada a níveis de recuperação, em uma solução estoque de 500 mg L<sup>-1</sup>, sendo que na célula eletroquímica havia um valor inicial de tampão BR pH 10,0 de 4,9 mL. A janela eletroquímica foi fixada no intervalo de 1,3 a 2,2 V, com frequência de 100,0 Hz e amplitude de 50 mV, sob técnica de voltametria de onda quadrada e eletrodo de diamante dopado com boro. Para testá-la fez-se uso da técnica de adição de padrão, em que a cada nova adição a solução sofria agitação e posterior descanso, para enfim ser levantado novo voltamograma. Os padrões foram adicionados em intervalos de 0,1 mL em que a concentração inicial no interior da célula, era da ordem de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Segundo os cálculos estatísticos, as medias das cinco varreduras realizadas foram de 10,36 mg L<sup>-1</sup>; com desvio padrão de 0,7153; intervalo de confiança de 10,36 mg L<sup>-1</sup> ± 0,105 (sob 95%) e média de recuperações de 103,68%.

Com a regressão linear feita pela extrapolação da reta cartesiana a níveis negativos, foi possível avaliar que os dados estatísticos condizem com os dados gráficos, para as cinco avaliações realizadas. O melhor voltamograma foi graficado na Figura 28, bem como os dados de recuperação obtidos através das cinco varreduras realizadas em SWV com DDB, na Tabela 20.

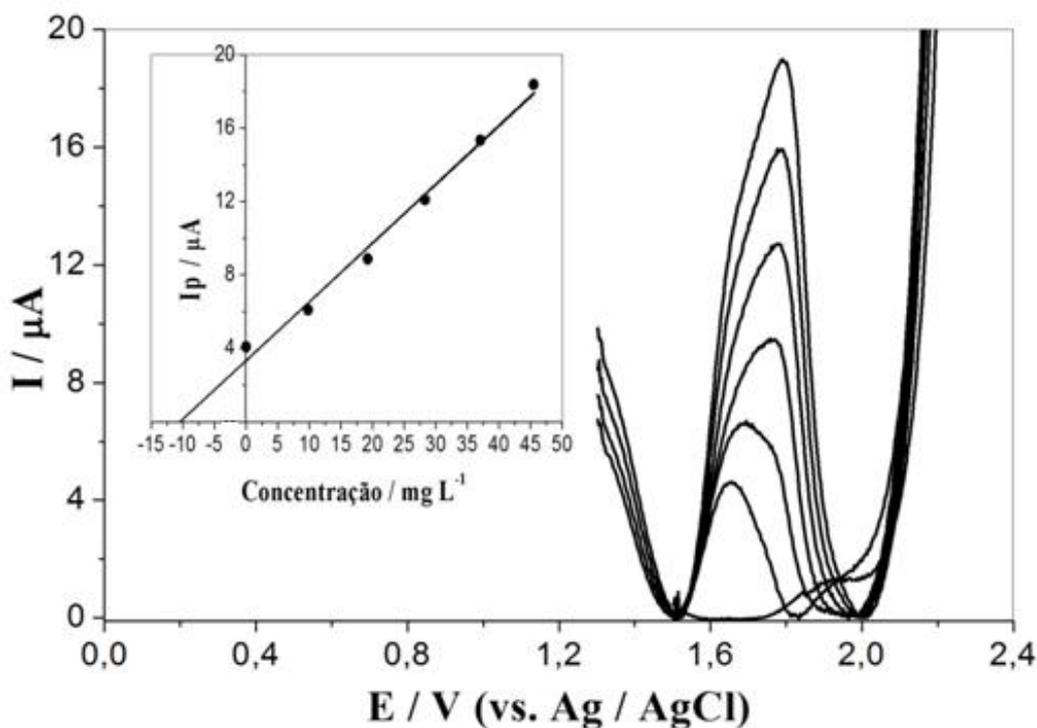
Tabela 20 Resultados de cinco recuperações para losartana  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , em eletrólito de tampão BR pH 10,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.

Replicata	$[\text{LOS}]_{\text{adicionada}} / \text{mg L}^{-1}$	$[\text{LOS}]_{\text{encontrada}} / \text{mg L}^{-1}$	Recuperação (%)
1	10,0	11,35	113,50
2		10,35	103,50
3		9,76	97,60
4		10,76	107,60
5		9,62	96,20
Média		10,36	103,68

Fonte: Dos autores (2016).

Os dados de corrente de pico em função da variação da concentração, da varredura escolhida, estão graficados na Figura 28. Os dados onde constam os resultados da varredura seguem na Tabela 21.

Figura 29 Estudos de recuperação e determinação analítica de losartana em tampão BR de  $0,04 \text{ M}$ , pH 10,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de losartana de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,1; (c) 0,2; (d) 0,3; (e) 0,4 e (f)  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ .



Fonte: Dos autores (2016).

A melhor curva escolhida para losartana  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , apresentou uma inclinação em slope de  $0,321 \text{ A/mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,988$ .

Tabela 21 Recuperações de amostras de losartana em produtos comerciais que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições:  $f = 100,0 \text{ Hz}$ ;  $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ ;  $E_S = 5 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ), intervalo de confiança de 95% =  $10,36 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,105$ .

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (R)	0,988
Concentração adicionada 1	$10,0 \text{ mg L}^{-1}$
Concentração encontrada (média)	$10,36 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,7153$
RDS	0,96%
Recuperação (média)	103,68
Quantidade de medidas realizadas (n)	5

Fonte: Dos autores (2016).

Através dos testes de recuperação, podemos perceber que o uso do eletrodo de diamante dopado com boro é eficiente para tais análises, assim como a técnica de voltametria de onda quadrada, na quantificação de losartana, captopril e alisquirino, em concentrações relativamente baixas. O maior percentual de recuperação se deu para o captopril, como já previsto. Isso se deve ao fato do fármaco possuir uma maior facilidade de oxidação, bem como correntes de pico maiores, quando comparado aos outros fármacos estudados.

