

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Determinação de besilato de amlodipina e atenolol utilizando eletrodo de
diamante dopado com boro e análise por injeção em batelada com detecção
amperométrica**

ALMIR AFONSO DA SILVA

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

DEZEMBRO DE 2015

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação de bivalato de amlodipina e atenolol utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e análise por injeção em batelada com detecção amperométrica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Almir Afonso da Silva

Orientador: Profa. Dra. Aline Carlos de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de Concentração: Química Analítica

UBERLÂNDIA

DEZEMBRO DE 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586d
2015 Silva, Almir Afonso da, 1985-
 Determinação de besilato de amlodipina e atenolol utilizando
 eletrodo de diamante dopado com boro e análise por injeção em batelada
 com detecção amperométrica / Almir Afonso da Silva. - 2015.
 101 f. : il.

 Orientadora: Aline Carlos de Oliveira.
 Coorientador: Eduardo Mathias Richter.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Química - Teses. 2. Amlodipina - Teses. 3. Atenolol - Teses. I.
 Oliveira, Aline Carlos de. II. Richter, Eduardo Mathias. III. Universidade
 Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química. IV.
 Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 226/PPQUI.

DATA: 16/12/2015

DISCENTE: Almir Afonso da Silva

MATRÍCULA: 11322QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação de besilato de amlodipina e atenolol utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e análise por injeção em batelada com detecção aperométrica.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos de análise com características portáteis envolvendo técnicas eletroanalíticas e eletroforese capilar para aplicações em áreas do agronegócio, alimentícia, ambiental, biocombustíveis e farmacêutica.

Às quatorze horas do dia dezesseis de dezembro do ano dois mil e quinze, no Auditório C do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Marcio Antonio Augelli, da Universidade Estadual de São Paulo, Rodrigo Amorim Bezerra da Silva e Eduardo Mathias Richter, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e a provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação pertinente e regulamentação interna da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Dr. Marcio Antonio Augelli
UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva
IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter – IQUFU

“A ciência é uma aventura de toda a raça humana para aprender a viver e talvez a amar o Universo onde se encontra. Ser uma parte dele é compreender, é conhecer-se a si próprio, é começar a sentir que existe dentro do Homem uma capacidade muito superior a que ele pensava ter e uma quantidade infinita de possibilidades humanas”.

Isidor Isaac Rabi

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Reila pelo companheirismo incondicional em todos os momentos, inclusive nos de dor e naqueles onde as incertezas nos afligiam. Você é quem me afortuna e com quem quero compartilhar tudo de valioso nessa vida.

Aos meus filhotes Manuela e Pedro, presentes ainda tão pequenos em tamanho e tão grandes em valor. Saibam que tenho aprendido muito com vocês e papai sente um orgulho e alegrias que jamais caberiam em palavras.

Aos meus pais Valdeir e Maria que tanto lutaram para formação dos filhos. O amor incondicional de vocês me direcionou nas minhas jornadas e me engrateceu frente aos obstáculos que enfrentei.

A vocês,

Dedico esta dissertação

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela energia que me cerca e me guia pelos caminhos da vida.

- À minha família constituída pela esposa (Reila) e filhos (Manuela e Pedro) que se sacrificaram e são merecedores de inumeráveis títulos. Muito Obrigado a vocês, sempre os amarei!!!

- A toda a “dois sete cinco (275)” – sempre importante nos diversos momentos: Meus pais, Maria, Valdeir; Meus tios Tabal (Tio Lourival), Dinha (Tia Terezinha), Tio Zé-zé, Tio Lázaro, Ti Toim (Tio Antônio), Tio Zete, Tio Joel, Tia Odete. A minha Irmã e Comadre Naísa, exemplo de coragem, determinação e envolvimento familiar. Meus Primos-Irmãos Compadre João (Galego), Juliana (Comadre), Wenes e Dênes e seus “anexos”: Comadre Vanessa, Compadre Cabeça (Udson), Dó-dó (Isadora), Ester, Felipe, Maycon Weda. A minha vizinha Geraldina (“in memoriam”), por ter sido a matriarca dessa família, responsável por liderar-nos com tanto carinho e cuidado, deixando um vazio nessa casa que parece nunca ter fim. Muito obrigado a vocês!!!

- A meu sogro Donizete e sogra Isabel e a meu cunhado Reinaldo (“in memoriam”) que foi-se embora tão cedo e, apesar de deixar tamanha saudade, deixou alegrias que são em muito recordadas.

- Aos meus professores orientadores: Dra. Aline pelos ensinamentos, confiança e compreensão e Dr. Eduardo que, além de dos ensinamentos e confiança transmitidos, se tornou referência profissional para minhas carreiras.

- Aos amigos do NUPE pela amizade, respeito e pelas contribuições tanto profissionais quanto pessoais durante todo o tempo em que estivemos juntos: Prof. Dr. Rodrigo Munoz pelo compromisso e exemplo de dedicação. Ao André, Dalyelli, David, Denise, Gracy, Jéssica, Laiz, Mariana, Michelle, Rafael Melo, Rafael (Pisquilha), Rodrigo (Banana), Thiago Costa, Thiago Tormim. Em especial agradeço ao amigo Luis André que tanto colaborou para este trabalho, sempre ajudando com uma disposição ímpar pertencente ao seu rol de qualidades, se mostrando uma das

engrenagens mais importantes desse laboratório, além de minha gratidão fica aqui registrada minha admiração. Torço muito para o sucesso de todos vocês, inclusive dos aqui não citados e que fizeram ou venham a fazer parte de tão prestigiado grupo de pesquisa.

- Aos amigos e companheiros de graduação: Elen, Felipe, Humberto, Jardel, Moacir, Rodrigo e Renato. Em especial ao meu parceiro/irmão Jaca (Henrique) e sua esposa Dayane.

- Aos amigos de longa data que acabaram se tornando praticamente irmãos de criação: Diego, Gledão, Jhonim, Luiz Fernando, Marco Melo, Marlon, Paulo e Tico.

- Ao Cirurgião Dr. Fabiano Canto que com mãos abençoadas retiraram um tumor de coluna que tanto me torturava, obrigado por ter contaminado a todos com sua sensatez, calma e competência. Estendo tais agradecimentos a todos envolvidos no tratamento e cura.

- Aos servidores do IFTM-Ituiutaba pelas parcerias, ajudas e, torcidas fundamentais.

- Aos amigos da Polícia Civil de MG pela irmandade com que me receberam e com quem muito aprendi nos quatro anos em que estive servindo à instituição.

- Aos atuais amigos da Polícia Científica de Goiás companheiros de tantas perícias na região de Catalão.

- Ao Instituto de Química (IQ-UFU) e à Secretaria e Coordenação de Pós-Graduação em Química, fica meu agradecimento aos seus servidores pela colaboração e demonstração de presteza e compreensão.

RESUMO

Não há relatos na literatura de métodos eletroanalíticos direcionados a análise de formulações farmacêuticas contendo besilato de amlodipina (AML) e atenolol (ATN). Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo usar o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) e um sistema de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica para determinação sequencial desses compostos em formulações farmacêuticas.

A determinação dos dois compostos foi realizada através da aplicação sequencial de dois potenciais em função do tempo usando tampão BR pH 2,0 como eletrólito suporte. AML foi seletivamente detectada em +1,00 V e ATN em +1,65 V. Um pulso de potencial adicional (0,0 V/300 ms; amperometria pulsada) foi aplicado para evitar a contaminação/passivação da superfície do eletrodo de BDD. Nestas condições, ambos os compostos apresentaram faixa linear de resposta entre 5 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r > 0,99$), boa repetibilidade ($\text{RSD} < 3.2 \%$; $n = 10$), limites de detecção de 0,074 $\mu\text{mol L}^{-1}$, limites de quantificação de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e frequência analítica superior a 70 injeções h^{-1} . Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados aos obtidos por HPLC, sendo que os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes (a um nível de confiança de 95%).

Palavras-chave: Amperometria de múltiplos pulsos (MPA), detecção amperométrica pulsada (PAD), análise por injeção em batelada (BIA), análise sequencial, eletrodo de diamante dopado com boro (BDD), atenolol, besilato de amlodipina.

ABSTRACT

There are no reports in the literature of electroanalytical methods for analysis of pharmaceutical formulations containing amlodipine besylate (AML) and atenolol (ATN). In this context, this study aimed to use the boron-doped diamond (BDD) electrode and the batch injection analysis (BIA) system for sequential determination of these compounds in pharmaceutical formulations.

The sequential determination of the two compounds was performed by applying two potentials as a function of time using BR buffer pH 2.0 as supporting electrolyte. AML was selectively detected at +1.00 V and ATN at +1.65 V. An additional potential pulse (0.0 V / 300 ms; pulsed amperometric detection) was applied to avoid contamination/passivation of the BDD electrode surface. Under these conditions both compounds showed a linear response range of 5 to 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r > 0.99$), good repeatability ($\text{RSD} < 3.2\%$; $n = 10$), limits of detection 0.074 $\mu\text{mol L}^{-1}$, limits of quantification 0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and high analytical frequency (> 70 injections h^{-1}). The results obtained with the proposed method were compared to those obtained by HPLC and similar results were obtained (at 95% of confidence level).

Keywords: Multiple pulse amperometry (MPA), pulsed amperometric detection (PAD), batch injection analysis (BIA), sequential analysis, boron doped diamond (BDD) electrode, atenolol, amlodipine besylate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da AML.	21
Figura 2. Mecanismo de oxidação eletroquímica de AML.	22
Figura 3. Fórmula estrutural do ATN.	23
Figura 4. Mecanismo de oxidação eletroquímica de ATN.	24
Figura 5. Degrau de potencial aplicado e resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.....	26
Figura 6. Esquema de uma célula BIA.	29
Figura 7. Etapas de operação de um sistema BIA.	29
Figura 8. Placa de silício coberta com filme de BDD usada como eletrodo de trabalho.....	36
Figura 9. Célula de teflon utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD.....	37
Figura 10. Célula BIA.	38
Figura 11. (A) Vista explodida da célula BIA. (B) Célula BIA conectada ao potenciostato/galvanostato.....	39
Figura 12. Micropipeta eletrônica utilizada para injeções no sistema BIA.	40
Figura 13. Sistema de agitação adaptado para célula BIA.	41
Figura 14. Voltamogramas cíclicos para oxidação de AML obtidos em soluções de diferentes pHs.	47
Figura 15. Voltamogramas cíclicos para oxidação de ATN obtidos em soluções de diferentes pHs	48

Figura 16. Estudo do efeito do pH nos valores de potenciais de oxidação estimados para AML e ATN por voltametria cíclica.	49
Figura 17. Mecanismos (simplificados) de oxidação de AML (A) e ATN (B).	50
Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções de AML ou ATN em meio de tampão BR pH = 2,0.	51
Figura 19. Amperogramas de múltiplos pulso obtidos para AML, ATN e AML + ATN.	52
Figura 20. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema de detecção amperométrica (E_{cte}) para AML e ATN.	54
Figura 21. Amperogramas obtidos para injeções (n = 3) de soluções contendo ATN, AML e mistura (ATN + AML).	55
Figura 22. Influência da agitação via micro motor DC na resposta de corrente obtida por BIA-MPA.	60
Figura 23. Influência do volume injetado na resposta obtida com o sistema BIA-MPA.	62
Figura 24. Influência da vazão de injeção na resposta de corrente obtida por BIA-MPA.	64
Figura 25. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo ATN, AML e AML + ATN..	67
Figura 26. Estudo das faixas lineares (curvas de calibração) para AML e ATN..	69
Figura 27. Amperogramas a potencial constante (A e C) e de amperometria pulsada (B e D) para ATN (n=9)	71
Figura 28. Amperogramas obtidos para injeções (n = 3) de soluções contendo AML, ATN e ATN + AML.	73
Figura 29. Estudo da faixa linear para ATN	74

