

UTILIZAÇÃO DE INSTRUMENTAÇÃO ELETROANALÍTICA LAB-MADE PARA O ESTUDO E DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS, VITAMINAS E PESTICIDAS

► Resumo

O presente trabalho trata da aplicação de uma instrumentação lab-made no desenvolvimento de metodologias para a determinação de ranitidina (RNT), dipiridamol (DIP), cisteína (Cys), N-acetil cisteína (NAC), as vitaminas: ácido ascórbico (AA), nicotinamida (VPP), piridoxina (VB6) e o fungicida hidrazida maleica (MH) pela aplicação de técnicas eletroanalíticas. A instrumentação lab-made consiste de uma interface de computador contendo conversores que transformam o sinal de analógico para digital (A/D) e de digital para analógico (D/A) e 24 linhas a nível TTL para o controle externo da instrumentação. A interface opera pelo uso de um programa de computador Visual Basic® compatível com computador IBM. Nos procedimentos eletroanalíticos foi dado ênfase no emprego de ultramicroeletrodos (UMEs), eletrodo compósito bem como o eletrodo de carbono amorfo reforçado (GRC), e o eletrodo convencional de carbono vítreo aplicados em soluções em batelada ou em métodos de injeção em fluxo (FIA). Os resultados experimentais para a aplicação da metodologia são apresentados, bem como a comparação com resultados obtidos com o uso de metodologias convencionais já estabelecidas.

Palavras-chave: fármacos, vitaminas, pesticidas, técnicas eletroanalíticas, ultramicroeletrodos, sistema de instrumentação automatizado

► Summary

The present work deals with application of lab-made instrumentation in the development of electroanalytical methodology for determination of ranitidine (RNT), dipyrindamole (DIP), cysteine (Cys), N-acetyl cysteine (NAC), the vitamins ascorbic acid (AA), nicotinamide (VPP), pyridoxine (VB6) and the fungicide maleic hidrazide (MH) by application of electroanalytical techniques. The lab-made instrumentation consists of a computer interfacing containing an analog to digital (A/D) and digital to analog (D/A) converters and 24 TTL level lines for external instrumentation control. The interface is operating by using a properly developed Visual Basic® computer program running in a IBM compatible computer. In the electroanalytical procedures emphasis was put in the employment of ultramicroelectrodes (UMEs), composite electrode as the graphite reinforced carbon (GRC), and the conventional glassy carbon electrode applied to batch solutions or in flow injection (FIA) methods. Experimental results for the application of the methodology are present as well as the comparison with the results obtained with the use of ahead established more conventional methodologies.

Keywords: drugs, vitamins, pesticides, electroanalytical techniques, ultramicroelectrodes, automated instrumentation system

*Andréa Renata Malagutti
Renata Alves de Toledo
Deborah da Silva Comar
Marilza Castilho,
Rosângela Cristina Barthus
Luiz Henrique Mazo**

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

* Autor para correspondência
Caixa Postal 780
13560-970. São Carlos. SP
Fone: (16) 273-9922
Fax: (16) 273-9952
E-mail: mazo@iqsc.sc.usp.br

Introdução

A química analítica compreende o desenvolvimento de métodos, processos e técnicas aplicadas a amostras naturais visando a caracterização ou a quantificação de espécies químicas presentes. Dentre as técnicas analíticas existentes, os métodos eletroanalíticos compreendem um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de soluções do analito (1). A crescente elaboração de metodologias eletroanalíticas para o monitoramento de fármacos em fluídos biológicos (2,3), em formulações farmacêuticas (4,5) e também de pesticidas e vitaminas em alimentos e outras matrizes (6,7) estão diretamente relacionadas com a simplicidade, sensibilidade, seletividade e custo das análises, quando comparados com outros métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Por volta de 1970, algumas áreas da eletroanalítica e eletroquímica não eram largamente exploradas devido a algumas limitações da instrumentação e da utilização de eletrodos convencionais (8). Porém, com o advento dos ultramicroeletrodos (UMEs), pôde-se observar um crescimento expressivo no número de trabalhos, principalmente nas áreas de bioeletroquímica, monitoramento de poluentes em sistemas naturais e eletroquímica superficial (8). Os UMEs são caracterizados por apresentar uma de suas dimensões na ordem de micrômetros (entre 0,8 a 50 μ m) (9), resultando assim em algumas características peculiares, como a maior eficiência no transporte de massa devido à forma esférica da camada de difusão, a possibilidade de estudos eletroquímicos em soluções de baixa concentração ou mesmo na ausência de eletrólito de suporte, a simplificação do sistema experimental e o registro de voltamogramas em velocidades de varredura maiores que 10kV s⁻¹, sem a distorção das respostas obtidas. Várias formas geométricas podem ser empregadas para a construção dos UMEs, dentre elas cilindros, discos, hemisferas, bandas, anéis e na forma de conjuntos (arrays) contendo várias unidades. Além disso,

diversos materiais podem ser usados para a sua construção, como a fibra de carbono, platina, ouro, além de outros metais semi-nobres (10). A Figura 1 mostra de maneira esquemática (A) um UME com geometria de microdisco típico e (B) o perfil voltamétrico obtido em diferentes tempos de experimento com a variação da espessura da camada de difusão. Para tempos muito curtos, a transferência de massa ocorre por difusão linear com os voltamogramas apresentando o comportamento transiente característico de eletrodos convencionais. Para tempos usuais, o transporte de material ocorre por difusão esférica, com os voltamogramas apresentando a forma sigmoide característica de corrente de estado estacionário. A superfície dos UMEs pode ser modificada pela eletrodeposição de diversos metais, dentre eles o mercúrio e polímeros de natureza diversas. Os UMEs de mercúrio podem ser preparados por meio do crescimento de um eletrodepósito hemisférico ou quase-esférico sobre um substrato de geometria de microdisco (11).