Quando comparamos os resultados obtidos com os constantes na literatura, comprovamos que o método aplicado é eficiente, provando, também, que as análises realizadas foram feitas livres de interferentes provindos de excipientes dos fármacos. Obteve-se, para os três fármacos, valores de recuperação próximos a 100% e RDS's relativamente baixos. Isso indica que as análises foram realizadas sem nenhuma interferência de espécies iônicas do eletrólito de suporte, tampouco excipientes dos fármacos, na exatidão e precisão do método.

Os três voltamogramas dos fármacos, não apresentam deslocamentos dos potenciais de pico, o que nos indica que a matriz dos comprimidos, também não influenciaram nos perfis voltamétricos. Assim sendo, podemos afirmar com segurança que a metodologia aplicada é eficiente por ter apresentado resultados satisfatórios, podendo ser utilizadas a outros níveis de pesquisa. Neste sentido, os

valores elevados das recuperações obtidas, nos possibilita partir para determinações analíticas, destes fármacos, em fluidos biológicos. Os testes até aqui realizados, nos permite afirmar que a técnica proposta pode ser empregada para análise quantitativa de controle de qualidade, nas indústrias farmacêuticas. Seguem abaixo os voltamogramas obtidos para cada fármaco, como também os valores de recuperação encontrados para cada um, na presença de plasma humano.

#### 4.8 TESTES DE RECUPERAÇÃO EM PLASMA HUMANO

Estudos realizados em espécies contidas em plasma humano necessitam de metodologias rápidas, eficientes e precisas, tais como as técnicas eletroanalíticas. Precisam ser rápidas para evitar a degradação e possível lise celular, que causem extravaso de conteúdos celulares plasmáticos no seio da solução, invalidando as análises. Eficientes para quantificar com segurança e exatidão os analitos presentes na amostra, sem que estes estejam associados ou mesmo reagidos a alguns componentes plasmáticos. E finalmente, precisas, para que não haja resposta eletroquímica de interferentes, como excipientes dos fármacos, nas resultantes de correntes de pico dos voltamogramas (Bard *et al.* 1944; Manoel 1922).

Assim sendo, ainda neste estudo, promovemos os ensaios de recuperação para quantificação de captopril e alisquireno na presença de plasma humano, seguindo a técnica de voltametria de onda quadrada, que nos forneceu todas as demandas necessárias para tanto. Fizemos uso de um eletrodo de diamante com boro, sendo que este não se mostrou sensível a qualquer possível interferente plasmático ou mesmo aos excipientes dos fármacos. Os resultados das varreduras em plasma foram considerados idênticos aos obtidos pelas varreduras realizadas em água pura.

As amostras de sangue utilizadas foram coletadas da própria autora da presente dissertação, em tubos de citrato de sódio e logo após centrifugados, onde pode-se obter o plasma. Logo após, as amostras de plasma foram dispersas nos respectivos tampões dos fármacos, em proporções pré-calculadas, onde foram adicionadas as alíquotas dos fármacos, fazendo uso do método de adição de padrão. Devido á vários imprevistos surgidos ao longo dos 24 meses de trabalho, não foi possível a realização da quantificação de losartana em plasma humano. Em

curto prazo, pretendemos concluir os trabalhos para o citado fármaco, prosseguindo com uma possível publicação em revista de interesse.

Os picos eletroquímicos de alisquireno e captopril se mostraram bem definidos, livre de ruídos e interferentes. Ambos os fármacos tiveram desprendimento de pico em valores mais positivos a que em formulações farmacêuticas. Esse leve deslocamento se deve ao fato de estarem em presença de plasma, onde alguma espécie ali presente pode promover algum tipo de interação com os fármacos, dificultando sua oxidação. Todavia, tal deslocamento não foi levado em consideração, uma vez que se deu em níveis muito baixos, considerados irrelevantes.

As Figuras 29 e 30 demonstram a curva de adição de padrão, para cada fármaco estudado, cujos dados obtidos fornecem excelente linearidade da corrente de pico em função da variação da concentração, bem como coeficientes de correlação relativamente bons, sendo de 0,997 para alisquireno e 0,999 para captopril, com percentagens de recuperação de 95,5-97,8% para alisquireno e de 100,96% para captopril. Os resultados obtidos demonstram que as análises podem ser realizadas com máxima confiabilidade, em plasma humano e que o eletrodo de DDB mostra uma resposta estável e reprodutível, sem qualquer influência de interferentes, normalmente existentes no sangue humano. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 23 e 25, assim como a média das varreduras realizadas, constam nas Tabelas 22 e 24.

#### **4.8.1 Captopril**

A quantificação de captopril em plasma humano foi realizada em uma solução estoque de concentração igual a  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ; com 4,8 mL de tampão BR pH 2,0; 0,2 mL de plasma humano; em janela eletroquímica estabilizada de 1,0 á 2,2 V, frequência de 10,0 Hz e amplitude de 50 mV, sob técnica de voltametria de onda quadrada.. As adições de padrão do fármaco foram de 0,6 em 0,6 mL, sendo que a cada adição a solução sofria agitação e logo após descanso de 10 segundos, antes de ser levantado um novo voltamograma.