Figura 30. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo AML + ATN (n = 10).	75
Figura 31. Amperograma referente ao pulso de 1,65V obtido para injeções de cinco soluções padrão contendo simultaneamente AML e ATN e duas amostras adequadamente.	77
Figura 32. Diluição das amostras: (A) amostra S ₁ e (B) amostra S ₂	79
Figura 33. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente AML, cinco soluções contendo simultaneamente AML e ATN e duas amostras distintas adequadamente diluídas.	80
Figura 34. Diluição de amostras simuladas.	82
Figura 35. (A) Estudo de interferência do ATN na determinação de AML; (B) Estudo de interferência de AML na determinação de ATN.....	83
Figura 36. (A) Amperograma obtido com a injeção de soluções padrões de AML e de amostras devidamente diluídas. (B) Amperograma obtido com a injeção de soluções padrões de ATN e amostras diluídas.	86
Figura 37. Curvas de calibração obtidas para AML (A) e ATN (B) a partir de dados obtidos da Figura 36.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características e denominação dos fármacos contendo associação de AML e ATN.....	43
Tabela 2. Correntes de oxidação detectadas no sistema BIA-MPA para AML e ATN em função do tipo de ativação/limpeza do eletrodo de BDD	52
Tabela 3. Comparação dos RSD obtidos em função de aplicação de diferentes pulsos de potenciais de limpeza.....	57
Tabela 4. Comparação dos RSD obtidos em função de variações no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais de detecção.....	59
Tabela 5. Comparação dos RSD obtidos em função de variações no volume de injeção.....	63
Tabela 6. Comparação dos RSD obtidos em função de variações na vazão de injeção.....	65
Tabela 7. Parâmetros do sistema BIA-MPA estudados e respectivos valores otimizados.....	66
Tabela 8. Estudo para repetibilidade do método.	68
Tabela 9. Resultados obtidos nos estudos de repetibilidade (n=9) para ATN 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=9) em +1,35 e +1,65 V.....	71
Tabela 10. Estudo para repetibilidade do método.	76
Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta com os valores rotulados.	80
Tabela 12. Resultados do estudo de interferência de AML para detecção de ATN (em +1,65 V) e de ATN para detecção de AML (em +1,0 V).....	84
Tabela 13. Características analíticas do método proposto para determinação sequencial de AML + ATN.....	88

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta (BIA) e por HPLC.....	88
Tabela 15. Erros relativos para comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta.....	89
Tabela 16. Teste t pareado para comparação dos resultados por BIA e HPLC.	90
Tabela 17. Comparação de características analíticas entre o método proposto e outros métodos analíticos publicados.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML – Besilato de amlodipina (ou besilato de anlodipino)

ATN – Atenolol

BDD – Diamante dopado com boro, do inglês, “*boron-doped diamond*”

BIA – Análise por injeção em batelada, do inglês, “*batch injection analysis*”

BR – Tampão Britton-Robinson

CV – Voltametria cíclica, do inglês “*cyclic voltammetry*”

CVD – Deposição química em fase vapor, do inglês “*chemical vapour deposition*”

DPb – Desvio padrão absoluto do branco

DPV – Voltametria de pulso diferencial, do inglês “*differential pulse voltammetry*”

EE – Espécie eletroativa

Eq – Equação

ER – Erro relativo

FC – Fator de correção

FIA – Análise por injeção em fluxo, do inglês, “*flow injection analysis*”

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, “*high performance liquid chromatography*”

HPTLC – Cromatografia em camada delgada de alta eficiência, do inglês “*high performance thin-layer chromatography*”

LOD – Limite de detecção, do inglês “*limit of detection*”

LOQ – Limite de quantificação, do inglês “*limit of quantification*”

MPA – Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês “*multiple pulse amperometry*”

PA – Pureza analítica

PAD – Detecção amperométrica pulsada, do inglês “*pulsed amperometric detection*”

rpm – Rotação por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês, “*Relative standard deviation*”

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês “square-wave voltammetry”

TAP – Tempo de aplicação do pulso

UV – Ultravioleta

ΔE_s – Incremento de potencial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1.	Considerações iniciais.....	19
1.2.	Hipertensão arterial	20
1.3.	Espécies químicas estudadas	20
1.3.1.	Besilato de amlodipina.....	20
1.3.2.	Atenolol.....	22
1.3.3.	Associação de AML e ATN	24
1.4.	Amperometria	25
1.5.	Análise por injeção em batelada.....	28
1.6.	Eletrodo de diamante dopado com boro	32
2.	OBJETIVOS	34
3.	EXPERIMENTAL	35
3.1.	Instrumentação	35
3.1.1.	Deteção eletroquímica	35
3.1.2.	Eletrodos utilizados	35
3.1.3.	Células Eletroquímicas	36
3.1.3.1.	Célula para medidas estacionárias	36
3.1.3.2.	Célula para medidas hidrodinâmicas	37
3.1.4.	HPLC	41
3.2.	Reagentes, soluções e preparo de amostras.....	42
3.3.	Técnicas eletroquímicas	43
3.3.1.	Voltametria cíclica	43
3.3.2.	Amperometria hidrodinâmica	44
3.3.3.	Procedimento seguido na análise sequencial.....	44
3.4.	Parâmetros de confiabilidade analítica avaliados	45
3.4.1.	Limite de detecção	45
3.4.2.	Limite de quantificação	45

3.4.3	Repetibilidade	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
4.1.	Comportamento eletroquímico de AML e ATN	47
4.1.1	Definição do eletrólito suporte	47
4.1.2	Teste de ativação/limpeza do eletrodo de BDD.....	51
4.2.	Estudo para determinação simultânea de AML e ATN	53
4.2.1.	Otimização de parâmetros do sistema BIA-MPA	56
4.2.2.1.	Definição dos pulsos de potenciais.....	56
4.2.2.2.	Agitação	60
4.2.2.3.	Volume de injeção	61
4.2.2.4.	Vazão de injeção	64
4.2.2.	Repetibilidade/estabilidade do sistema	66
4.2.3.	Estudos para identificação das faixas lineares de resposta.....	68
4.2.4.	Amostras comerciais	69
4.2.5	Definição de uma nova combinação de pulsos de potenciais.....	70
4.2.6.	Seletividade	72
4.2.7.	Identificação da faixa linear de resposta.....	74
4.2.8.	Estudo da repetibilidade	75
4.3.	Análise simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas.....	76
4.4.	Determinação sequencial de AML e ATN	81
4.4.1.	Estudo de interferência de AML na determinação de ATN.....	81
4.4.2.	Análise sequencial de AML e ATN em formulações farmacêuticas.	84
4.4.3.	Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e por HPLC.....	88
4.4.4.	Comparação entre o método proposto e métodos já publicados	90
5.	CONCLUSÃO	92
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Um dos problemas de saúde pública que merece destaque é a hipertensão arterial, devido a sua abrangência, gravidade e custos envolvidos. No tratamento dessa doença, é comum que os pacientes se submetam ao uso de associações farmacológicas que visam maior eficácia no controle da pressão arterial.

Uma combinação encontrada no mercado para o tratamento da hipertensão contém os princípios ativos Atenolol (ATN) e Besilato de Amlodipina (ou besilato de anlodipino) (AML) [1]. Esses compostos compreendem dois agentes anti-hipertensivos eficazes com mecanismos de ação complementares, onde o AML bloqueia os canais de cálcio relaxando o músculo liso e, sinergicamente, o ATN age como bloqueador beta-adrenérgico, diminuindo o ritmo e a força de contração cardíaca, nessa situação [2, 3].

Na literatura atual não são encontrados trabalhos descrevendo o uso de métodos eletroanalíticos para a análise de medicamentos contendo a associação de ATN e AML. Desta forma, estudos foram realizados para preencher essa lacuna, posto que os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens consideráveis sobre os demais, como custos de aquisição e manutenção inferiores.

Dentre as diferentes técnicas eletroanalíticas, o sistema de análise por injeção em batelada (BIA - "Batch Injection Analysis") com detecção amperométrica tem merecido destaque. Este sistema apresenta várias características que são desejáveis em uma metodologia analítica, tais como: alta frequência analítica, custos reduzidos (de aquisição e manutenção), boa precisão, exatidão e relativa sensibilidade. Adicionalmente, o sistema pode ser usado em laboratórios com infraestrutura mínima e/ou análises em campo (sistema com características portáteis) [4-7].

1.2 Hipertensão arterial

A definição dos limites e a classificação da pressão arterial foram determinadas a partir de estudos estatísticos populacionais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo consenso da comunidade científica especializada. Segundo as diretrizes da OMS, para a classificação da pressão arterial em adultos maiores de dezoito anos é adotada a classificação do III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial Sistêmica [8]. Assim, a hipertensão é uma condição clínica na qual a pressão sanguínea, em repouso, excede constantemente 140/90 mm Hg.

A hipertensão tem sido um problema de destaque para a saúde pública [9], uma vez que está relacionada ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade [10] e atinge grande parte da população mundial – inclusive tendo sido relatado uma prevalência da hipertensão arterial de 19,2% a 44,4% na população adulta brasileira [9].

No tratamento, muitos pacientes hipertensos não podem atingir o nível alvo de pressão arterial com uma única droga e assim, associações de princípios ativos têm sido indicadas como uma maneira mais eficaz de reduzir a pressão arterial ao nível pretendido [2]. Dentre essas, destaca-se a associação entre ATN e AML, alvo desse estudo.

1.3 Espécies químicas estudadas

1.3.1 Besilato de amlodipina

A AML (Figura 1) ou (RS)-3-etil-5-metil-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-chlorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato é utilizada com anti-hipertensivo por ser um bloqueador dos canais de cálcio de terceira geração [11, 12]. Esse composto age relaxando o músculo liso da parede arterial (vasodilatação), reduzindo a resistência vascular e, assim, aumenta o fluxo sanguíneo, acarretando na redução da pressão arterial. No pH fisiológico, a amlodipina encontra-se ionizada (pKa 8,6) e possui uma interação gradual com os receptores de canal de cálcio resultando em uma resposta gradativa dos efeitos [13, 14].

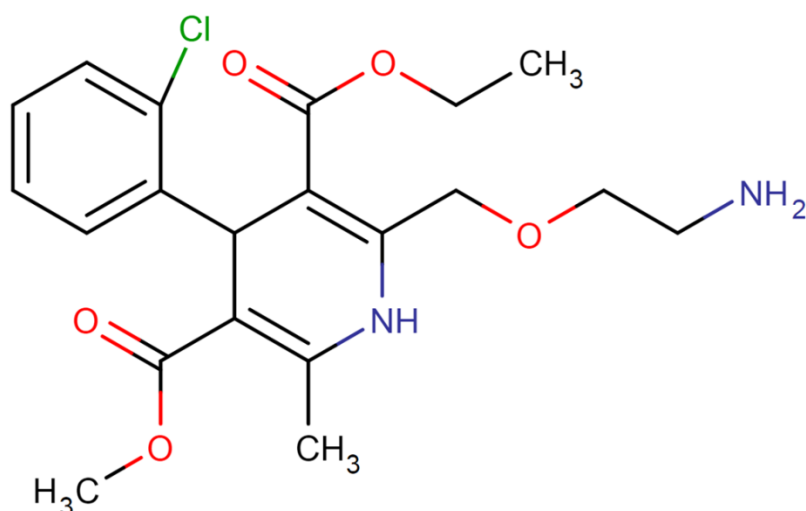


Figura 1. Fórmula estrutural da AML.

Na literatura são relatados diversos métodos eletroanalíticos para a determinação de AML em formulações farmacêuticas e/ou em fluídos biológicos.