Utilização de UMEs em sistema FIA (flow injection analysis)

A análise química por injeção em fluxo (FIA) pode ser definida como um processo que permite a automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carregador que a transporta em direção ao detector (12). Durante o percurso, podem ser provocados processos analíticos preparativos como diluições, separações e reações químicas antes do analito atingir o detector. O sistema FIA pode ser acoplado a maioria dos detectores utilizados para análise química (13,14), tais como espectrofotométricos, potenciométricos, voltamétricos, amperométricos e condutimétricos. Os detectores eletroquímicos são de grande utilidade devido à sua seletividade, sensibilidade e linearidade de resposta em uma ampla faixa de concentração. A própria natureza dos processos eletroquímicos, que geralmente ocorrem em uma superfície no lugar de ocorrer em um volume, torna-os bastante atrativos e convenientes para sistemas minituarizados de detecção que constituem a tendência atual para os sistemas analíticos, não só do tipo FIA como também a cromatografia líquida capilar (μ -LC) e a eletroforese capilar (CE).

Instrumentação Eletroanalítica

Apesar de sua grande versatilidade, a baixa corrente fornecida pelos UMEs da ordem de nano a picoamperes, implica na utilização de instrumentação específica que possa operar convenientemente nesse intervalo de corrente. Deve-se salientar a necessidade do uso de sistemas de filtro de ruídos e de isolamento eletrostático (gaiola de Faraday) para minimizar os ruídos de interferência presentes no sinal analítico.

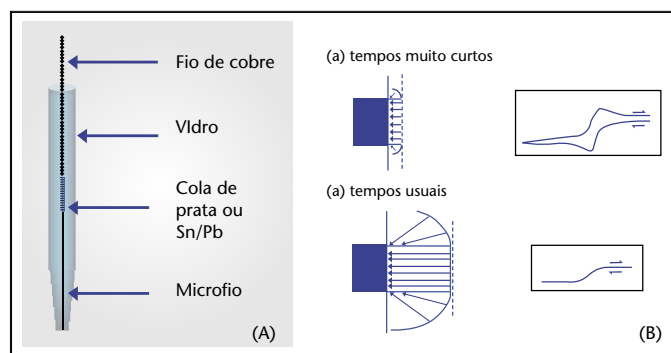


Figura 1. (A) Representação esquemática de um UME de microdisco. (B) Ilustração da dependência do processo difusional com o tempo de experimento em UME.

A instrumentação utilizada nos experimentos com UMEs, esquematizada na Figura 2, foi elaborada no próprio laboratório e automatizada com o emprego de um microcomputador IBM-PC capaz de executar os experimentos e processar os dados, sendo constituída de uma interface de conversão analógica/digital e digital/analógica (A/D,D/A) e de um software denominado AVOLM (analisador voltamétrico), em linguagem Microsoft Visual Basic®. O software permite controlar toda a instrumentação, sendo capaz, por meio de um sistema único, realizar vários experimentos sucessivamente visualizados em tempo real, podendo empregar inclusive diferentes técnicas eletroanalíticas, dentre elas: voltametria cíclica e linear, voltametria de redissolução de varredura linear, voltametria de redissolução de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, análise potenciométrica de redissolução, polarização por amostragem de corrente, cronoamperometria, potenciometria de redissolução diferencial e técnicas de determinação por pulso amperométrico para aplicação em sistemas FIA, CLAE ou μ -LC.

Além da utilização de UMEs, a instrumentação também pode ser empregada associada com equipamentos convencionais, consistindo de potenciostatos, polarógrafos e outros sistemas analíticos. No presente trabalho, é apresentada uma

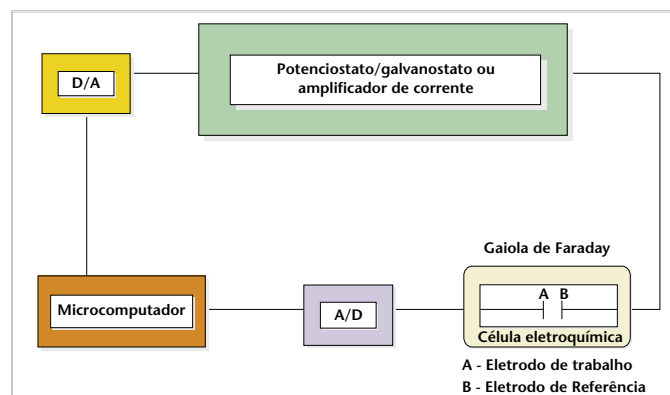


Figura 2. Fluxograma do sistema utilizado para os experimentos com UMEs.

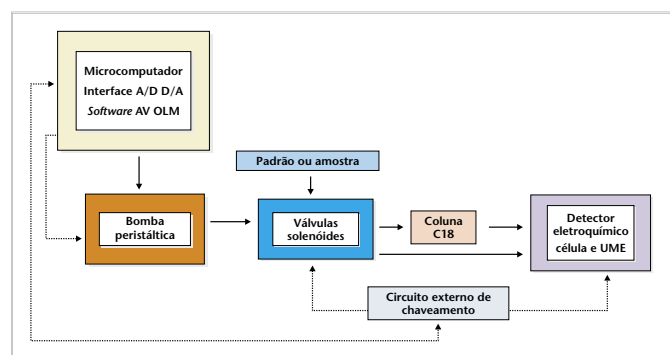


Figura 3. Fluxograma do sistema FIA. As linhas pontilhadas indicam o controle via computador por meio das interfaces e chaveamentos.

aplicação em que a instrumentação é utilizada em conjunto com o Polarographic Analyser (Modelo 174A) da Priceton Applied Research (PAR) conectado a um microcomputador PC e com o software AVOLM para controle e aquisição dos dados. Em outros experimentos é ainda utilizado o sistema comercial constituído por um potenciostato modelo PGZ 402-Voltalab da Radiometer Analytical com sistema para três eletrodos.

O sistema de injeção em fluxo desenvolvido no laboratório é constituído de uma bomba peristáltica ISMATEC Modelo IPC8, equipada com tubos de Tygon®, um conjunto de seis válvulas de três vias controladas pelo computador, um misturador, uma coluna cromatográfica lab-made C18, uma célula de detecção eletroquímica e um amplificador de corrente SRS-Model SR570, todos esquematizados no fluxograma da Figura 3. A automatização do sistema também é obtida utilizando a interface A/D, D/A e o software AVOLM, os quais acionam um circuito externo de chaveamento. Este circuito de chaveamento, com 24 vias de acesso permite a aquisição e o registro on-line do sinal de um ou mais detectores simultaneamente, e é capaz de captar o início de corridas efetuadas por injetores automáticos ou válvulas injetoras, bem como possibilita o acoplamento de um amplificador de corrente necessário na detecção eletroquímica com ultramicroeletrodos incluindo filtros que auxiliam na redução do ruído, e o acionamento de várias válvulas de alta e baixa pressão.