Nas análises em plasma para captopril, fez-se necessário a alteração do pH do meio eletrolítico. Ao que as análises apresentavam bons resultados em pH 8,0 para amostras comerciais em água destilada, não se fez eficaz na presença de

plasma humano, sendo necessária a utilização de tampão BR pH 2,0 para este fim analítico. Após alguns estudos em literaturas que tratam a respeito da fisiologia humana, concluímos que isto ocorreu na molécula de captopril, devido à sua forte afinidade em meios biológicos com pH's relativamente alcalinos. Portanto, um paciente que faz uso de tal medicamento, será beneficiado no controle da PA, a partir do momento em que o fármaco se dirige a seu sítio ativo para ligar-se a seu substrato, sendo veiculado, até lá, pelas células epiteliais sanguíneas. O tamponamento do sangue, como sabemos, mantém o pH em torno de 7,4; sendo que em caso de acidose ou alcalose o paciente será comprometido em relação à sua saúde. Logo, as células sanguíneas que serão responsáveis pelo transporte de captopril até seu sítio ativo, para cumprir os propósitos a que é recomendado, são de caráter ligeiramente alcalino para garantir afinidade célula / fármaco até a chegada ao sítio ativo, onde haverá uma pequena mudança no pH local fazendo com que a molécula do fármaco se "desprenda" das células sanguíneas de transporte para se clivar ao seu substrato no interior de seu sítio ativo. Pensando nesta lógica, percebemos que no interior da célula eletroquímica, em presença de células sanguíneas e um eletrólito de pH próximo a 7,4 (no caso o pH 8,0 usado nas formulações farmacêuticas) as moléculas do fármaco estarão ligadas às células sanguíneas presente no plasma, de forma a ser impedido pelo próprio meio, a ser oxidado no eletrodo de DDB, já que tal afinidade com células plasmáticas impedirão o contato molécula do fármaco / eletrodo de DDB. Assim sendo, deverá haver uma perturbação do meio eletrolítico, com relação ao pH, para promover a quebra da ligação existente entre a molécula do fármaco e as células plasmáticas, permitindo que o analito seja oxidado pelo eletrodo de DDB, fornecendo uma corrente de pico diretamente proporcional à sua atividade e concentração. Pensando nisto, alteramos o pH do tampão BR de 8,0 para 2,0 no intuito de acidificar o meio e promover a quebra da interação entre fármaco / células plasmáticas. Todavia o mesmo não se faz necessário para análises em formulações farmacêuticas sem adição de plasma, pois neste caso não há uma "simulação" de organismo humano contendo células sanguíneas afins da molécula de captopril, o que permite que esta esteja livre para sofrer contato com o eletrodo de DDB e ser finalmente oxidada fornecendo sua corrente de pico específica. Todavia, o processo não se fez necessário para os estudos de alisquireno, devido às suas especificidades moleculares.

Ao final das análises quantitativas, foram realizados cálculos estatísticos onde a média das cinco varreduras realizadas foi de 32,34 mg L<sup>-1</sup>, sendo que a concentração inicial no interior da célula era de 32,14 mg L<sup>-1</sup>; coeficiente de correlação de 0,999; desvio padrão de 0,206; percentagem média das recuperações de 100,61% e intervalo de confiança de 32,34 mg L<sup>-1</sup> ± 0,04 (para 95% de confiança).

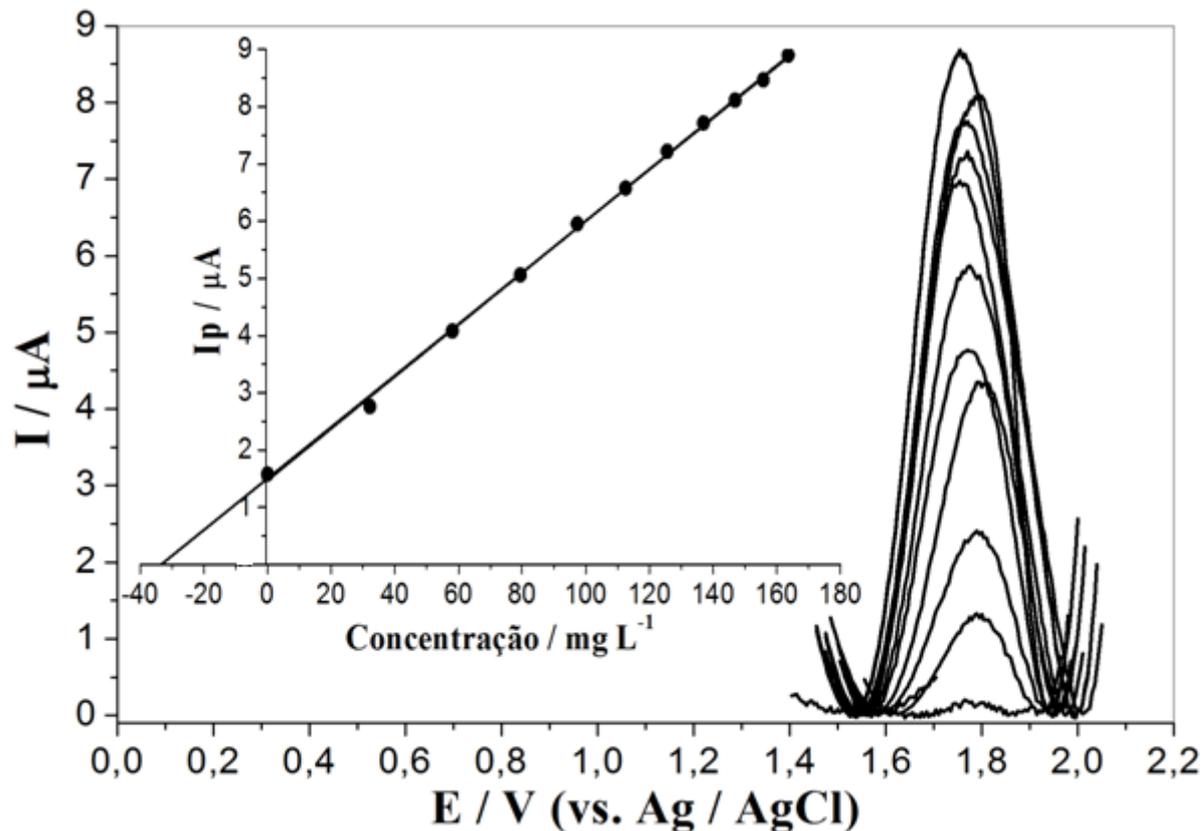
Com a realização da regressão linear sobre a extrapolação da reta a níveis negativos no plano cartesiano, pode-se perceber que os dados estatísticos conferem com os dados gráficos. Na Tabela 22 estão os dados designados das cinco varreduras realizadas.