Nos trabalhos de (i) Goyal e Bishnoi [15], (ii) Valezi et al. [16], (iii) Silva et al. [17], (iv) Mansano et al. [18] e (v) Mansano et. al. [19], a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) foi utilizada empregando diferentes eletrodos de trabalho. Goyal e Bishnoi empregaram o eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubos de carbono de parede simples e múltiplas para determinação de AML em formulações farmacêuticas e em amostras de urina (i). Já Valezi et al. empregaram o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas para determinação individual e simultânea de AML e enalapril em formulações farmacêuticas (ii). Silva et al. empregaram o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para determinação simultânea de AML e hidroclorotiazida em amostras de urinas sintéticas (iii). Mansano et. al. empregaram o eletrodo BDD para determinações simultâneas de AML e valsartan em formulações farmacêuticas e em amostras de urinas sintéticas (iv) e de AML, hidroclorotiazida e valsartan em formulações farmacêuticas (v).

Gazy [20], utilizou voltametria de onda quadrada com redissolução anódica empregando carbono vítreo como eletrodo de trabalho para determinar AML em formulações farmacêuticas e em fluídos biológicos.

Já Švorc, et al. [21] utilizaram voltametria de pulso diferencial empregando BDD para determinar AML em formulações farmacêuticas e em amostras de urinas sintéticas.

Em outro trabalho, de Dogan-Topal, et al. [22], as técnicas de voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, empregando carbono vítreo como eletrodo de trabalho, foram utilizadas para determinar simultaneamente AML e atorvastatina cálcica em formulações farmacêuticas.

Sobre o processo de oxidação de AML sobre o eletrodo de BDD, está relatado que é controlado tanto por difusão quanto por adsorção das espécies [17] e envolve dois elétrons por molécula do analito [18, 21]. A Figura 2 apresenta o mecanismo de oxidação da AML [21]. A molécula de AML é eletroquimicamente oxidada em um processo que envolve a oxidação do anel 1,4-dihidropiridina, formando o anel aromático de piridina correspondente.

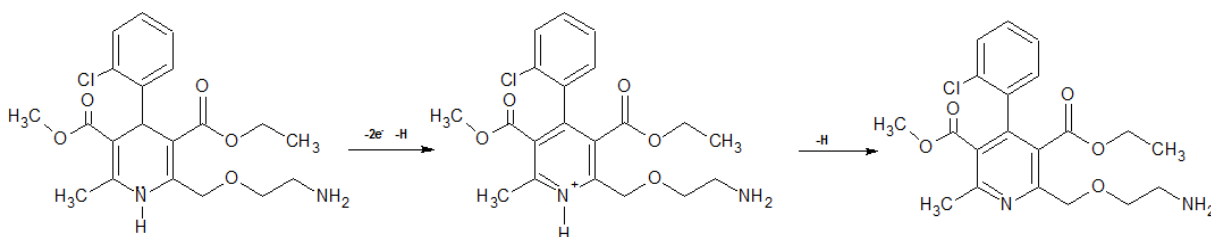


Figura 2. Mecanismo de oxidação eletroquímica de AML.

1.3.2 Atenolol

O ATN (Figura 3) ou (RS)-2-[4-[2-hidroxi-3-(1-metiletilamino) propoxy]fenil]etanamida, é um betabloqueador adrenérgico tradicionalmente utilizado no tratamento da hipertensão [23, 24]. O ATN age dificultando os efeitos da

adrenalina e diminuindo a força com a qual o coração se contrai, e desta maneira reduz a pressão arterial [25, 26].

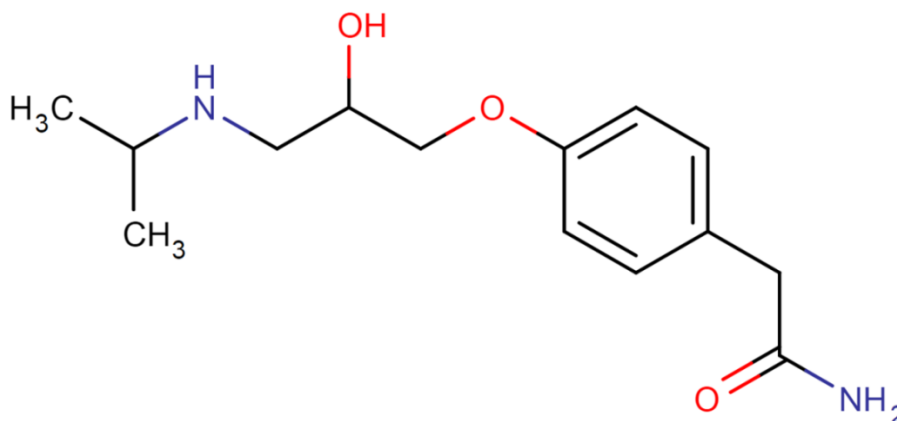


Figura 3. Fórmula estrutural do ATN.

Na literatura são relatados diversos métodos eletroanalíticos para a determinação de ATN em formulações farmacêuticas e/ou em fluídos biológicos. Nos trabalhos de (i) Goyal et al. [27], (ii) Arvand et al. [28], (iii) Khoobi et al. [29] e (iv) Amiri e Nematollahzadeh [30], a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) empregando como eletrodos de trabalho: óxido de estanho dopado com índio modificado com nanopartículas de ouro (i); eletrodo de pasta de carbono modificado com Zeólita Mordenita (ii); pasta de nanotubos de carbono (iii) e carbono vítreo modificado com poli-dopamina foi utilizada para determinação de:

- ATN em formulações farmacêuticas e em amostras de urina (i);
- ATN em formulações farmacêuticas (ii).
- ATN e betaxolol (simultânea) em amostras de plasma humano (iii).
- ATN em soluções fisiológicas (iv).

No trabalho de Sartori et al. [31], o ATN foi determinado simultaneamente com propanolol em formulações farmacêuticas por voltametria de onda quadrada em eletrodo de BDD.

Arvand et. al. [32] propuseram o uso de um eletrodo de íon seletivo para determinação potenciométrica de ATN em amostras farmacêuticas.

Em outro trabalho, de Behpour et al. [33], as técnicas de voltametria cíclica (CV), DPV e cronocoulométricas, empregando pasta de carbono como eletrodo de trabalho, foram utilizadas para determinar ATN em formulações farmacêuticas e em amostras de urina.

Para o processo de oxidação de ATN sobre o eletrodo de BDD, há relatos que o processo predominante é o difusional [31] e que envolve dois elétrons por molécula do analito [27, 33]. Goyal et al. [27], sugeriram que o processo principal para o mecanismo de oxidação do ATN provavelmente ocorre no grupo alcóolico secundário, formando a cetona correspondente (Figura 4).

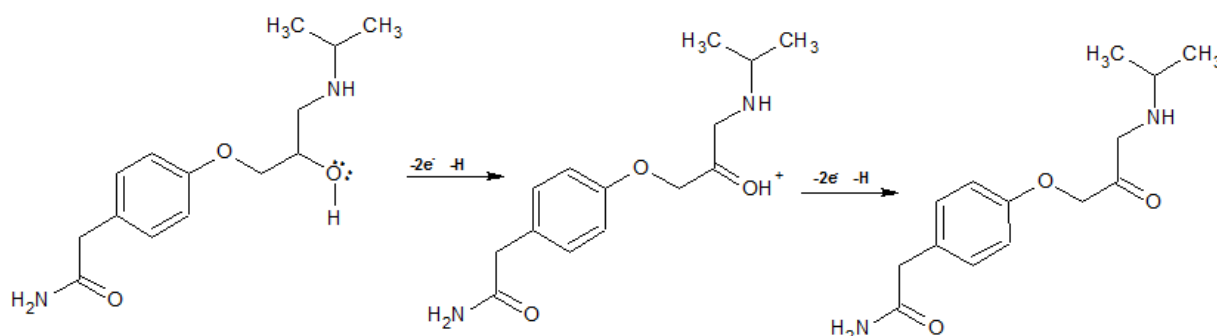


Figura 4. Mecanismo de oxidação eletroquímica de ATN.

1.3.3 Associação de AML e ATN

Atualmente, AML e ATN são encontrados conjugados e em diferentes dosagens em formulações farmacêuticas utilizadas para o tratamento de pacientes cuja pressão arterial não é controlada adequadamente com o uso de um único

fármaco. Na referida associação, tem-se a combinação de dois efeitos farmacológicos, onde o bloqueador dos canais de cálcio age relaxando o músculo liso e, sinergicamente, o betabloqueador age como bloqueador beta-adrenérgico, diminuindo o ritmo e a força de contração cardíaca [2, 3].

Têm sido reportados na literatura alguns métodos analíticos para quantificação simultânea de ATN e AML. Nesses trabalhos a determinação dos compostos foi realizada com HPLC [34-36], HPTLC [37] e espectrofotometria [38-41]. Como alternativa a essas técnicas, tem-se as técnicas eletroanalíticas, que são geralmente mais simples, rápidas e apresentam custo menor, quando comparadas com HPLC, e geralmente mais sensíveis, comparando à espectrofotometria [42]. No entanto, a aplicação de técnicas eletroanalíticas na determinação desses compostos vem sendo direcionada a determinações individuais de AML [21, 43], de ATN [27, 32] e em associações semelhantes, por exemplo AML e Valsartan [18], AML e Maleato de Enalapril [16], ATN e Propanolol [31] e ATN e Betaxolol [29].

Nesse sentido, os métodos eletroanalíticos empregados para a determinação de AML ou ATN, incluem voltametria de onda quadrada [15, 17-20, 31], voltametria de pulso diferencial [21, 30] e pulso diferencial com redissolução anódica [28]. No entanto, segundo nosso conhecimento, não há nenhum método eletroanalítico relatado na literatura para a determinação de combinações contendo AML e ATN.

O sistema de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho, tem sido utilizado com sucesso na quantificação de diferentes analitos, principalmente compostos orgânicos. Nosso grupo de pesquisa tem obtido sucesso nesse tipo análise [4, 6, 42, 44-50], representando, dessa forma, uma alternativa para determinações simples e rápidas.

1.4 Amperometria

A técnica da amperometria baseia-se na aplicação de um degrau de potencial (Figura 5A) que produz uma resposta de corrente que decai rapidamente

com o tempo (Figura 5B). Assim, o uso de sensores amperométricos tem como objetivo a medida de uma resposta de corrente a partir da aplicação de um potencial fixo [51, 52].

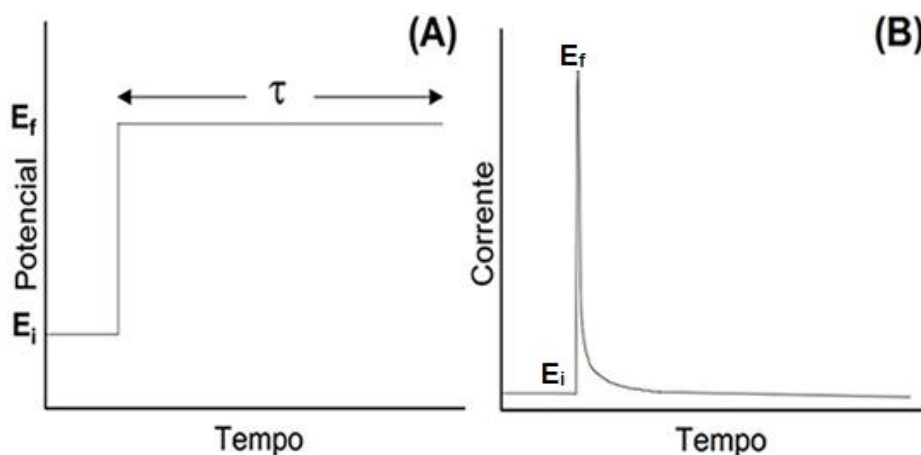


Figura 5. (A) Degrau de potencial aplicado; **(B)** resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial [53].