Células eletroquímicas

Para os estudos eletroquímicos em sistemas com UMEs e eletrodos convencionais, são utilizadas uma célula de vidro com capacidade de 10,0mL. A Figura 4 mostra uma célula eletroquímica típica, utilizada nos experimentos com UMEs.

Uma vez que as correntes registradas com UMEs são da ordem de nano a pico amperes, é eliminada a necessidade de controle de potencial do tipo potenciostático, assim a utilização de um eletrodo auxiliar torna-se dispensável. O resultado é a simplificação da instrumentação necessária para efetuar as medidas de corrente, e ainda a facilidade de miniaturização da célula.

Para o sistema em fluxo foram utilizadas células eletroquímicas do tipo *wall-jet*, levando-se em conta a geometria da célula, a qual apresenta maior eficiência no transporte de massa, minimiza o efeito da queda ôhmica, facilita a eliminação de bolhas e proporciona um volume adequado para que se evite a diluição da amostra.

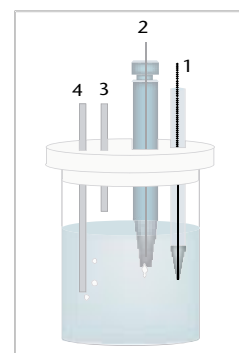


Figura 4. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com UME mostrando (1) eletrodo de trabalho (UME); (2) eletrodo de referência (Ag/AgCl(s)); (3) saída de gás; (4) entrada de nitrogênio.

Aplicações Analíticas

1. Reação de redução voltamétrica do dipiridamol e desenvolvimento de metodologia analítica para determinação em formulações farmacêuticas

O dipiridamol (DIP), 2,6-bis(dietanolamina)-4,8-dipiperidina-[5,4-d]pirimidina, cuja estrutura está representada na Figura 5(A), foi introduzido em 1959 como vasodilatador coronariano e antiagregante plaquetário, sendo ainda hoje muito utilizado em medicina para o tratamento de várias doenças cardiovasculares (15), além de outras aplicações recentes, como antioxidante a nível biológico (16), o que justificou a investigação de suas reações de oxidação em nosso laboratório (17,18). O estudo voltamétrico da reação de redução do DIP foi realizado em tampão fosfato (pH = 3) com ultramicroeletrodo de platina, contendo um depósito hemisférico de mercúrio (Hg-UME) e também com eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), empregando as técnicas de voltametria cíclica (CV), de varredura linear (LSV) e de onda quadrada (SWV) (19). Os estudos com Hg-UME e HMDE revelaram que a reação ocorre em duas etapas irreversíveis com o consumo de dois prótons e dois elétrons por etapa, sendo o número de elétrons ganhos dependente do pH da solução. As Figuras 5(A) e (B) mostram os perfis voltamétricos: (A) sigmoidal para Hg-UME, com correntes limites bem definidas, características de controle difusional de estado estacionário e (B) na forma de picos para HMDE devido ao esgotamento das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Um processo já conhecido de adsorção foi mostrado pelo emprego de tempos de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo (19).

O desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação do DIP em comprimidos e soluções injetáveis de Persantin® foi realizado a partir da otimização das condições experimentais com o objetivo de se obter maior sensibilidade analítica. A técnica escolhida foi a voltametria de onda quadrada com HMDE. A Figura 6 mostra os voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações do padrão e a curva analítica (Inserida na Figura

6, $R=0.9994$), correspondendo ao segundo pico de redução. O limite de detecção (LD) foi calculado pelo critério $LD=3\sigma/\theta$, no qual σ é o desvio padrão da média dos brancos e θ o coeficiente angular da curva analítica. Deste modo, o limite de detecção para o segundo pico foi de $9,49\mu\text{g L}^{-1}$.

A repetibilidade da metodologia proposta foi avaliada para concentrações de padrão na faixa da curva analítica, obtendo-se desvios padrão relativos menores que 1% ($n=5$). Os experimentos de adição e recuperação do DIP em comprimidos e soluções injetáveis de Persantin® foram realizados no intervalo de potencial referente ao segundo pico. A Tabela 1 mostra a concentração do medicamento adicionada, recuperada e a porcentagem de recuperação.

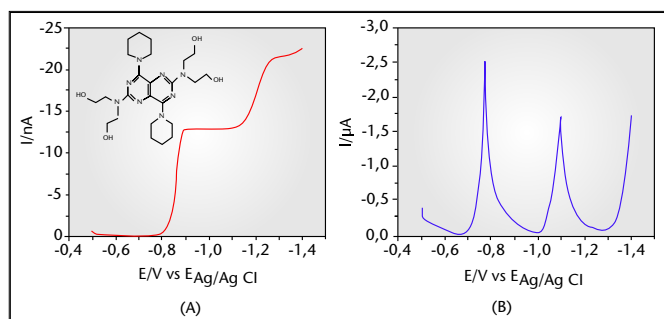


Figura 5. (A) Voltamograma de varredura linear utilizando Hg-UME e (B) Voltamograma de varredura linear utilizando HMDE para solução de DIP $0,5\text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH = 3, $v=50\text{ mV s}^{-1}$.

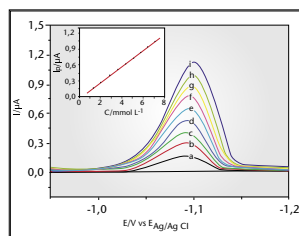


Figura 6. Voltamogramas de onda quadrada em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH=3,0 para as seguintes concentrações de DIP: (a) 1,28; (b) 2,09; (c) 2,87; (d) 3,63; (e) 4,36; (f) 5,06; (g) 5,73; (h) 6,39; (i) $7,02\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando HMDE, $f=100\text{ s}^{-1}$, $\Delta E_p=50\text{ mV}$ e $\Delta E_s=2\text{ mV}$. Inserido: curva analítica para o segundo pico.