Tabela 22 Resultados de cinco recuperações em plasma para captopril 32,14 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólito de tampão BR pH 2,0, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.

Replicata	[CAP] <sub>adicionada</sub> / mg L <sup>-1</sup>	[CAP] <sub>encontrada</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Recuperação (%)
1	32,14	32,43	100,90
2		32,03	99,65
3		32,55	101,27
4		32,24	100,31
5		32,45	100,96
Média		32,34	100,61

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 30 Estudos de recuperação e determinação analítica de captopril em plasma humano, com tampão BR de 0,04 M, pH 2,0 em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A. Concentração de captopril de 32,14 mg L<sup>-1</sup>. Solução padrão de adição: (a) amostra; (b) 0,6; (c) 1,2; (d) 1,8; (e) 2,4; (f) 3,0; (g) 3,6; (h) 4,2; (i) 4,8; (j) 5,4 e (k) 6,0 mL.



Fonte: Dos autores (2016).

A melhor curva escolhida para captopril 32,14 mg L<sup>-1</sup>, apresentou uma inclinação em slope de 0,0,0453 A/mol L<sup>-1</sup>,  $r = 0,999$ .

Tabela 23 Recuperações de amostras de captopril em plasma humano, que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições:  $f = 10,0$  Hz;  $E_{sw} = 50$  mV;  $E_S = 5$  mV ( $n = 5$ ); intervalo de confiança de 95% = 32,34 mg L<sup>-1</sup>  $\pm$  0,04.

Parâmetro	Valor
Coeficiente de correlação (R)	0,999
Concentração adicionada	32,14 mg L <sup>-1</sup>
Concentração encontrada (média)	32,34 mg L <sup>-1</sup> $\pm$ 0,206
Recuperação (média)	100,61%
Quantidade de medidas realizadas (n)	5

Fonte: Dos autores (2016).

#### 4.8.2 Alisquireno

Alisquireno foi investigado em plasma humano sobre 9,0 mL de tampão no mesmo pH das recuperações realizadas em formulações farmacêuticas (8,0), em uma solução de concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>; com janela eletroquímica fixada de 0,8 a 1,3 V, frequência de 100,0 Hz e amplitude de 50 mV, sob voltametria de onda quadrada com eletrodo de DDB.

Os testes foram realizados sobre técnica de adição de padrão, onde a cada nova adição a solução sofria uma agitação e após descanso por 10 segundos. A concentração inicial na célula era de 9,0 mg L<sup>-1</sup>, e a média das concentrações realizadas em triplicata, de 8,8 mg L<sup>-1</sup>; com desvio padrão de 0,3 e percentagem de recuperação de 95,5-97,8%.

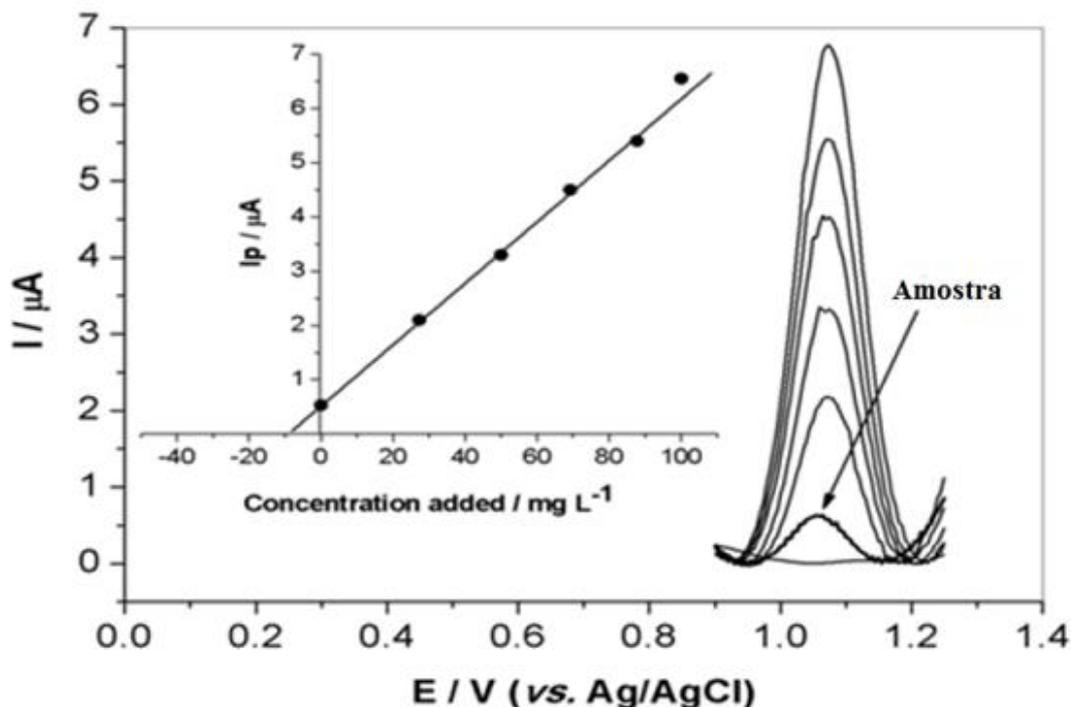
Os dados obtidos por cálculos estatísticos condiziam com os dados obtidos na regressão linear, obtida com os gráficos traçados. As análises para alisquireno foram feitas em três varreduras, onde se calculou a média entre as medidas, constantes na Tabela 24.

Tabela 24 Resultados de três recuperações para alisquireno 9,0 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólito de tampão BR pH 8,0 e plasma humano, obtidos em SWV com eletrodo de DDB.

Replicata	[CAP] <sub>adicionada</sub> / mg L <sup>-1</sup>	[CAP] <sub>encontrada</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Recuperação (%)
1	9,0	8,60	95,55
2		8,80	97,77
3		8,75	97,22
Média		8,71	96,84

Fonte: Dos autores (2016).