Uma desvantagem de algumas técnicas voltamétricas é a limitação imposta pela soma da componente capacitiva ao processo faradaico, o que, frente às baixas correntes geradas pelo processo faradaico quando da quantificação de concentrações pequenas de analitos, torna-se inconvenientemente limitado. Nesse aspecto, a amperometria apresenta vantagem de destaque, posto que por se tratar de uma técnica que trabalha em potencial constante, a corrente capacitiva torna-se constante e muito próxima de zero. A utilização de altas concentrações relativas do eletrólito inerte minimiza as variações na região da dupla camada elétrica e garante que o sinal transiente registrado possa ser atribuído ao processo faradaico [54].

Associando-se a métodos analíticos com alta velocidade, tais como FIA e BIA, a amperometria se torna muito atraente, posto que as respostas de interesse (picos de corrente) devem ser proporcionais à concentração do analito. Nesse sentido, têm sido reportados na literatura diversos estudos envolvendo a aplicação deste tipo de detecção [55-60].

Uma das limitações da amperometria e de outras técnicas eletroanalíticas é a possibilidade de adsorção de espécies e/ou impurezas na superfície do eletrodo, implicando falta de repetibilidade em análises sucessivas. Objetivando-se maior reprodutibilidade nas análises envolvendo a amperometria, vêm sendo cada vez mais utilizados dois modos de detecção amperométrica: (i) a detecção amperométrica pulsada (PAD, do inglês "Pulsed Amperometric Detection") e a (ii) amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês "Multiple Pulse Amperometry"). Nestas técnicas, dentre outras vantagens, há a possibilidade de aplicação de um pulso de potencial especificadamente para efetuar uma constante limpeza da superfície do eletrodo de trabalho. Assim, essas técnicas permitem a aplicação de um ou mais pulsos de potenciais adicionais responsáveis pela constante limpeza e/ou condicionamento da superfície do eletrodo de trabalho empregado [7, 44, 61].

As técnicas PAD e MPA se assemelham na forma de aplicação dos pulsos de potenciais e se distinguem no modo de aquisição das correntes geradas. Na PAD, dois ou mais pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo, entretanto a aquisição do sinal de corrente é limitada a um único pulso de potencial e nos demais pulsos não há a possibilidade de monitoramento da corrente [62].

A MPA permite a aplicação de até 10 (dez) pulsos de potenciais, dentre esses pulsos pode-se empregar pulsos de limpeza e, por exemplo, monitorar de modo simultâneo o sinal eletroquímico da espécie analítica nos demais pulsos de potencial. Segundo nosso conhecimento, esta técnica é somente disponibilizada em potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm - Eco Chemie (software GPES 4.9) [62].

Nesse sentido, há a possibilidade de quantificação seletiva de dois compostos eletroativos de forma simultânea, onde uma das espécies é detectada em um primeiro pulso de potencial e em um segundo pulso de potencial ambos os compostos presentes na amostra podem ser detectados. Para se ter acesso a corrente relativa ao segundo analito, basta o emprego de um fator de correção simples [22, 63-65]. De modo análogo, para determinação de três analitos, uma das espécies é detectada em um primeiro pulso de potencial, duas espécies são detectadas no segundo pulso de potencial e as três espécies no terceiro pulso de

potencial. Neste caso, três fatores de correção são normalmente necessários para se ter acesso às correntes relativas aos segundo e terceiro analitos [48, 66].

1.5 Análise por injeção em batelada

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “batch injection analysis”) é uma técnica analítica apresentada na literatura por Wang e Taha no início da década de 90 [67]. O sistema BIA pode ser considerado uma boa alternativa aos métodos baseados em FIA (do inglês “flow injection analysis”) para também aumentar a frequência analítica [68]. A técnica BIA com detecção amperométrica consiste em injetar, com o auxílio de uma micropipeta (normalmente eletrônica), um pequeno volume de uma solução da amostra diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho, estando este imerso em uma grande quantidade de volume do eletrólito suporte.

A Figura 6 apresenta um exemplo de célula BIA, adaptada para o uso com eletrodo de BDD. O sistema pode ser operado com ou sem agitação da solução no interior da célula [69]. A posição do eletrodo de trabalho é oposta à ponteira do sistema de injeção, configuração do tipo “wall-jet”, onde volumes são injetados diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho.

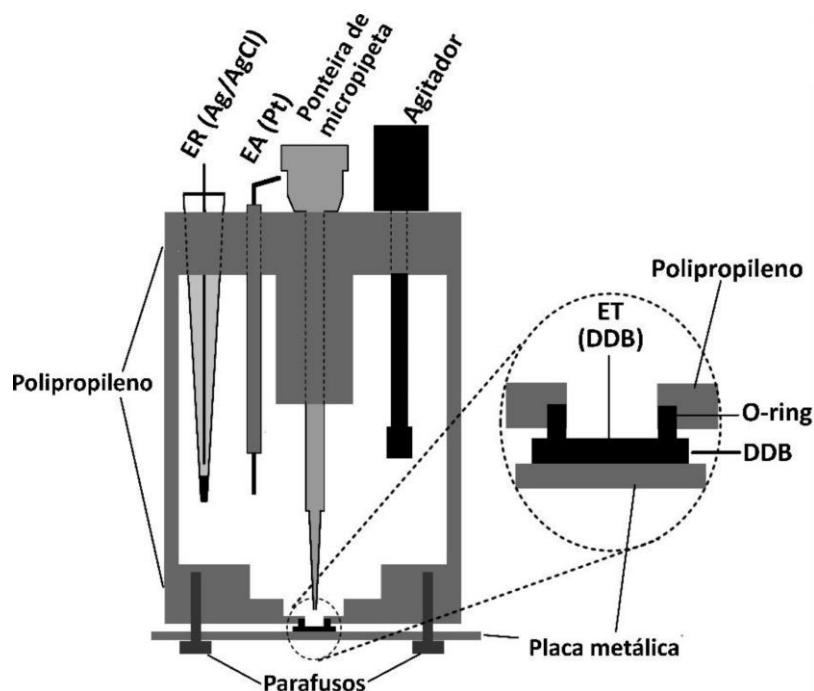


Figura 6. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) [69].

Quando ocorre a passagem da espécie em análise sobre a superfície do eletrodo, são registrados picos (sinais transientes), conforme ilustrado na Figura 7.

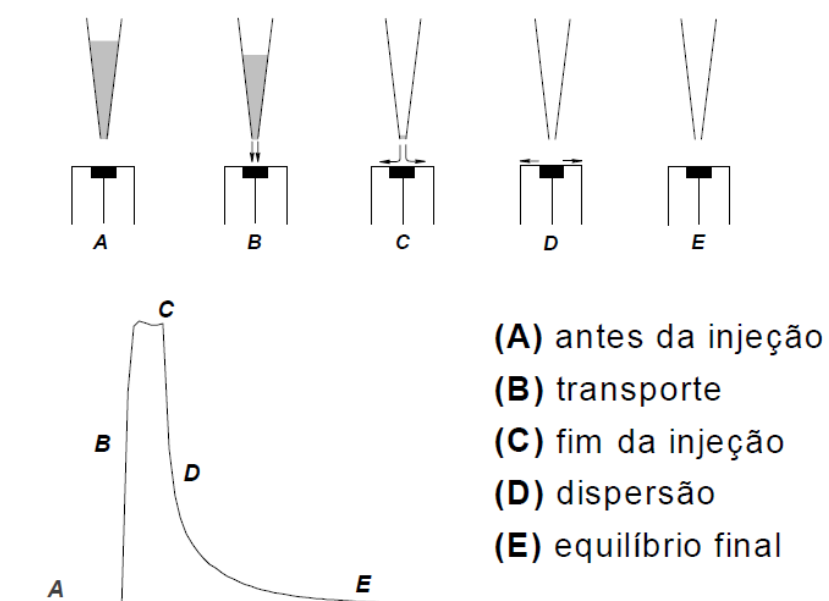


Figura 7. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido [53].

Nesta ilustração, a operação do sistema BIA foi dividida em cinco etapas: (i) antes da injeção de solução contendo a espécie eletroativa (EE) observa-se uma corrente constante, atribuída a corrente residual (capacitiva) gerada a partir do eletrólito inerte, indicando que não existe reação de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução (Figura 7A); (ii) quando a solução contendo a EE (padrão ou amostra) é injetada, há um rápido aumento da corrente, devido ao processo faradaico relacionado ao analito de interesse transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção (Figura 7B); (iii) continuando a injeção da EE a corrente atinge um valor máximo permanecendo constante até o final da injeção (Figura 7C); (iv) após o término da injeção da EE, há uma queda do sinal analítico referente à mudança do transporte (convectivo para difusional) (Figura 7D), e (v) o sistema retorna ao equilíbrio (corrente residual) existente antes da injeção (Figura 7E). A agitação mecânica da solução presente no interior da célula pode auxiliar na redução do tempo em que esse sistema retorna ao equilíbrio inicial (difusão + convecção) [44].

Ao compararmos o sistema BIA com o FIA, percebe-se que o procedimento BIA possui diversas características similares às apresentadas por FIA, como: rapidez, simplicidade, boa repetibilidade e sensibilidade e possibilidade de trabalhar com baixos volumes de amostras e reagentes. Em ambos os sistemas, o fenômeno da passivação ou contaminação da superfície do eletrodo de trabalho é menor em relação aos sistemas estacionários devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho durante as análises [70]. Apesar disso, os sistemas BIA têm sido pouco explorados, frente ao que se tem relatado sobre o uso de sistemas FIA [53].

O sistema BIA apresenta como limitações ou restrições quanto a procedimentos de derivatizações, pré-tratamentos ou diluições *online* de amostras, devido à proximidade existente entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho. Além disto, as possibilidades de automação são mais limitadas [66, 67].

Como vantagens dos sistemas BIA em relação a FIA, podemos citar: (i) menor lixiviação do material usado em eletrodos modificados (não há soluções carregadoras em fluxo contínuo) [53]; (ii) melhor sensibilidade (menor efeito de dispersão ou diluição da amostra) [71, 72]; (iii) possibilidade de injeção da amostra

sem prévia diluição no eletrólito suporte, pois a força iônica se mantém praticamente inalterada (um pequeno volume de amostra é injetado em um volume muito grande de eletrólito) [73]; (iv) menor geração de resíduos; (v) não há necessidade do uso de válvulas, bombas e tubos de conexão; (vi) redução de problemas relacionados a vazamentos e presença de bolhas de ar [71]. Além disto, as características dimensionais da aparelhagem e a disponibilidade de todos componentes do sistema alimentados por baterias (pipeta eletrônica, potenciostato e computador portátil), bem como simplicidade de manuseio, permitem o desenvolvimento de métodos analíticos portáteis [73], que podem ser utilizados em análises em campo ou em laboratórios com infraestrutura mínima [5].

As potencialidades, conceitos e princípios do sistema BIA têm sido explorados e ilustrados com diferentes técnicas de detecção (calorimetria, fluorescência, amperometria, potenciometria e voltametria [50, 71, 74-78]. Alguns parâmetros que influenciam a resposta do sistema foram discutidos e descritos na literatura [46, 79, 80].

Um dos problemas recorrentes do sistema BIA empregando eletrodos sólidos e detecção eletroquímica é o de contaminação/adsorção de componentes na superfície do eletrodo de trabalho. Esse problema pode ser contornado, em sistemas hidrodinâmicos, pela aplicação repetitiva e alternada de pulsos de potenciais de limpeza (detecção amperométrica pulsada) [63, 81-83]. Entretanto, a amperometria pulsada tem sido pouco utilizada como modo de detecção em sistemas BIA [49, 84], talvez devido à maioria dos estudos empregando BIA com detecção amperométrica terem sido realizados com a solução no interior da célula no estado estacionário, sendo que a limpeza eletroquímica é mais eficaz com o meio (solução) em agitação.