Tabela 1. Valores da concentração do medicamento adicionada, recuperada e a porcentagem de recuperação referente ao intervalo de potencial do segundo pico de redução do DIP, utilizando SWV.

Conc. adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comprimido		Solução injetável	
	C. recuperada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Porcentagem de recuperação (%)	C. recuperada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Porcentagem de recuperação (%)
1,49	1,50	100,7	1,51	101,4
	1,51	101,4	1,49	100,0
	1,50	100,7	1,52	102,0
	1,49	100,0	1,51	101,3
	1,52	102,0	1,50	100,7

A porcentagem média de recuperação do DIP nas formulações farmacêuticas disponíveis foi de $100,9\% \pm 0,8\%$ (75,52mg) para o comprimido e $101,0\% \pm 0,8\%$ (10,11mg) para a solução injetável. Na embalagem de Persantin®, está rotulado que cada comprimido contém 75mg, enquanto que a solução injetável, 10mg do princípio ativo. Os resultados obtidos revelam que a quantidade de medicamento adicionada e recuperada mostra-se coerente com a informação prescrita pelo fabricante e que não há interferência significativa da matriz desses medicamentos na metodologia analítica desenvolvida.

2. Oxidação Eletroquímica do dipiridamol em meio orgânico, aquoso e micelar

O dipiridamol (DIP), além das importantes aplicações já estabelecidas em medicina, apresenta uma ação antioxidante em sistemas biológicos bastante acentuada, conforme demonstrada nos estudos de Iuliano (16) e Pedulli (20), referentes a neutralização de radicais peróxilas, responsáveis pela peroxidação lipídica. A atividade antioxidante provavelmente deve estar relacionada à capacidade do DIP de participar em reações redox no organismo e os seus efeitos em nível clínico podem estar também associados à facilidade de participar nessas reações.

Assim, o DIP vem sendo estudado com abordagens eletroquímica e espectroscópica, já que o composto apresenta duas bandas de absorção próximas a 280 e 400nm e uma intensa emissão de fluorescência em torno de 500nm (21).

A oxidação eletroquímica do DIP em meio não aquoso (acetoneitrila e etanol), empregando voltametria cíclica com UME de Pt de $\phi = 25\mu\text{m}$, mostrou um comportamento voltamétrico reversível em ACN e quasi-reversível em EtOH, caracterizados por duas ondas voltamétricas, correspondendo à perda consecutiva de um elétron em cada etapa. A oxidação por um elétron gera um radical cátion $\text{DIP}^{\bullet+}$ de grande estabilidade, que foi detectável por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (17).

Soluções micelares dos surfactantes SDS (aniônico), CTAB (catiônico) e Triton X-100 (neutro), com concentração acima da concentração micelar crítica (CMC), foram utilizadas para os estudos voltamétricos para aumentar a solubilidade do DIP e também por mimetizar, ainda que de maneira bastante simples, o ambiente da membrana biológica. Para o meio micelar foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de eletrodo de disco rotativo, com eletrodos de carbono vítreo, onde foi avaliado o efeito da interação do DIP com os três diferentes tipos de micelas (18). Os resultados obtidos mostraram que em solução micelar com pH ácido, a oxidação do DIP é caracterizada por uma única onda que corresponde à oxidação por dois elétrons, apresentando perfil irreversível a baixas velocidades de varredura, sendo observado um mecanismo EC, no qual o produto da reação heterogênea é consumido em etapa química subsequente. Para soluções neutras e al-

calinas (pH 6-9), dos três surfactantes estudados, somente o aniônico SDS favoreceu o processo de oxidação em duas etapas, estabilizando a forma $\text{DIP}^{\bullet+}$. Em pH fisiológico, os coeficientes de difusão estimados para o DIP na presença de Triton X-100 e CTAB são consistentes com o transporte do composto ligado às micelas. A interação do DIP com o eletrodo é controlada pela difusão do mesmo, juntamente com a micela, caracterizando à forte associação DIP-micela.

A oxidação do DIP em meio aquoso e pH ácido, no qual o DIP se encontra na forma protonada, e assim aumenta sensivelmente sua solubilidade em água, apresenta apenas uma onda de oxidação sobre UME de Pt, que corresponde a oxidação por dois elétrons, de acordo com o critério de reversibilidade para UME ($E_{3/4} - E_{1/4}$) (22).

Para um estudo mais minucioso do processo de eletrodo do DIP em meio aquoso pH ácido, foram também realizados estudos de CV sobre eletrodo convencional de Pt. Os voltamogramas cíclicos registrados em baixas velocidades de varreduras apresentam um único pico de oxidação que corresponde à perda de dois elétrons, sendo observado um pico catódico na varredura inversa de potencial, a velocidades de varredura maiores que $1,0\text{Vs}^{-1}$. A estequiometria da reação de oxidação foi obtida por curvas de Tafel e verificou-se a participação de uma molécula de DIP, bem como a liberação de um próton H^+ , por molécula de DIP oxidada.

A possibilidade do papel redutor (doador de elétron), ou comportamento antioxidante do DIP foi estimada utilizando os resultados obtidos nestes trabalhos e os valores de potencial de meia-onda $E_{1/2}$ da primeira etapa em meio mais alcalino, simulando a transferência de um elétron do DIP para um radical peróxila, utilizando a conhecida Teoria de Marcus, e o valor obtido é suficientemente alto para justificar o comportamento antioxidante do DIP.

Nestes trabalhos, foram empregados eletrodos convencionais e UMEs, assim como instrumentação mista de partes comerciais e *lab-made*, sendo observado em muitos experimentos um desempenho superior, quando comparado aos resultados obtidos com instrumentação comercial. Dando continuidade a estes trabalhos, já dispomos de novos e interessantes resultados, envolvendo os derivados do DIP, bem como de uma outra classe de compostos, os fenotiazínicos.

3. Redução voltamétrica da ranitidina e desenvolvimento de metodologia analítica para determinação em formulações farmacêuticas

Distúrbios digestivos caracterizados pelo excesso de acidez são geralmente provocados pela histamina, que funciona como um constituinte natural produzido pelo revestimento do estômago. Um antagonista H_2 da produção de histamina muito eficaz no tratamento de úlceras gástrica e duodenal

largamente empregado, caracterizado pela elevada seletividade e rápido início de ação é a ranitidina N-[2-[-5-[dimetilamino)metil]-2-furanyl]metil]tioetil]-N'-metil]-2-nitro-1,1-etenodiamina RNT) (23), Figura 7.