Figura 31 Estudos de recuperação e determinação analítica do alisquireno em tampão 0,04 M BR, pH 8,0; em um eletrodo de DDB em condições otimizadas para a amostra A (soro humano). Concentração da solução padrão de alisquireno adicionados: (a) amostra (9,0 mg L<sup>-1</sup>). (B) 27,7; (C) 50,0; (D) 69,23; (E) de 87,7 e (f) 100 mg L<sup>-1</sup>.



Fonte: Dos autores (2016).

Tabela 25 Recuperações de amostras de alisquireno em plasma humano que utilizam os experimentos SWV, realizados utilizando as seguintes condições:  $f = 100,0$  Hz;  $E_{sw} = 50$  mV;  $E_S = 5$  mV ( $n = 5$ ).

Parâmetro	Valor
Coefficiente de correlação (R)	0,997
Concentração adicionada	9,0 mg L <sup>-1</sup>
Concentração encontrada (média)	8,80 mg L <sup>-1</sup> ± 0,3
Recuperação (média)	97,8%
Quantidade de medidas realizadas (n)	3

Fonte: Dos autores (2016).

Após a análise dos resultados designados acima, podemos concluir que a técnica de voltametria de onda quadrada, com uso do eletrodo de DDB, é viável para as análises de losartana, captopril e alisquireno, podendo ser usada em larga escala para análises de qualidade de fármacos, em indústrias de segmento farmacêutico.

# **CAPÍTULO 5**

## **CONCLUSÕES**

## 5 CONCLUSÕES

A detecção eletroquímica de fármacos é de grande importância devido à sua facilidade, rapidez e baixo custo, uma vez que muitos princípios ativos de diversos medicamentos são identificados e quantificados por técnicas analíticas de elevado custo, como por exemplo, por meio de métodos cromatográficos e espectroscópicos.

A metodologia tradicionalmente empregada nas análises de fármacos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo esta de elevado custo, onde os cromatógrafos podem alcançar valores acima de R\$100.000,00. É importante salientar que os métodos cromatográficos (HPLC) empregam grandes quantidades de solventes, que muitas vezes são caros e tóxicos. Contudo, a metodologia eletroquímica nos permite realizar análises de diversas substâncias em diferentes matrizes, sem que haja a necessidade de pré-tratamento das amostras, emprego de solventes caros e elevado tempo de análise, o que torna as análises rápidas e com custos muito acessíveis. O valor aproximado de um potenciostato portátil, que é o equipamento que foi empregado nas análises eletroquímicas, não representa mais do que 10 % do valor de um cromatógrafo (por volta de R\$ 10.000,00). Diante disso, através de resultados satisfatórios de pesquisas realizadas, enfatizamos as vantagens das técnicas eletroquímicas de análise, na obtenção de voltamogramas seguros, rápidos e viáveis financeiramente. Através dos voltamogramas aqui apresentados, provamos a obtenção de resultados quantitativos através do método proposto, levando em consideração a biodisponibilidade de cada fármaco analisado.

Os resultados obtidos em níveis plasmáticos para alisquireno e captopril poderão servir de parâmetros para relacionar a concentração do fármaco com a pressão arterial de pacientes que o utilizam. Neste sentido, a técnica se torna mais eficiente para quantificação de espécies em plasma que demais técnicas analíticas, pelo fato de ser rápida. Essa é sem dúvida a maior vantagem das técnicas eletroquímicas, pois análises exaustivas podem vir a provocar lise celular plasmático, invalidando a precisão da técnica, caso haja extravasamento das espécies celulares, fornecendo ao analista, um falso positivo de pico de corrente que não necessariamente será do analito investigado. Logo, a técnica aqui proposta foi eficientemente validada através de tratamentos dos dados obtidos e aplicação de cálculos estatísticos de exatidão (recuperação), precisão (cálculo de desvio padrão) e sensibilidade (LD e LQ).

Para a validação através da exatidão do método, curvas de recuperação quantitativas foram levantadas, onde obtivemos recuperações da ordem de 100,45% com desvio padrão de 0,02 e RDS de 0,99% para captopril; 99,94% com desvio padrão de 0,37 e RDS de 0,80% para alisquireno e de 103,68% com desvio padrão de 0,71 e RDS de 0,96% para losartana. Os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,994 para captopril, 0,996 para alisquireno e 0,988 para losartana. Referindo-se à exatidão da técnica, podemos através dos resultados obtidos, considerar a técnica exata, pois os valores de recuperação obtidos foram satisfatórios e condizentes com a literatura já existente.

No caso dos estudos de recuperação realizados em plasma humano, os resultados também foram satisfatórios para captopril e alisquireno, uma vez que obtivemos percentagem de recuperação de 100,61% com desvio padrão de 0,206 e  $r$  de 0,999 para captopril; e 97,8% com desvio padrão de 0,3 e  $r$  de 0,997 para alisquireno. Os valores obtidos coincidem nas várias varreduras realizadas para os fármacos, e são também condizentes com a literatura. Além do mais, a exatidão comprovada pelos testes de recuperação indica que não houve ação de interferentes, sejam plasmáticos, sejam de excipientes provindos do fármaco, na corrente de pico obtida, invalidando o processo. Os resultados obtidos através do desvio padrão dos fármacos também provam que a técnica proposta é precisa, pois os desvios são baixos e estão dentro de erros sistemáticos aceitáveis em técnicas eletroanalíticas.