Recentemente, sistemas BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos vêm sendo explorados com sucesso para executar determinações simultâneas usando somente um eletrodo de trabalho [46]. Para tanto, escolhe-se uma combinação de pulsos de potenciais, de modo que em um dos pulsos apenas um analito seja detectado e nos outros pulsos os demais. Utiliza-se então, em análises envolvendo duas substâncias, um fator de correção simples para se obter a corrente relativa ao segundo analito [42, 44, 45]. De modo análogo, para determinação de três analitos, utiliza-se três fatores de correção [48]. A técnica

permite ainda a aplicação de um terceiro ou quarto pulso de potencial para evitar a contaminação ou promover a constante limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho empregado.

1.6 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

Diamante dopado com boro (BDD, do inglês “boron doped diamond”) é um material a base de carbono que vem sendo usado com sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos [85-88].

Um dos métodos mais empregados para obtenção do BDD é a deposição química em fase de vapor (CVD, do inglês “chemical vapor deposition”) [89]. Nesse método, um filme de diamante é obtido a partir de uma fonte de gás rico em carbono (metano diluído em hidrogênio, por exemplo) produzindo-se uma fina camada do filme de diamante disposta sobre um substrato condutor (o silício, por exemplo) [90-92]. Ocorre que o diamante é um material isolante, com resistividade da ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$, mas que, se apropriadamente dopado, adquire boa condutividade e o que potencializa seu emprego como eletrodo [90-93].

Assim, diferentes dopantes podem ser usados, merecendo destaque o boro, por ser o mais utilizado. Para introduzir boro no filme de diamante durante o crescimento, um reagente contendo boro é adicionado à mistura dos gases de deposição [94]. Para este propósito, um composto volátil de boro é utilizado, por exemplo, trimetil-borato, que é adicionado à fase gasosa numa quantidade de 10-10000 ppm. As propriedades do filme de BDD assim obtido dependem da concentração de boro no filme, variando desde as de material dielétrico às de semicondutor, semicondutor degenerado e, finalmente, semimetal, à medida que essa concentração aumenta [91, 92].

Portanto, a obtenção do BDD é realizada por CVD e durante a deposição do filme de diamante sobre o substrato condutor utiliza-se um composto volátil de boro numa proporção pré-definida. O eletrodo obtido possui propriedades únicas e geralmente superiores a outras formas de carbono (carbono vítreo, grafite pirolítico e pasta de carbono, por exemplo), que incluem [95]:

- a) Pequena e estável corrente de fundo ao longo de um amplo intervalo de potencial;
- b) Ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso;
- c) Cinética relativamente rápida de transferência de elétrons para vários sistemas redox sem pré-tratamento convencional (polimento mecânico);
- d) Baixa adsorção molecular;
- e) Estabilidade dimensional e resistência à corrosão;
- f) Transparência óptica.

Neste trabalho foram aproveitadas as vantagens apresentadas pelo eletrodo de BDD associado ao sistema BIA com detecção amperométrica para o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, rápidas e de baixo custo para a quantificação dos anti-hipertensivos AML e ATN em formulações farmacêuticas. Adicionalmente, os métodos desenvolvidos poderão ser empregados no controle de qualidade de formulações farmacêuticas bem como no controle de qualidade dos fármacos (pureza) antes da etapa de produção das formulações farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi propor um método simples, rápido e de baixo custo para a determinação simultânea de ATN e AML em formulações farmacêuticas empregando BIA-MPA e BDD como eletrodo de trabalho. Especificamente, os objetivos do trabalho foram os seguintes:

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico de AML e ATN: conhecer os mecanismos de oxidação de AML e ATN; definir a melhor ativação/limpeza do eletrodo de BDD; efetuar o estudo do eletrólito e pH;
- ✓ Otimizar os parâmetros envolvidos no funcionamento do sistema BIA-MPA: pulso de potencial de limpeza do eletrodo de BDD; agitação da solução no interior da célula; volume e vazão de injeção;
- ✓ Definir diversos parâmetros de confiabilidade analítica (figuras de mérito): sensibilidade, repetibilidade, faixa linear de trabalho e limites de detecção e quantificação.
- ✓ Efetuar a quantificação dos compostos de interesse (AML e ATN) em fármacos comerciais empregando o sistema proposto (BIA-MPA) e comparar os resultados obtidos aos obtidos por HPLC.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

3.1.1 Detecção eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato μ -Autolab Type III (Metrohm Autolab, Utrecht, The Netherlands) conectado a um micro-computador e controlado pelo Software GPES versão 4.9.007.

3.1.2 Eletrodos utilizados

A combinação de eletrodos utilizada foi:

- Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho (Figura 8);
- Eletrodo de Ag/AgCl/KCl_{sat.} como eletrodo de referência;
- Eletrodo de platina como eletrodo auxiliar (fio de platina).

As peças de BDD foram adquiridas da empresa Adamant Technologies AS (La Chaux-de-Fonds, Suíça). Recentemente, esta empresa foi descontinuada e o material com as mesmas especificações pode ser adquirido da empresa NeoCoat - innovative CVD Diamond Solutions (NeoCoat SA - Eplatures-Grise 17, CH-2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland). Segundo especificações do fabricante, o filme de BDD de 1,2 μm de espessura (com dopagem de 7000 a 8000 ppm) vem depositado sobre uma placa condutora de silício de 1 cm de espessura (7 x 7 mm). Para limpeza/ativação da superfície de BDD, dois procedimentos foram utilizados [46]: (i) ativação catódica: aplicação de uma corrente de -0,01 A por 1000 s em meio de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} [96]; (ii) ativação anódica: aplicação de corrente de +0,01 A por 1000 s em meio de tampão BR pH 2,0 0,12 mol L^{-1} [97].

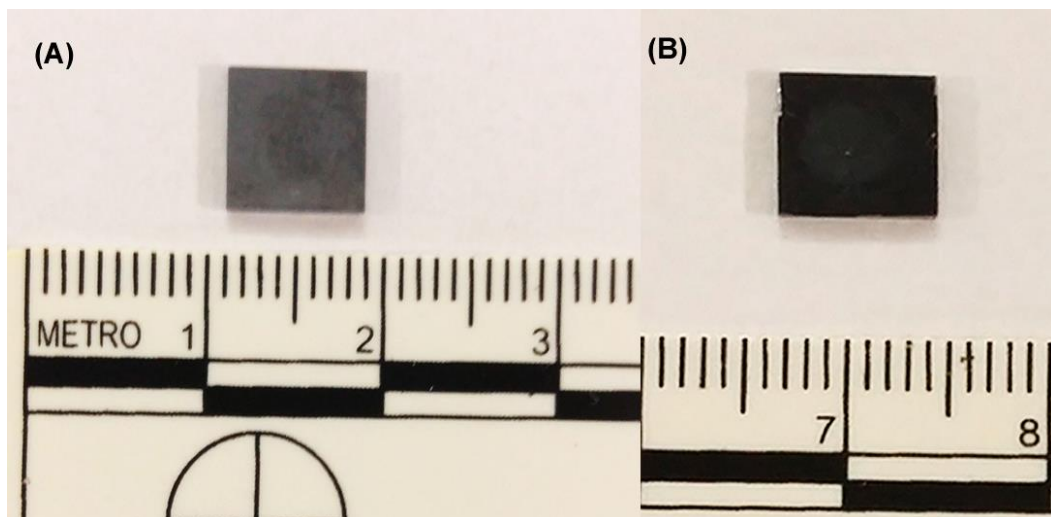


Figura 8. Placa de silício (7 x 7 mm) coberta com filme de BDD usada como eletrodo de trabalho. Face sem (A) e com o filme de BDD (B).

O eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat.}}$) foi preparado pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag. A eletrodeposição de AgCl foi feita através da aplicação de +0,3 V (vs $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat.}}$) durante 1 hora sobre um fio de Ag imerso em uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹, tal como descrito na literatura [98].

3.1.3 Células Eletroquímicas

3.1.3.1 Célula para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias foi utilizada uma célula de teflon de volume aproximado de 10 mL (Figura 9). O eletrodo de BDD foi posicionado no fundo da célula com o auxílio de um anel de borracha e de uma placa de circuito impresso de cobre (contato elétrico). A superfície de silício com o filme de BDD foi posicionada sobre a placa de circuito impresso, a qual foi parafusada no fundo da célula. Desta forma, a placa de silício com o filme de BDD foi pressionada contra o anel de borracha posicionado no fundo da célula. O anel de borracha tem duas funções: impedir o vazamento e delimitar a área do eletrodo de BDD (definida pelo diâmetro interno do anel).

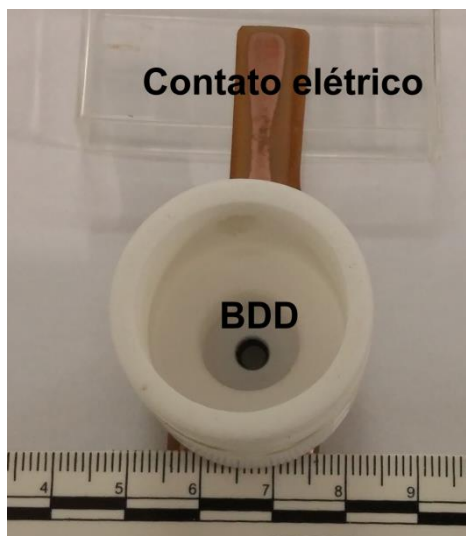


Figura 9. Célula de teflon utilizada nos experimentos estacionários com eletrodo de BDD.

3.1.3.2 Célula para medidas hirodinâmicas (sistema BIA)

A célula eletroquímica do tipo BIA (Figura 10) utilizada neste trabalho foi construída a partir de um tubo de vidro oco com volume aproximado de 180 mL (6,4 cm de diâmetro e 5,6 cm de comprimento). Uma base e uma tampa para o tubo de vidro foram construídas a partir de um bastão de polipropileno [69].

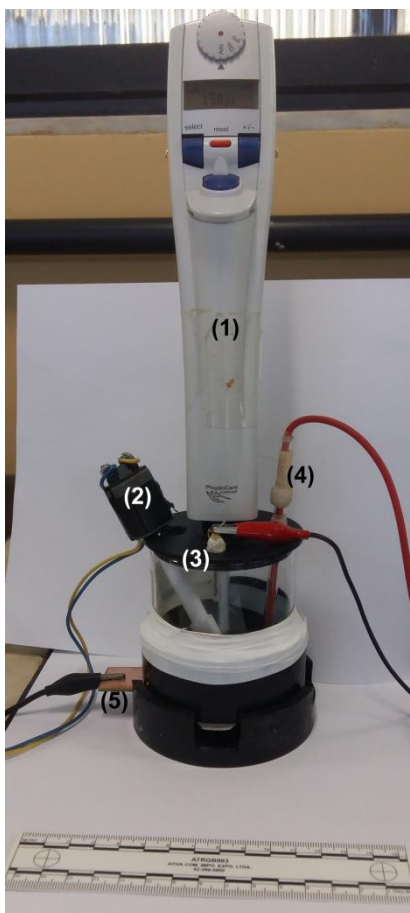


Figura 10. Célula BIA montada: (1) micropipeta eletrônica, (2) agitador mecânico, (3) eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat.}}$), (4) eletrodo auxiliar (Pt), (5) placa de cobre em contato ao eletrodo de trabalho (BDD).

O eletrodo de BDD foi posicionado na parte inferior da célula com o auxílio de um anel de borracha e pressionado por uma placa de circuito impresso de cobre (contato elétrico). Esta placa era fixada no fundo do tubo de polipropileno por outra placa metálica disposta perpendicularmente e encaixada por porcas borboletas a pinos metálicos rosqueados presentes no fundo do tubo (Figura 10). A disposição da superfície de silício com o filme de BDD e as funções do anel de borracha já foram descritas na célula para medidas estacionárias. A área útil do eletrodo de BDD foi de $22,9 \text{ mm}^2$ (definida pelo diâmetro interno do anel: 5 mm).