Na metodologia desenvolvida, a redução eletroquímica da ranitidina foi realizada utilizando-se um ultramicroeletrodo de Pt ($\phi=25\mu\text{m}$) com micro-depósito de mercúrio e para fins de comparação, também com o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), aplicando-se a técnica de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada (24). Os estudos voltamétricos foram realizados em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um intervalo de pH de 1,5 a 7,0. Os resultados mostraram que a RNT apresenta duas ondas de redução em valores de pH abaixo de 4,0 e apenas uma onda em pH acima de 4,0, ambas referentes à redução irreversível do grupo nitro para hidroxilamina, (25-27) como pode ser observado na Figura 8. (A) e (B).

O comportamento voltamétrico da RNT em função da concentração também foi investigado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0) utilizando UME de Hg-UME ($\phi = 25 \mu\text{m}$), para um intervalo de concentração de 0,1 a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e uma velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} . Foi observado que o aumento da concentração de RNT provoca um aumento linear do valor de corrente de redução, mas este aumento é mais acentuado para a segunda onda, como pode ser observado na Figura 9 (24).

A relação linear entre a corrente de difusão e a concentração possibilitou a utilização de UMEs na determinação analítica de RNT em formulações farmacêuticas. Esta metodologia foi aplicada para determinar RNT em duas marcas diferentes de formulações farmacêuticas contendo o princípio ativo, sendo utilizada a segunda onda de redução da RNT para as determinações quantitativas do composto.

A técnica de SWV com uso de eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) também foi utilizada para comparação na determinação analítica de RNT em formulações farmacêuticas. As amostras foram maceradas e diluídas em água purificada em sistema Milli-Q e as medidas foram realizadas sem separação prévia dos excipientes insolúveis. No método por SWV, foi medida a corrente de pico correspondente à segunda onda ($E_{pc2} = -0,80\text{V}$), em solução de pH = 3,0 contendo como eletrólito de suporte tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), usando uma frequência (f) de 100Hz, uma amplitude de pulso (ΔE_p) de 50mV e um incremento de varredura (ΔE_s) de 2mV. A curva analítica é mostrada na Figura 10. O limite de detecção calculado usando como critério $LD = 3\sigma/\theta$, foi de $3,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (11 ppb) (24).

As amostras analisadas foram formulações farmacêuticas da marca Antak® e medicamento genérico contendo nominalmente 150mg de ranitidina, e as recuperações médias para estas amostras são mostradas na Tabela 2.

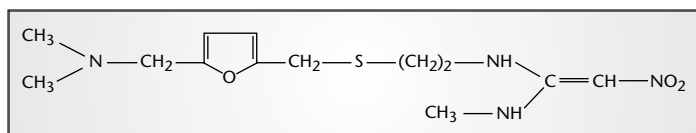


Figura 7. Estrutura da ranitidina.

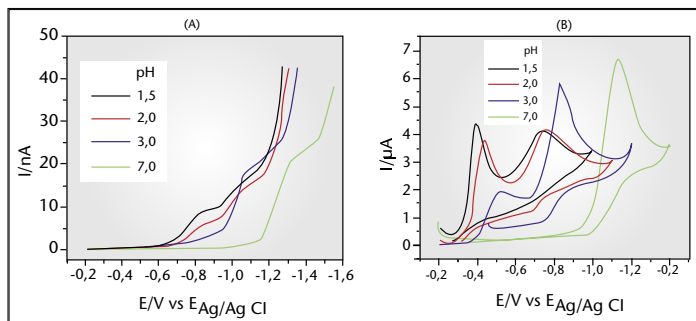


Figura 8. (A) Voltamograma de varredura linear utilizando Hg-UME e (B) Voltamograma cíclico utilizando HMDE para solução de RNT $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ em diferentes valores de pH.

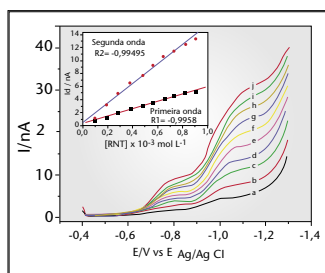


Figura 9. Voltamogramas de varredura linear para a solução de ranitidina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 2.0 (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,3; (d) 0,4; (e) 0,5; (f) 0,6; (g) 0,7; (h) 0,8; (i) 0,9; (j) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando Hg-UME e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido: curvas analíticas obtidas para as duas ondas de redução.

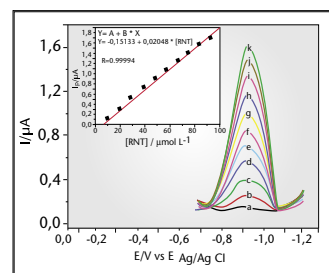


Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 3,0 para as seguintes concentrações de ranitidina: (a) 4,98; (b) 14,8; (c) 24,4; (d) 33,8; (e) 43,1; (f) 52,1; (g) 61,0; (h) 69,8; (i) 76,3; (j) 86,7; (k) $90,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando HMDE, $f=100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Inserido: curva analítica para o pico 2.

Tabela 2. Valores da recuperação de RNT em amostras de medicamentos, utilizando LSV e SWV.

Amostra	LSV (Hg-UME)		SWV (HMDE)	
	Encontrado (mg)	% Rec. (*)	Encontrado (mg)	% Rec. (*)
Padrão	150,1	101,9 ± 4,88	150,1	100,0 ± 4,72
Antak (Glaxo-Wellcome)**	146,6	94,7 ± 0,42	151,3	100,9 ± 2,45
Genérico (EMS®)**	163,6	105,7 ± 4,24	155,3	103,3 ± 2,32

(*) Média de quatro determinações.

(**) Tabletes de Ranitidina: quantidade declarada=150 mg.

De acordo com estes resultados podemos verificar que o uso das técnicas voltamétricas aliadas à aplicação tanto de eletrodos convencionais, como de ultramicroeletrodos (UMEs) com eletrodepósitos de Hg, podem ser utilizados com alta sensibilidade, exatidão, precisão, rapidez e baixo custo na determinação analítica de ranitidina em formulações farmacêuticas.