Quanto à sensibilidade, os fármacos foram testados em relação aos limites de detecção e quantificação, que se referem à menor concentração que pode ser detectada pelo eletrodo de trabalho sem necessariamente ser quantificada (LOD) e à menor concentração que pode ser quantificada pelo DDB (LOQ). Os limites de detecção e quantificação foram da ordem de  $6,67 \times 10^{-8}$  M e de  $2,22 \times 10^{-7}$  M, respectivamente, para captopril ( $r = 0,995$ ); de  $2,64 \times 10^{-8}$  M e de  $8,82 \times 10^{-8}$  M, respectivamente, para losartana ( $r = 0,997$ ) e de  $2,5 \times 10^{-8}$  M e de  $8,4 \times 10^{-8}$  M, respectivamente, para alisquireno ( $r = 0,997$ ). Os valores baixos de LOD e LOQ encontrados para os fármacos demonstram que a técnica é sensível e pode ser trabalhada com amostras em baixas concentrações, obtendo dados satisfatórios e reprodutíveis.

Concluimos, então, que a técnica de SWV aqui proposta para quantificação de losartana, captopril e alisquireno, com uso de eletrodo de diamante dopado com

boro, é sensível, exata e precisa, dentro dos parâmetros necessários para quantificação dos fármacos trabalhados, podendo ser usada com segurança, em larga escala nas indústrias farmacêuticas, no intuito de promover testes de controle de qualidade após síntese de fármacos, onde haverá vasto interesse econômico, uma vez que tais testes são hoje realizados por técnicas dispendiosas, exaustivas e caras.

## **CAPÍTULO 6**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abt, B. et al., 2016. **Electrochemical Determination of Sulphur-containing Pharmaceuticals Using Boron-doped Diamond Electrodes.** *Electroanalysis*, p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201501150>.
- Adireddy, V. et al., 2013. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for aliskiren a novel renin inhibitor in micro-volumes of human plasma a pharmacokinetic application in healthy South Indian male subjects.** *Biomedical Chromatography*, 27(8), pp.1062–1069.
- Akyu, A., 2014. **Simultaneous Determination of Amlodipine and Aliskiren in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography.** , pp.685–690.
- Anon, **VP10 = Rasilez AmLo\_Bula\_Paciente.** , pp.1–8.
- Ashok, S., Varma, M.S. & Swaminathan, S., 2012. **A validated LC method for the determination of the enantiomeric purity of aliskiren hemifumarate in bulk drug samples.** *Journal of Chromatographic Science*, 50(9), pp.799–802.
- Aydın Yiğit ; Yavuz Yardım ; Zühre Şentürk, 2015. **Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, and Aspirin in Pharmaceutical Formulations.** *IEEE Sensors Journal*, 16(6), pp.1674 – 1680.
- Aydo, Z., 2015. **Simultaneous Determination of Aliskiren , Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Spiked Human Plasma and Urine by High Performance Liquid Chromatography 1.** , 70(4), pp.502–509.
- Aydogmus, Z., 2012. **Spectrofluorimetric determination of aliskiren in dosage forms and urine.** *Luminescence*, 27(6), pp.489–494.
- Aydogmus, Z., Sari, F. & Ulu, S.T., 2012. **Spectrofluorimetric determination of aliskiren in tablets and spiked human plasma through derivatization with dansyl chloride.** *Journal of Fluorescence*, 22(2), pp.549–556.
- Bard, A.J. et al., 1944. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications.**
- De Barros, R.D.C.M. et al., 2005. **Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização.** *Quimica Nova*, 28(2), pp.317–325.
- Barroso, A.M.D., 2013. **Hipertensão Arterial Sistêmica 044.** *Diretrizes Clínicas: Protocolos línicos*, pp.1–32.

Beitollahi, H. et al., 2015. **Preparation, Characterization and Electrochemical Application of ZnO-CuO Nanoplates for Voltammetric Determination of Captopril and Tryptophan Using Modified Carbon Paste Electrode.** *Electroanalysis*, 27(7), pp.1742–1749. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201500016>.

Bolattin, M.B. et al., 2015. **Oxidative degradation of the antihypertensive drug losartan by alkaline copper(III) periodate complex in the presence and absence of ruthenium(III) catalyst: a kinetic and mechanistic study of losartan metabolite.** *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 146(10), pp.1649–1663. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00706-015-1431-x>.

Brasil, M. da S., 2001. **Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Mellitus - Protocolo.**

Braun-Menendez, E. et al., 1940. **The substance causing renal hypertension.** *J. Physiol*, 98, pp.283–298.

Brito, N.M. et al., 2003. **Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão.** *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13, pp.129–146.

Burckhardt, B.B., Tins, J. & Laeer, S., 2014. **Simultaneous quantitative and qualitative analysis of aliskiren, enalapril and its active metabolite enalaprilat in undiluted human urine utilizing LC-ESI-MS/MS.** *Biomedical Chromatography*, 28(12), pp.1679–1691.

Carvalho, F.H.O. et al., 2015. **Analytical determination of aliskiren in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrodes.** *Analytical Methods*.

Chaves, S.C. et al., 2015. **Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode.** *Electroanalysis*, 27(12), pp.2785–2791.

Chobanian, A. V. et al., 2003. **Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** *Hypertension*, 42(6), pp.1206–1252.

Ciências, D. De et al., 2011. **Artigo. , 34(9)**, pp.1575–1581.

Ebeid, W.M. et al., 2014. **Synchronized separation of seven medications representing most commonly prescribed antihypertensive classes by using reversed-phase liquid chromatography: Application for analysis in their combined formulations.** *Journal of Separation Science*, 37(7), pp.748–757.

Einaga, Y., Foord, J.S. & Swain, G.M., 2014. **Diamond electrodes: Diversity and maturity.** *MRS Bulletin*, 39(06), pp.525–532. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0883769414000943](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0883769414000943).

El-Bagary, R.I. et al., 2014. **Ion-Pair LC Method for Simultaneous Determination of Aliskiren Hemifumarate, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide in Pharmaceuticals.** *Chromatographia*, 77(3-4), pp.257–264. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-013-2592-6>.

Electrochemistry, A., 2000. **Second Edition Analytical.**

El-hay, S.S.A., El-mammli, M.Y. & Shalaby, A.A., 2011. **Determination of clemastine hydrogen fumarate , desloratadine , losartan potassium and moxepiril HCl through binary complex formation with eosin.** *ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.06.021>.