A parte inferior da célula BIA era encaixada simetricamente numa base de polipropileno, devidamente projetado para acomodar as placas metálicas dispostas

perpendicularmente (Figuras 10 e 11), dispensando o uso de garras metálicas para estabilizar a célula sobre a bancada.

Na parte superior (tampa) (Figura 11) havia cinco orifícios onde foram posicionados um agitador mecânico, os eletrodos de referência e auxiliar e, no centro dessa tampa, a micropipeta eletrônica de modo que a ponteira era firmemente acoplada de maneira simétrica e frontal à superfície do eletrodo de trabalho e em uma distância fixa, no decorrer das injeções, de aproximadamente 2 mm dessa superfície (configuração *wall-jet*) [5, 69].

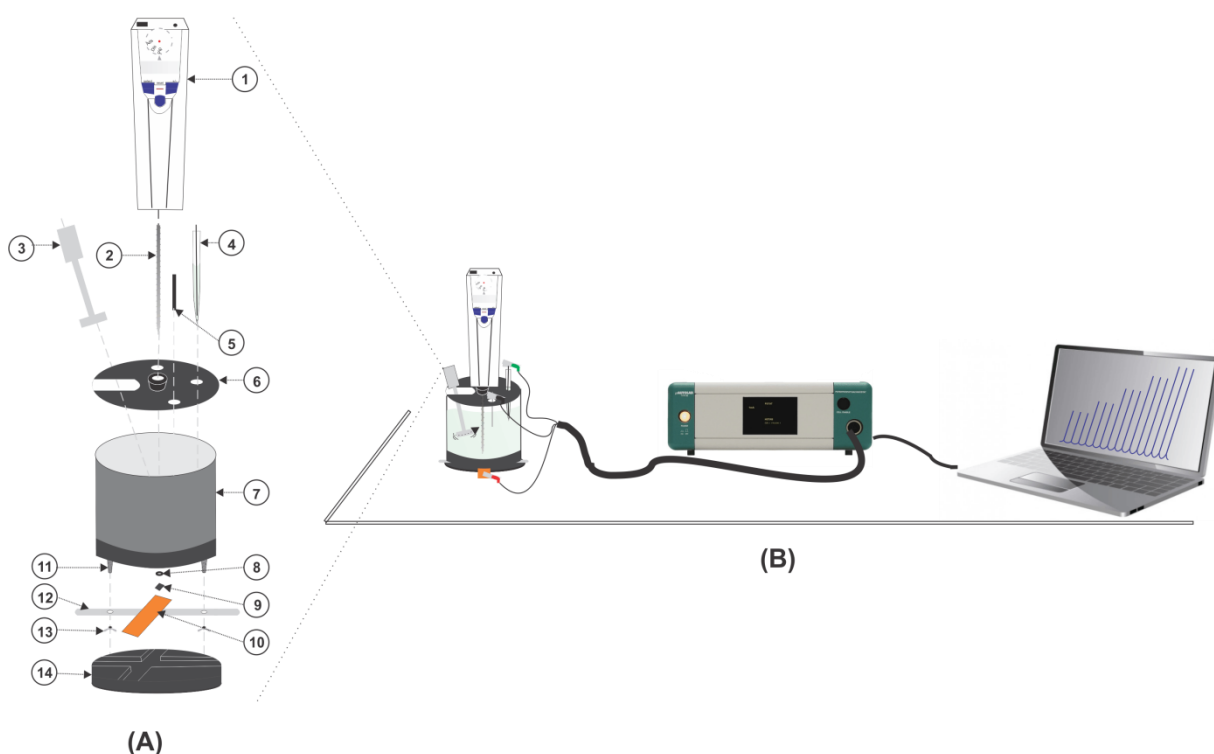


Figura 11. (A) Vista explodida da célula BIA: (1) micropipeta eletrônica; (2) ponteira de 1,00 mL; (3) agitador mecânico; (4) eletrodo de referência ($\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat.}}$); (5) eletrodo auxiliar (Pt); (6) tampa da célula BIA; (7) corpo da célula BIA; (8) anel de borracha; (9) eletrodo de trabalho (BDD); (10) placa com circuito de cobre impresso; (11) parafusos; (12) placa metálica; (13) porcas borboletas; (14) base da célula BIA. **(B)** Sistema BIA acoplado ao potenciostato/galvanostato conectado a um computador (notebook).

A micropipeta eletrônica utilizada no sistema BIA foi a Eppendorf® Multipette stream (Figura 12) que, usando um combitip® (ponteira) de 1 mL, permite a manipulação eletrônica de diversos volumes (10 a 1000 μL) e vazões de injeção (28 a 350 $\mu\text{L s}^{-1}$). Como se trata de um processo de injeção motorizado, operadores com pouca ou nenhuma experiência podem realizar as injeções ao sistema de forma reprodutível.



Figura 12. Micropipeta eletrônica utilizada para injeções no sistema BIA.

O sistema de agitação (Figura 13) é composto por um micro-motor DC de 12 V usado originalmente em secadores de cabelo ou brinquedos elétricos. Ao eixo deste micro motor foi adaptado com uma haste de teflon [49] e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de tensão variável (3 a 12 V - 700 a 4000 rpm). Quanto maior a voltagem selecionada, maior é a rotação do motor.

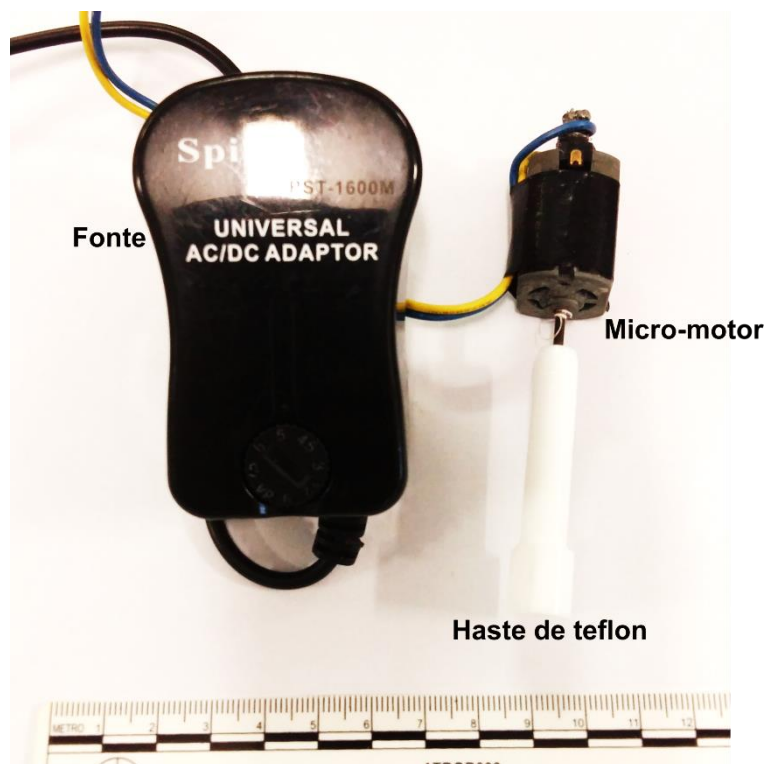


Figura 13. Sistema de agitação adaptado para célula BIA.

3.1.4 HPLC

Nas análises envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector espectrofotométrico, um sistema composto com os seguintes componentes foi utilizado: bomba LC-10AD (Shimadzu, Japan), forno CTO-10A (Shimadzu, Japão), detector espectrofotométrico SPD-10A (Shimadzu, Japan) e coluna C_{18} (Phenomenex 110A° Gemini- C_{18} , 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). A fase móvel utilizada era composta por uma mistura de tampão acetato de amônio (0,02 mol L^{-1}) acetonitrila e metanol na proporção de 35:30:35 (grau HPLC). O volume de injeção, vazão, temperatura e comprimento de onda foram os seguintes: 20 μ L, 1,5 mL min^{-1} , 40 $^{\circ}C$ e 237 nm, respectivamente [36].

3.2. Reagentes, soluções e preparo de amostras

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade não inferior a 18 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação de água Millipore Direct-Q3 (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica (PA). Atenolol (ATN), besilato de amlodipina (AML) e ácido bórico foram obtidos da Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Etanol, metanol, ácido acético, ácido sulfúrico e ácido fosfórico foram obtidos da Synth (Diadema – Brasil). Tampão Britton-Robinson [99] foi utilizado como eletrólito suporte nos experimentos em BIA e as amostras e soluções-estoque dos padrões foram preparadas diariamente.

Para o estudo inicial do comportamento eletroquímico e definição do eletrólito suporte, as soluções estoque de AML e ATN foram preparadas em etanol obtendo concentração de 10 mmol L⁻¹. Posteriormente, estas soluções padrões foram diluídas em tampão BR 0,12 mol L⁻¹ com 10% de etanol, preparado pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico (todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹) e etanol. O pH de cada solução tampão BR foi ajustado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ de modo a obtermos soluções tampão BR em diversos valores de pH, no caso: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0.

As amostras do medicamento contendo AML e ATN foram obtidas em drogarias na cidade de Uberlândia-MG. No procedimento de preparo de amostras, a massa do conteúdo de sete cápsulas foi macerado até completa homogeneização utilizando-se um almofariz e pistilo de porcelana. Em seguida, uma massa adequada de cada amostra foi diluída diretamente no eletrólito suporte para obtenção de soluções com concentrações que constem na faixa linear do método.

Devido a grande diferença de concentração (em massa) existente entre AML e ATN nas formulações farmacêuticas comerciais (5 ou 10 vezes mais ATN do que AML), cada amostra foi preparada de duas formas diferentes: (i) mais diluída para determinação de ATN e (ii) mais concentrada para determinação de AML. As diferentes diluições foram denominadas conforme Tabela 1:

Tabela 1. Características e denominação dos fármacos contendo associação de AML e ATN.

Amostra	Composição em massa (AML:ATN)	Proporção molar (AML:ATN)	Analito de interesse	Denominação
S ₁	5:25 (1:5)	1:7,6	AML	S ₁ C ₁
S ₁	5:25 (1:5)	1:7,6	ATN	S ₁ C ₂
S ₂	5:50 (1:10)	1:15,33	AML	S ₂ C ₁
S ₂	5:50 (1:10)	1:15,33	ATN	S ₂ C ₂

As amostras S₁C₁ e S₂C₁ foram preparadas de modo a possuírem concentrações aproximadas de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, tomando como referência as concentrações informadas na bula do medicamento. As amostras S₁C₂ e S₂C₂ foram preparadas de modo análogo para possuírem uma concentração de aproximadamente 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN.

Assim, por exemplo, na análise da amostra em que a composição molar rotulada era de 1:7,6 (AML:ATN), procedeu-se duas diluições: uma de modo a possuir aproximadamente 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML injetada durante o amperograma obtido com a aplicação do pulso de +1,0 V; e outra contendo aproximadamente 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN injetada durante o amperograma com aplicação do pulso de +1,65V.

3.3. Técnicas eletroquímicas

3.3.1 Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos para AML ou ATN foram obtidos para concentrações de 1,0 mmol L⁻¹ entre +0,2 mV e +1,8 V utilizando o eletrodo BDD e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e incremento de potencial de 5 mV.

3.3.2 Amperometria hidrodinâmica

Amperogramas hidrodinâmicos para AML e ATN foram obtidos para uma mistura na proporção molar de 1:7, respectivamente, simulando a proporção molar aproximada de uma das formulações farmacêuticas comerciais. Nesse estudo, treze pulsos de potenciais foram aplicados isoladamente, empregando BIA com detecção por amperometria de potencial constante. A corrente obtida em cada potencial foi registrada como sendo a média de três injeções das soluções (na proporção molar de 1:7). Cada corrente média foi plotada em função do potencial aplicado e apresentado como um voltamograma hidrodinâmico de oxidação para AML e ATN.