4. Métodos quimiométricos aplicados na análise de vitaminas hidrossolúveis

A utilização de técnicas eletroquímicas aliadas a métodos de calibração multivariada torna possível a determinação de substâncias que até então eram difíceis de serem analisadas pelas técnicas convencionais. Em nosso laboratório, foi desenvolvida metodologia para a determinação de vitaminas hidrossolúveis: nicotinamida (VPP), piridoxina (VB6) e ácido ascórbico (AA). A análise de produtos multivitamínicos é importante devido a sua importância e demanda atual destes medicamentos. A metodologia combina voltametria cíclica com os métodos de calibração multivariada PLS (mínimos quadrados parciais) e PCR (regressão nas componentes principais), inicialmente aplicada para amostras sintéticas de misturas de vitaminas.

O método de calibração multivariada PLS consiste na construção de um modelo de calibração multivariada baseada na utilização das principais informações contidas nos blocos das variáveis X (medidas instrumentais - dados voltamétricos) e Y (medidas de concentrações) através de uma relação linear entre estes blocos. O PCR é um outro modelo de calibração multivariada e difere do PLS quanto ao fato de que somente as principais informações contidas no bloco de variáveis X (medidas instrumentais) são obtidas e relacionadas posteriormente com as medidas de concentrações (variáveis Y). Isto é feito também por meio de uma relação linear (28).

Para as determinações foram empregadas misturas de vitaminas hidrossolúveis: nicotinamida (vitamina PP), cloridrato de piridoxina (vitamina B6) e ácido ascórbico (vitamina C) com concentrações variando de 0,009 a 0,22g L⁻¹ para o ácido ascórbico, de 0,010 a 0,076g L⁻¹ para nicotinamida e de 0,002 a 0,009g L⁻¹ para a piridoxina (valores de concentração correspondentes à faixa utilizada em produtos farmacêuticos). As soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,02mol L⁻¹ e pH 6,7. O sistema convencional de três eletrodos foi empregado, consistindo de eletrodo de carbono vítreo (eletrodo de trabalho), eletrodo de referência de Ag/AgCl(s) e um contra-eletrodo de platina. Um fluxo de nitrogênio foi aplicado às soluções durante 15 minutos para a remoção do oxigênio. Para cada medida, o eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina e posteriormente lavado com água milli-Q. A faixa de potencial utilizada para os estudos quimiométricos variou de -500 a 1300mV, na qual ocorrem as oxidações das três vitaminas.

Das 29 amostras analisadas, 23 foram utilizadas para a

fase de calibração e seis para a fase de previsão. Os dados passaram por pré-tratamentos matemáticos (centrar na média) antes da aplicação dos métodos quimiométricos. O programa utilizado foi o PLS Toolbox versão 2.1 do MATLAB e os modelos de calibração multivariada PLS e PCR foram construídos com duas variáveis latentes, sendo adotado o critério de erro médio para avaliar o desempenho dos métodos quimiométricos PLS e PCR. Para o PLS foram obtidos os valores de 3,0 para a vitamina B1; 5,9 para a vitamina B2 e 5,5 para a vitamina B6, sendo que os erros obtidos para o PCR encontram-se na faixa de 6,5 para todas as vitaminas analisadas. A metodologia empregada para a análise das três vitaminas em misturas sintéticas mostrou resultados satisfatórios para as amostras sintéticas analisadas.

5. Estudo da detecção por pulso amperométrico da cisteína e n-acetil cisteína com UME de ouro

O desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a detecção de antioxidantes de interesse biológico tem atualmente despertado grande interesse pelo fato dos mesmos serem passíveis de oxidação eletroquímica. No caso da cisteína (Cys) e n-acetil cisteína (NAC), o grupo que sofre a oxidação é o sulfidril (-SH) (29). Os aminoácidos que contêm enxofre, tais como, cisteína e N-acetil cisteína, são blocos construtores importantes dos peptídeos e proteínas, além de melhorar a resistência do sistema imunológico.

Os experimentos foram realizados empregando a técnica de pulso amperométrico (PAD) (30), com a utilização de ultramicroeletrodos de ouro ($\phi = 12,5\mu\text{m}$) em sistema de fluxo (FIA), como mostrado no fluxograma da Figura 3. A partir dos dados de voltametria cíclica da Cys e NAC foram escolhidos os intervalos de potenciais úteis para a detecção, reativação e condicionamento do eletrodo (Tabela 3) com o objetivo de otimizar a resposta na detecção por pulso amperométrico. Os estudos cronoamperométricos permitiram selecionar o tempo ótimo para a leitura da corrente a um dado potencial de salto. Como a resposta eletroquímica dos compostos de interesse depende da adsorção do analito no eletrodo, o tempo de polarização deve ser suficiente para permitir a acumulação do analito.

Tabela 3. Valores de potenciais e duração de pulsos utilizados para a detecção amperométrica da Cys e NAC.

Parâmetro	Potencial V x E _{Ag/AgCl}	Parâmetro	Tempo (ms)
E _{det}	1,0	t _{del}	150
		t _{int}	200
E _{ox}	1,7	t _{ox}	300
E _{red}	0,1	t _{red}	400

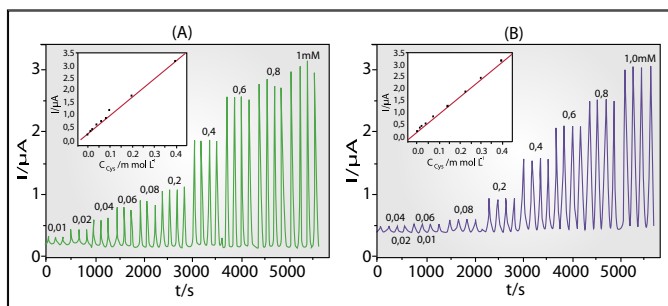


Figura 11. Figuras: (A) Cys, de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; (B) NAC $4,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, ambos em tampão fosfato $0,1$ mol L⁻¹ (pH = 2,2). Vazão da bomba: $0,6$ mL min⁻¹. Injeção da amostra por 3 s a cada 30 s, com UME de fio de ouro de $12,5$ μm. Inserir: curvas de calibração para os compostos referidos.