Ensafi, A. a. & Arabzadeh, a., 2012. **A new sensor for electrochemical determination of captopril using chlorpromazine as a mediator at a glassy carbon electrode.** *Journal of Analytical Chemistry*, 67(5), pp.486–496. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1061934812050024>.

Ensafi, A.A. & Hajian, R., 2008. **Determination of losartan and triamterene in pharmaceutical compounds and urine using cathodic adsorptive stripping voltammetry.** *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24(11), pp.1449–1454.

Ferreira Vitoreti, A.B. et al., 2014. **Electroanalytical determination of captopril in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrodes.** *International Journal of Electrochemical Science*, 9(3), pp.1044–1054.

Freitas, J.M., 2015. **Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8- cloroteofilina , difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. , p.110.**

Friedrich, S. & Schmieder, R.E., 2013. **Review of direct renin inhibition by aliskiren.** *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, pp.2013–2016. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873285>.

Gholivand, M.B. & Khodadadian, M., 2013. **Simultaneous Voltammetric Determination of Captopril and Hydrochlorothiazide on a Graphene/Ferrocene Composite Carbon Paste Electrode.** *Electroanalysis*, 25(5), pp.1263–1270.

Golan, D.E., Tashjian, a. H. & Armstrong, a. W., 2009. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** *Guanabara Koogan*, pp.166–185.

Goyani, V. et al., 2013. **Simultaneous quantification of aliskiren, valsartan and sitagliptin by LC with fluorescence detection: Evidence of pharmacokinetic interaction in rats.** *Chromatographia*, 76(9-10), pp.515–521.

Grupo Hospitalar Conceição, 2009. **Protocolo de Hipertensão Arterial Sistêmica para a Atenção Primária em Saúde.**

Guedes, T. de J. et al., 2015. **Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode.** *Journal of Solid State Electrochemistry*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10008-015-3105-3>.

Guyton, A. & Hall, J., 2010. *Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica*.

He, Y. et al., 2015. **Investigation of boron-doped diamond on porous Ti for electrochemical oxidation of acetaminophen pharmaceutical drug.** *Jeac*, 759, pp.167–173. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.11.011>.

Jalali, F. & Ranjbar, S., 2014. **Electrocatalytic oxidation of captopril using a carbon-paste electrode modified with copper-cobalt hexacyanoferrate.** *Russian Journal of Electrochemistry*, 50(5), pp.482–489. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1023193513120082>.

Karimi-Maleh, H. et al., 2014. **Voltammetric determination of captopril using a novel ferrocene-based polyamide as a mediator and multi-wall carbon nanotubes as a sensor.** *Journal of Analytical Chemistry*, 69(2), pp.162–168. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893935032&partnerID=40&md5=9f4db7dfed1446b475c7ca5d3e2fd7e3>.

Khan, S. et al., 2014. **Determination of captopril using selective photoluminescence enhancement of 2-mercaptopropionic modified CdTe quantum dots.** *Materials Research Express*, 1(2), p.026202. Available at: <http://stacks.iop.org/20531591/1/i=2/a=026202?key=crossref.be7f0706e7f1af75a2669f4e6aff3ee6>.

Kuśmierk, K. & Bald, E., 2007. **A Simple Liquid Chromatography Method for the Determination of Captopril in Urine.** *Chromatographia*, 66(1-2), pp.71–74.

Lee, H.W. et al., 2009. **Hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometric analysis of irbesartan in human plasma: Application to pharmacokinetic study of irbesartan.** *Journal of Separation Science*, 32(14), pp.2353–2358. Available at: <Go to ISI>://WOS:000268595800003\nhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jssc.200900148/asset/2353\_ftp.pdf?v=1&t=h6j9z37j&s=3dc3566bd23865238964ba692e5a1e2acebf8e90.

Lima, A.B. et al., 2014. **Simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical samples by differential pulse voltammetry using a boron-doped diamond electrode.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(3), pp.478–483.

Long, S.Y. et al., 2015. **Quantitative detection of captopril in tablet and blood plasma samples by the combination of surface-enhanced Raman spectroscopy with multiplicative effects model.** *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(7), pp.605–609.

Lotufo, P.A. et al., 1998. **Mortalidade Precoce por Doenças do Coração no Brasil. Comparação com Outros Países.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 70(5), pp.321–325. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v70n5/3328.pdf>.

Lourenção, B.C., 2009. **Determinação Voltamétrica Simultânea de Paracetamol e Cafeína e de Ácido Ascórbico e Cafeína em Formulações Farmacêuticas Empregando um Eletrodo de Diamante Dopado com Boro.**

Lourencao, B.C., Medeiros, R.A. & Fatibello-Filho, O., 2015. **Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 754, pp.154–159. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665715003100>.

Mannemala, S.S. & Nagarajan, J.S.K., 2015. **Development and validation of a HPLC-PDA bioanalytical method for the simultaneous estimation of Aliskiren and Amlodipine in human plasma.** *Biomedical Chromatography*, 29(3), pp.346–352.

Manoel, L., 1922. **Voltametria : Conceitos e Técnicas.** , (li).

Mansano, G.R. & Sartori, E.R., 2015. **Short Comunnication Oxidação Eletroquímica de Anlodipino e Hidroclorotiazida Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro : Potencialidade de Determinação Simultânea em Urina.** , 7(1).

Mansour, F.R. & Danielson, N.D., 2012. **Separation methods for captopril in pharmaceuticals and biological fluids.** *Journal of Separation Science*, 35(10-11), pp.1213–1226.

Mavromoustakos, T. et al., 1999. **An effort to understand the molecular basis of hypertension through the study of conformational analysis of Losartan and Sarmesin using a combination of nuclear magnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(10), pp.1714–1722.

Melorose, J., Perroy, R. & Careas, S., 2015. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, 1.

Ministério da Saúde, 2006. **Hipertensão Arterial Sistemica**, Available at: [http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos\\_ab/abcdad15.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcdad15.pdf).