3.3.3 Procedimento seguido na análise sequencial

As curvas de calibração foram obtidas isoladamente (de forma sequencial) por amperometria pulsada nos seguintes pulsos de potenciais:

1º) Curva de calibração para AML: aplicação do pulso de +1,0 V / 50 ms para oxidação de AML associado a 0,0 V / 300 ms para limpeza eletroquímica do eletrodo. Foram adicionadas à célula BIA, em injeções sucessivas, as soluções dos padrões de AML em concentrações de 5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, bem como duas amostras das formulações farmacêuticas apropriadamente diluídas. A partir do amperograma obtido, foi possível construir a curva de calibração (corrente (i) em função da concentração de AML).

2º) Curva de calibração para ATN: aplicação do pulso de +1,65 V / 70 ms para oxidação de ATN associado a 0,0 V / 300 ms para limpeza eletroquímica do eletrodo. Foram adicionadas à célula BIA, em injeções sucessivas, as soluções dos padrões de ATN de forma análoga a descrita para AML, sendo possível construir a curva de calibração da corrente (i) em função da concentração de ATN.

3.4. Parâmetros de confiabilidade analítica avaliados

Os parâmetros de confiabilidade analítica utilizados no trabalho são descritos a seguir [100-103].

3.4.1 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração da espécie analítica que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Para os métodos que empregam uma curva de calibração analítica, o limite de detecção pode ser expresso como:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{DPb}}{a} \quad \text{Eq. (1)}$$

Na qual,

DPb = desvio padrão absoluto do branco;

a = coeficiente angular da curva analítica (ou sensibilidade).

3.4.2 Limite de quantificação

O Limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão (proximidade entre os resultados experimentais) e exatidão (proximidade dos resultados experimentais em relação ao valor verdadeiro)[100]. O LOQ pode ser calculado como:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{DPb}}{a} \quad \text{Eq. (2)}$$

3.4.3 Repetibilidade

É o grau de precisão para medidas efetuadas em curto espaço de tempo sob mesmo procedimento de medição; observador; instrumento usado; condições de medida e local.

A repetibilidade do método é verificada contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD) de uma série de medidas. O RSD é calculado da seguinte forma:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{DP}_x}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

onde:

DP_x = Desvio padrão absoluto da concentração encontrada;

\bar{x} = valor médio encontrado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Comportamento eletroquímico de AML e ATN

4.1.1 Definição do eletrólito suporte

Nos estudos envolvendo a molécula de AML tem sido comum o uso de metanol [21, 22, 38] na preparação de soluções estoques, devido à baixa solubilidade do composto em água. Essa escolha pode estar negligenciando o fator toxicidade e, alternativamente, o etanol pode ser utilizado [18] com a vantagem de ser um solvente de risco tóxico inferior quando comparado ao metanol [65]. A FDA (*Food and Drug Administration*), classifica o etanol como solvente da classe 3, menos tóxico e de baixo risco para a saúde humana em comparação com o metanol, classificado como classe 2 [104].

Assim, no estudo do comportamento eletroquímico de cada composto, foi utilizado o etanol como solvente orgânico no preparo das soluções estoques, uma vez que o ATN também é solúvel nesse meio. Inicialmente foram realizados estudos empregando voltametria cíclica para investigar o comportamento de AML e ATN em função do pH do meio utilizando-se tampão BR contendo 10% de etanol. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 14 e 15.

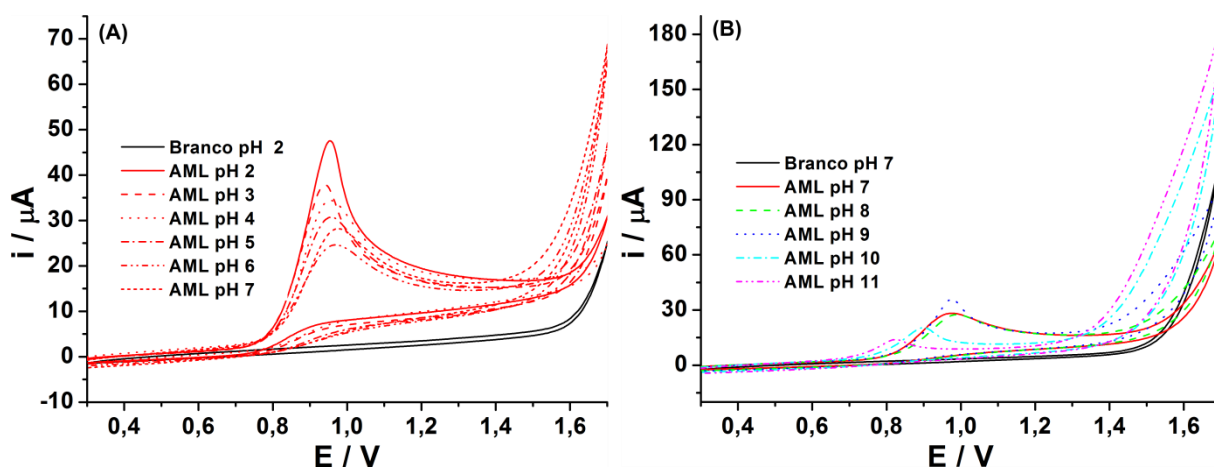


Figura 14. Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo 1 mmol L^{-1} de AML em meio de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 10% de etanol, pH de 2,0 a 7,0 **(A)** e de 7,0 a 11,0 **(B)**. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial: 5 mV.

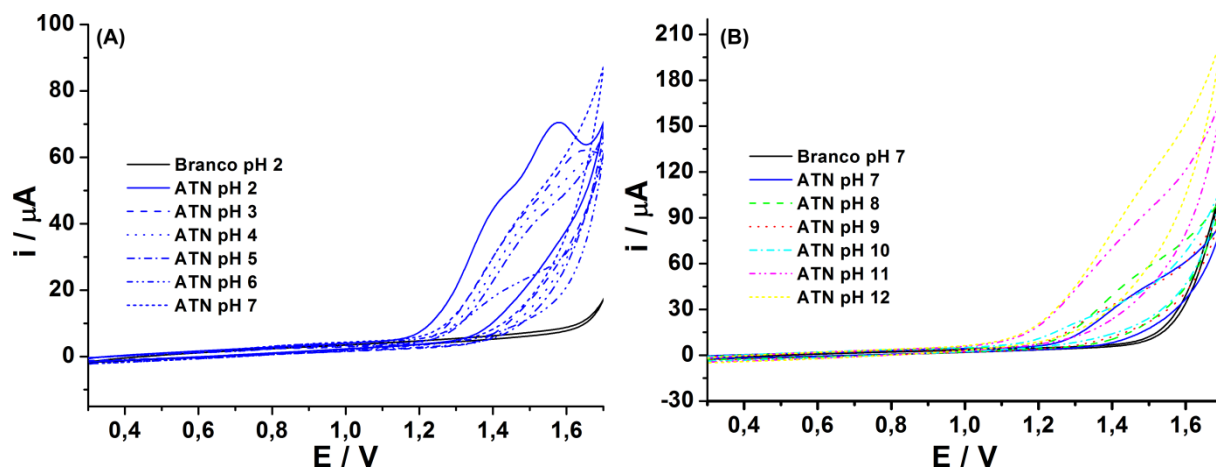


Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo 1 mmol L^{-1} de ATN em meio de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 10% de etanol, pH de 2,0 a 7,0 **(A)** e de 7,0 a 12,0 **(B)**. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial: 5 mV .

As respostas voltamétricas demonstraram a presença de processos de oxidação na região de potencial entre $+0,8 \text{ V}$ e $+1,2 \text{ V}$ para AML e entre $+1,2 \text{ V}$ e $+1,7 \text{ V}$ para ATN. Não foram observados picos de redução na varredura reversa, o que indica a irreversibilidade dos processos de oxidação. A partir dos dados obtidos nesse estudo, foi possível avaliar o efeito do pH sobre o potencial de pico de oxidação de AML e ATN (Figura 16).

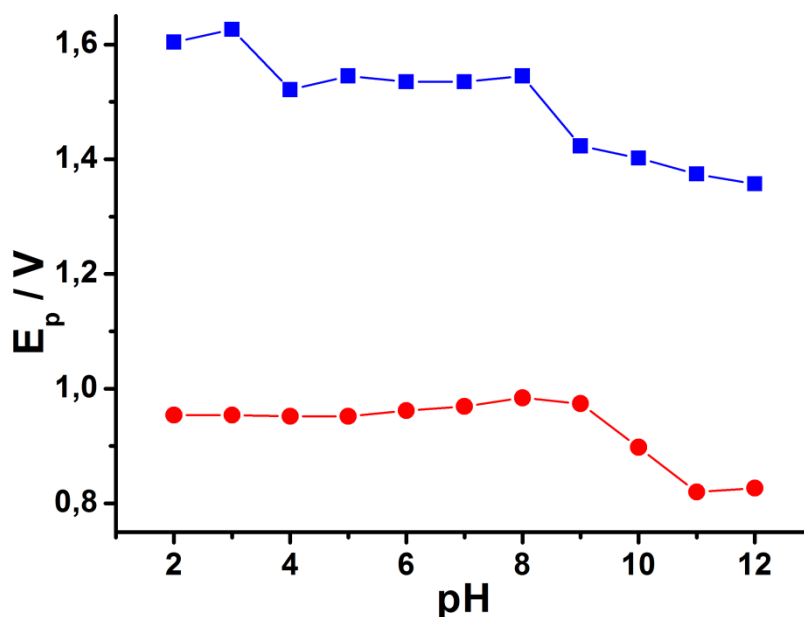


Figura 16. Estudo do efeito do pH nos valores de potenciais de oxidação estimados para AML (●) e ATN (■) por voltametria cíclica. Concentração 1 mmol L^{-1} . Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial 5 mV .

Percebe-se que em soluções com pHs entre 2,0 e 8,0, os potenciais de oxidação de AML e ATN praticamente não variam. A partir do pH 8,0, observa-se um decréscimo do potencial de oxidação, provavelmente pelo fato da desprotonação das espécies em solução nesta região de pH (os pKas de AML e ATN são 9,5 e 9,6, respectivamente) [105]. Provavelmente, neste meio ocorre um aumento da densidade eletrônica, o que facilita a oxidação dos compostos, diminuindo seus respectivos potenciais de oxidação. Coerentemente, a literatura [21] propõe que na oxidação de AML ocorre a oxidação do anel de 1,4-dihidropiridina, formando o anel aromático de piridina correspondente (Figuras 2 e 17A). A oxidação do ATN ocorre no grupo alcóolico secundário, formando a cetona correspondente (Figuras 4 e 17B) [27]. Em ambas as propostas, percebe-se que os grupos envolvidos possuem pares de elétrons livres que podem favorecer a oxidação.