Os diagramas para a cisteína, Figura 11(A), e n-acetil cisteína, Figura 11(B), foram realizados utilizando-se vazão da bomba peristáltica a $0,6$ mL min⁻¹, e com uma coluna cromatográfica lab-made, utilizando como enchimento a fase estacionária de um cartucho de extração do tipo SEP-PAK C-18. Nas Figuras 11 (A) e (B), pode-se observar que a cisteína pode ser detectada no intervalo de $0,01$ a $0,4$ mmol L⁻¹, com ótima linearidade, e a n-acetil cisteína pode ser detectada no intervalo de $0,04$ a $1,0$ mmol L⁻¹, também com ótima linearidade.

A metodologia para a análise em fluxo por pulso amperométrico para a determinação analítica dos antioxidantes NAC e Cys mostrou-se reprodutível e com sensibilidade adequada para a aplicação em várias amostras comerciais da indústria farmacêutica.

6. Estudo voltamétrico da hidrazida maleica com eletrodo de carbono vítreo (GC) e carbono amorfo reforçado com grafite (GRC).

A hidrazida maleica, 1,2-dihidro-3,6-piridazinodiona, cuja estrutura é mostrada na Figura 12, é um fungicida, regulador do crescimento de vegetal, atualmente utilizado na conservação de grãos de cereais (31).

O eletrodo de carbono amorfo reforçado com grafite (GRC), que é comercialmente vendido como grafite nas lapiseiras, é constituído com carbono de origem vegetal, com um nível de impurezas de metais pesados menor que $0,01\%$. Este eletrodo não é tão frágil como a pasta de carbono ou o carbono pirolítico e não tão rígido como o carbono vítreo, que são os eletrodos mais convencionais. Em estudos realizados por Aoki e col. (32) foi observado o comportamento de capacidade, permeabilidade, adsorção e difusão do eletrodo de GRC nos sistemas redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$, e também foi monitorado o par redox $\text{Fe}^{2+/3+}$ em célula de fluxo.

O perfil voltamétrico da hidrazida maleica em solução tampão fosfato de sódio/ácido fosfórico indica a irreversibilidade do sistema, sendo observado ainda que as respostas

de densidade de corrente obtidas com o eletrodo GRC foram significativamente maiores do que aquelas utilizando o eletrodo de carbono vítreo, como pode ser visto na Figura 12.

A partir dos voltamogramas cíclicos com mudança na concentração de hidrazida maleica utilizando-se eletrodo de GRC, foi possível construir uma curva analítica para a determinação do composto com boa linearidade, Figura 13, que apresenta a seguinte equação: $Y = 0,226 + 1,217 X$, com coeficiente de correlação de $0,9961$. Os resultados voltamétricos também foram comparados com os resultados obtidos com eletrodos de carbono vítreo, cuja curva analítica apresentou a seguinte equação: $Y = 0,106 + 0,573 X$, com coeficiente de correlação de $0,9960$.

O estudo voltamétrico da hidrazida maleica em solução tampão fosfato $1,0$ mol L⁻¹, no intervalo de pH de $2,0$ a $7,0$, utilizando-se eletrodos de carbono vítreo (GC) ($\phi = 5$ mm) e de GRC (mina de lapiseira Pentel B $\phi = 0,3$ mm), possibilitou determinar um de seus valores de pKa ($5,77$). Os valores reportados na literatura são: $-1,2$ e $5,7$ (33).

Ao observar as curvas de calibração inserida na Figura 13, pode-se notar que a sensibilidade de corrente obtida utilizando o eletrodo de GRC foi maior do que a alcançada com eletrodo de carbono vítreo. Desta forma, este eletrodo pode ser utilizado para o desenvolvimento de metodologia analítica da hidrazida maleica em amostras de interesse comercial.

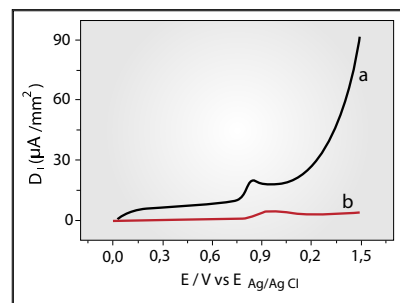


Figura 12. Voltamogramas da hidrazida maleica $1,0$ mmol L⁻¹ em tampão fosfato $1,0$ mol L⁻¹ pH = $4,0$, $v = 100$ mV s⁻¹ utilizando os eletrodos de: (a) GRC e (b) GC.

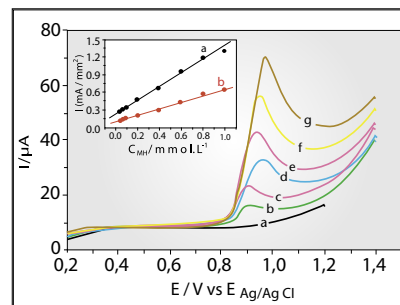


Figura 13. Voltamogramas de varredura linear da hidrazida maleica em tampão fosfato $1,0$ mol L⁻¹ (pH = 3) para as seguintes concentrações: (a) $0,02$; (b) $0,10$; (c) $0,20$; (d) $0,40$; (e) $0,60$; (f) $0,80$ e (g) $1,0$ mmol L⁻¹, utilizando eletrodo de GRC. $v = 50$ mV s⁻¹. Inserir: curva de calibração para os eletrodos: (a) GRC e (b) GC.

Conclusão

A utilização de eletrodos convencionais e UMEs aliados a uma instrumentação adequada constituída de partes comerciais e lab-made, tem possibilitado o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de espécies de interesse biológico e ambiental, com resultados bastante satisfatórios. Esta instrumentação vem sendo utilizada com sucesso em nosso laboratório propiciando resultados promissores no desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle da qualidade

de fármacos e na análise de pesticidas em alimentos, assim como para corroborar no esclarecimento de aspectos mecanísticos das reações eletroquímicas envolvendo as substâncias em estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelos recursos obtidos em projetos de pesquisa e bolsas de estudo.