Negrão, C.E., Urbana, M. & Rondon, P.B., 2001. **Exercício físico , hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial.** *Rev Bras Hipertens*, 8(1), pp.89–95. Available at: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=284130&indexSearch=ID>.

Nikkho, Z. & Ltda, F., **Losartana potássica.** , pp.1–11.

Oliveira Rossini, P., Felix, F.S. & Angnes, L., 2012. **A simple and precise conductometric method for the determination of losartan in pharmaceutical products.** *Central European Journal of Chemistry*, 10(6), pp.1842–1849. Available at: <http://link.springer.com/10.2478/s11532-012-0110-6>.

Page, I.H. & Helmer, O.M., 1940. **A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting From the Reaction Between Renin and Renin-Activator.** *The Journal of experimental medicine*, 71(1), pp.29–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2134997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Pamuk, D. et al., 2013. **Redox pathways of aliskiren based on experimental and computational approach and its voltammetric determination.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(8), pp.1276–1286.

Paterakis, N. et al., 2012. **The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates.** *Journal of Hazardous Materials*, 199-200, pp.88–95. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.075>.

Perdew, J., Burke, K. & Ernzerhof, M., 1996. **Generalized Gradient Approximation Made Simple.** *Physical review letters*, 77(18), pp.3865–3868. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10062328>.

Pereira, G.F. et al., 2012. **Electrochemical degradation of bisphenol A using a flow reactor with a boron-doped diamond anode.** *Chemical Engineering Journal*, 198-199, pp.282–288. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.170>.

Pereira, P.F. et al., 2016. **A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 766, pp.87–93. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665716300352>.

Perez, C., Simões, F.R. & Codognoto, L., 2015. **Voltammetric determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode.** *Journal of Solid State Electrochemistry*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10008-015-3091-5>.

Politi, A. et al., 2011. **Conformational properties and energetic analysis of aliskiren in solution and receptor site.** *Molecular Informatics*, 30(11-12), pp.973–985.

Pronina, O.G. et al., 2012. **Quantitative Determination of Losartan and Its Metabolite E 3174 in Rat Urine.** , 67(3), pp.133–135.

Rajabzadeh, N. et al., 2015. **A Highly Sensitive Sensor Based on Reduced Graphene Oxide, Carbon Nanotube and a Co (II) Complex Modified Carbon Paste Electrode: Simultaneous Determination of Isoprenaline, Captopril and Tryptophan.** *Electroanalysis*, 27(12), pp.2792–2799.

Salamanca-Neto, C.A.R. et al., 2016. **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*, 230, pp.630–638. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.071>.

Salim, M.M. et al., 2014. **Simultaneous determination of aliskiren hemifumarate, amlodipine besylate, and hydrochlorothiazide in their triple mixture dosage form by capillary zone electrophoresis.** *Journal of Separation Science*, 37(9-10), pp.1206–1213.

Santos, A.M. et al., 2015. **Flow injection simultaneous determination of acetaminophen and tramadol in pharmaceutical and biological samples using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode.** *Diamond and Related Materials*, 60, pp.1–8. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925963515300546>.

Santos, J.R. & Rangel, A.O.S.S., 2015. **Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee.** *Food Chemistry*, 187, pp.152–158.

Santos, M.C.G. et al., 2013. **Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations.** *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 188(March 2016), pp.263–270.

Sartori, E.R. et al., 2009. **Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(2), pp.360–366.

Shah, H.J. et al., 2009. **Original Paper Rapid determination of losartan and losartan acid in human plasma by multiplexed LC–MS/MS.** , pp.3388–3394.

Shah, P.A., Sharma, P. & Shah, J. V, 2015. **Simultaneous analysis of losartan , its active metabolite , and hydrochlorothiazide in human plasma by a UPLC-MS / MS method.** , pp.714–733.

Silva, L.P. et al., 2014. **SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS** Introdução Resultados e Discussão. , p.2012.

Souza, D. De et al., 2004. **Revisão.** , 27(5), pp.790–797.

Souza, D. De et al., 2003. **Revisão.** , 26(1), pp.81–89.

Stanković, D.M. et al., 2016. **Sensitive and selective determination of riboflavin (vitamin B2) based on boron-doped diamond electrode.** *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly*, 147(6), pp.995–1000. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00706-016-1665-2>.

Teófilo, R.F. et al., **Quantificação Simultânea De Dopamina, Ácido Úrico E Ácido Ascórbico Com Eletrodo De Diamante Dopado Com Boro Usando Voltametria E Pls.** , pp.9–11.

Tortora, G. & Derrickson, B., 2013. **Principios de Anatomía y Fisiología.**

Tzanavaras, P.D. et al., 2003. **Flow and sequential injection manifolds for the spectrophotometric determination of captopril based on its oxidation by Fe(III).** *Mikrochimica Acta*, 142(1-2), pp.55–62.

Wirley, F. & Ribeiro, P., 2010. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de haloperidol em formulações comerciais.**

Yan, Z. et al., 2012. **Enhanced degradation of phenanthrene and pyrene in freshwater sediments by combined employment of sediment microbial fuel cell and amorphous ferric hydroxide.** *Journal of Hazardous Materials*, 199-200, pp.217–225. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.087>.

Ziyatdinova, G.K., Budnikov, G.K. & Pogorel'tsev, V.I., 2006. **Determination of captopril in pharmaceutical forms by stripping voltammetry.** *Journal of Analytical Chemistry*, 61(8), pp.798–800.

#### *Endereços Eletrônicos:*

1 <http://www.guiadafarmacia.com.br/edicao-254-especial-farmaceutico/7388-patentes-de-medicamentos>

2 <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/anvisa-interdita-lote-de-medicamento-indicado-para-hipertensao>);

3 <http://exame.abril.com.br/brasil/noticias/anvisa-interdita-lote-de-medicamento-para-hipertensao>).

# **ANEXOS**