Referências

1. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis*. 5. ed. New York, Saunders College, 1997. p. 300 – 354.
2. Wang Z, Zhang H, Zhou S. *Determination of Trace Amounts of Dipyrindamole by Stripping Voltammetry Using a Nafion Modified Electrode*. *Talanta*, 1997, 44, 621.
3. Wang J, Bonakdar M, Morgan C. *Voltammetric Measurement of Tricyclic Antidepressants following Interfacial Accumulation at Carbon Electrodes*. *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1024.
4. Richter P, Toral MI, Vargas FM. *Polarographic behaviour and determination of ranitidine in pharmaceutical formulations and urine*. *Analyst*, 1994, 119, 371.
5. Tunçel M, Yazan Y, Dogrukol D, Atkosar Z. *A Polarographic Study on Dipyrindamole and its Determination in Commercial Tablets*. *Anal. Letters*, 1991, 24, 10, 1837.
6. Lin NS, Jan BI. *A sensitive measurement of maleic hydrazide by a differential pulse voltammetry followed by a cleansing pulse train*. *Journal of Chinese Chemical Society*, 1999, 46, 879.
7. Wang E, Hou W. *Determination of water-soluble vitamins using high-performance liquid chromatography and electrochemical or absorbance detection*. *J. Chromatogr.* 1988, 447, 256.
8. Montenegro MI, Queiros MA, Daschbach JL. *Microelectrodes: Theory and Applications*. Netherlands, Kluwer Academic, 1991, 197, 497.
9. Correia AN, Mascaro LH, Machado SAS, Mazo LH, Avaca LA. *Ultramicroeletrodos. Parte I: Revisão Teórica e Perspectivas*. *Quím. Nova*. 1995, 18, 5, 475.
10. Silva SM, Alves CR, Correia NA, Martins RM, Nobre ALR, Machado SAS, Mazo LH, Avaca LA. *Ultramicroeletrodos. Parte II: Construção e Aplicações*. *Quím. Nova*. 1998, 21, 1, 78.
11. Wehmeyer KR, Wightman RM. *Cyclic Voltammetry and Anodic Stripping Voltammetry with Mercury Ultramicroelectrodes*. *Anal. Chem.* 1985, 57, 1989.
12. Reis BF, Guine MF, Kronka EAM. *A análise química por injeção em fluxo contínuo*. *Quím. Nova*. 1989, 12, 1, 82.
13. Valcarcel M, Luque de Castro MD. *Análisis por Inyección em flujo*. Córdoba, Imprenta SanPablo, 1984, 449.
14. Ruzicka J, Hansen EH. *Flow Injection analysis*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1988, 498.
15. Darbar D, Gillespie N, Main G, Bridges AB, Kennedy NSJ, Pringle TH, McNeill GP. *Prediction of Late Cardiac Events by Dipyrindamole Thallium Scintigraphy in Patients with Intermittent Claudication and Occult Coronary Artery Disease*. *Amer. J. Cardiol.* 1996, 78, 736.
16. Iuliano L, Violi F, Ghiselli A, Alessandri C, Balsano F. *Dipyrindamole inhibits lipid peroxidation and scavengers oxygen free radicals*. *Lipids*. 1989, 24, 430.
17. Almeida LE, Castilho M, Mazo LH, Tabak M. *Voltammetric and spectroscopic of the oxidation of the anti-oxidante drug dipyrindamole in acetonitrile and ethanol*. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 375, 223.
18. Castilho M., Almeida LE, Tabak M, Mazo LH. *The electrochemical oxidation of the antioxidant drug dipyrindamole at glassy carbon and graphite electrodes in micellar solutions*. *Electrochimica Acta*. 2000, 46, 67.
19. Toledo RA, Castilho, M, Mazo, LH. *Voltammetric study of dipyrindamole reduction with mercury coated-platinum ultramicroelectrode*. *Electroanalysis*, 2003 (in press).
20. Pedulli GF, Lucarini M, Marchesi E, Paolucci F, Roffia S, Fiorentini D, Landi L. *Medium effects on the antioxidant activity of dipyrindamole*. *Free Rad. Biol. & Med.* 1999, 26, 3/4, 295.
21. Borissevitch IE, Tabak M. *Electronic absorption and fluorescence spectroscopic studies of Dipyrindamole – Effect of solution composition*. *J. Lumin.* 1992, 51, 315.
22. Castilho M, Almeida LE, Tabak M, Mazo LH. *Voltammetric oxidation of dipyrindamole in aqueous acid solutions*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 2, 148.
23. Ganelli CR, Roberts SM. *Medicinal Chemistry- The Role of Organic Chemistry in Drug Research*. Academic Press, 1994; 2o ed., p. 228.
24. Malagutti AR, Mazo LH. *Determination of ranitidine in drugs using mercury coated platinum ultramicroelectrode and hanging mercury dropping electrode*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003. (in press)
25. Richter P, Toral MI, Vargas FM. *Polarographic behaviour and determination of ranitidine in pharmaceutical formulations and urine*. *Analyst*. 1994, 119, 371.
26. Zamarreno MD, Méndez JH, Pérez AS. *Electrochemical study and polarographic determination of ranitidine*. *Analytica Chimica Acta*. 1985, 176, 279.
27. Squella JA, Zuniga LA, Lemus I, Vergara L.J.N. *Simple Determination of Ranitidine in Dosage Forms by In- Phase Selective AC Polarography*. *DRUGS. Journal of Association Official of Analytical Chemistry*. 1988, 7, 2, 388.
28. Mortens H, Tormod N. *Multivariate Calibration*. 1º Ed. New York, John Wiley & Sons, 1989
29. Fawcett WR, Fedurco M, Kováčová Z, Borkowsha Z. *Adsorption study of cysteine, n-acetylcysteamine, cysteinesulfonic acid and cysteic acid on a polycrystalline gold electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1994, 368, 275.
30. Vandeberg PJ, Johnson DC. *Pulsed Electrochemical Detection of Cysteine, Cystine, Methionine and Glutathione at Gold Electrodes following their separation by liquid chromatography*. *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 20, 2713.
31. Renaud JM, Keller I, Vuillaume G. *Determination of Maleic Hydrazide residues in cured tobacco by gas chromatography*. *Journal of Chromatography*. 1992, 604, 243.
32. Kaneko H, Yamada M, Aoki K. *Analytical Sciences* 1990, 6, 439.
33. Shibata M, Zuman, P. *Electroreduction of the hydrazide of maleic acid in aqueous solutions*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1997, 420, 79.