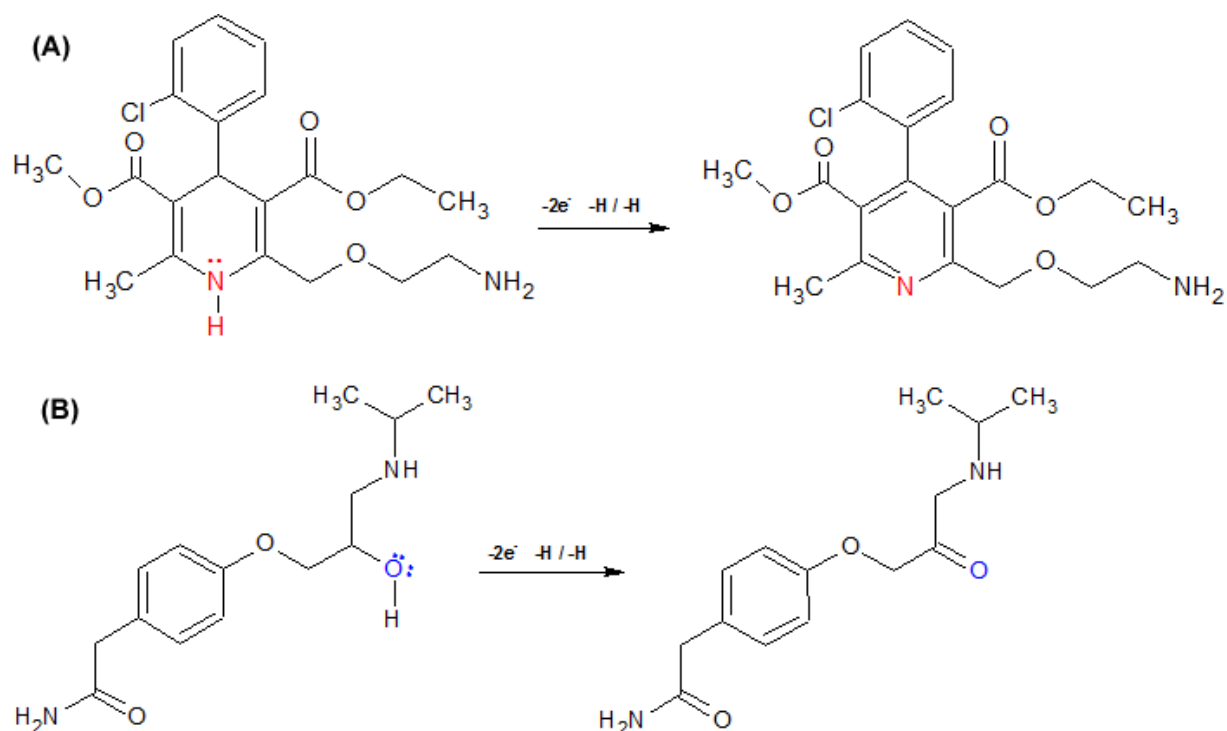


Figura 17. (A) Mecanismos (simplificados) de oxidação eletroquímica para AML (A) e ATN (B).

Durante os estudos realizados para verificar o efeito do pH do meio no potencial de oxidação de AML e ATN percebeu-se que em solução tampão BR pH 2,0, ambos os compostos em estudo apresentam boa solubilidade, podendo dispensar o uso de solventes orgânicos na composição do eletrólito de suporte. Foram observadas boas respostas para esse eletrólito nos experimentos de voltametria cíclica, nos quais os potenciais de oxidação estavam devidamente separados (Figura 18). Este eletrólito foi usado nos estudos posteriores.

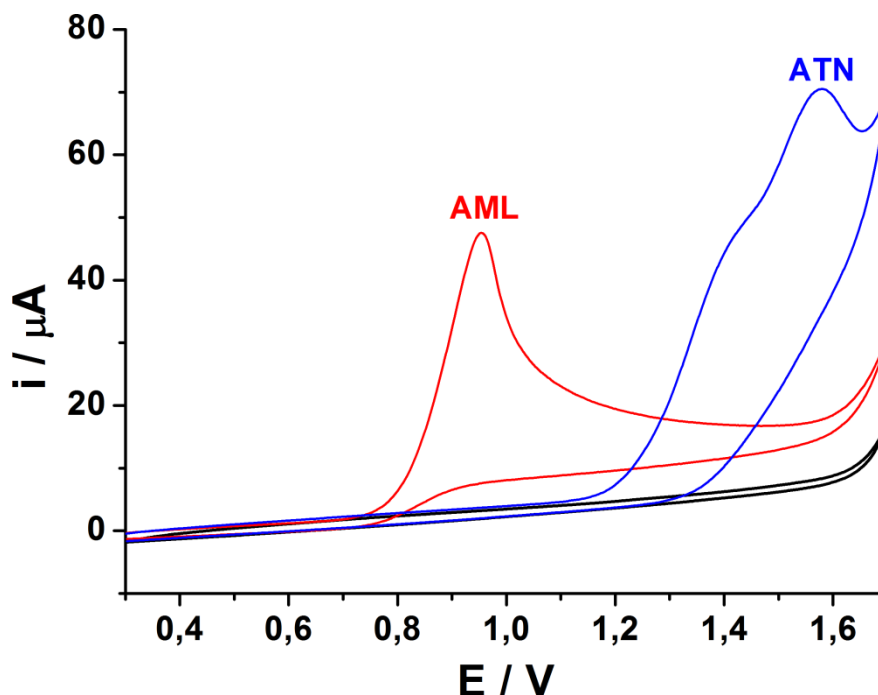


Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo 1 mmol L^{-1} de AML (—) ou 1 mmol L^{-1} de ATN (—) em meio de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial: 5 mV .

4.1.2 Teste de ativação/limpeza do eletrodo de BDD

A ativação da superfície do eletrodo de BDD define a polaridade superficial do mesmo. A ativação anódica aumenta a quantidade de terminações contendo oxigênio e a ativação catódica favorece terminações contendo hidrogênio, alterando o comportamento eletroquímico do BDD [91, 92]. Dessa forma, a influência do tipo de ativação da superfície de eletrodo de BDD foi avaliada.

O efeito da ativação/limpeza do eletrodo de BDD sobre a corrente de oxidação dos analitos foi estudada usando o sistema BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (Figura 19). Neste estudo, as seguintes soluções foram injetadas: (i) $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, (ii) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN e, (iii) $7 + 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e ATN, respectivamente. Essas concentrações foram escolhidas de modo a possuir uma proporção molar de AML:ATN de 1:7, simulando a proporção molar de uma das formulações farmacêuticas comerciais.

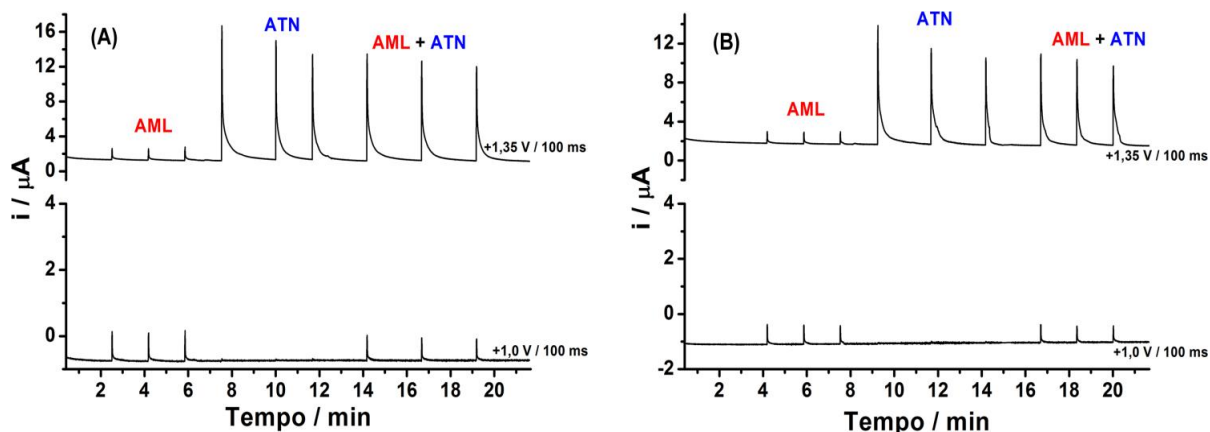


Figura 19. Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos em triplicata para injeções de soluções de AML $7 \mu\text{mol L}^{-1}$, ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou AML $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ + ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (mistura) empregando eletrodo de BDD ativado catodicamente **(A)** e anodicamente **(B)**. Condições: tampão BR pH 2,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); agitação: 1225rpm; volume injetado: $100 \mu\text{L}$; vazão de injeção: $113 \mu\text{L s}^{-1}$.

Na Tabela 2 é apresentada uma comparação das correntes de oxidação detectadas para ambos os analitos em função do tipo de ativação/limpeza do eletrodo de BDD.

Tabela 2. Correntes de oxidação detectadas no sistema BIA-MPA para AML e ATN em função do tipo de ativação/limpeza do eletrodo de BDD:

Ativação	Pulso	I (μA)		
		AML ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$)	ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$	AML $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ + ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$
Anódica	+1,0 V	0,68	0	0,59
Catódica	+1,0 V	0,91	0	0,73
Anódica	+1,35 V	1,19	10,32	8,78
Catódica	+1,35 V	1,362	13,83	11,46

Os valores apresentados na Tabela 2 indicam que quando o eletrodo de BDD foi ativado catodicamente, o sinal analítico obtido era maior que o sinal obtido

quando o eletrodo era pré-tratado anodicamente. Sendo assim, a ativação catódica do eletrodo BDD foi selecionada para ser usada nos estudos posteriores.

4.2. Estudo para determinação simultânea de AML e ATN por BIA com detecção amperométrica

Após a escolha do tampão BR pH 2,0 como eletrólito suporte, testes adicionais para verificar o comportamento eletroquímico de AML e ATN foram realizados empregando BIA com detecção por amperometria de potencial constante. Nesse estudo, treze potenciais (+0,50; +0,60; +0,70; +0,75; +0,80; +0,90; +1,00; +1,10; +1,20; +1,30; +1,35; +1,40; +1,50 V; 70 ms) foram aplicados isoladamente e a corrente em cada potencial foi monitorada durante as injeções em triplicada de soluções contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML ou $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. A corrente de oxidação detectada em forma de pico transiente foi usada na construção do voltamograma hidrodinâmico de oxidação de AML e ATN (Figura 20).

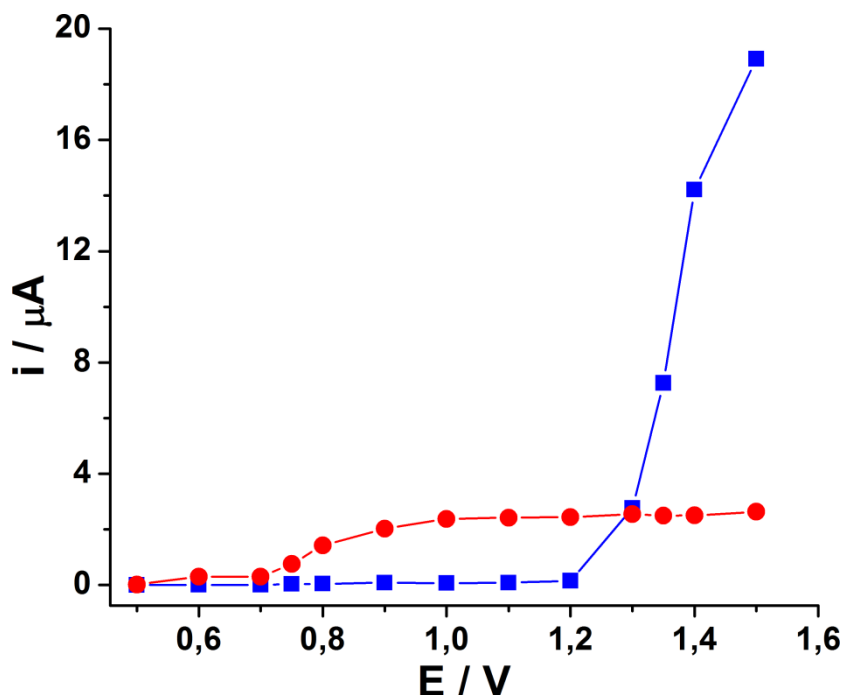


Figura 20. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos com o sistema com detecção amperométrica (E_{cte}) para AML (●; $7 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATN (■; $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ATN). Tempo de aplicação de cada pulso: 70 ms. Eletrólito suporte tampão BR pH 2,0. Agitação 1225 rpm, volume injetado $100 \mu\text{L}$, vazão de injeção $113 \mu\text{L s}^{-1}$.

Esse estudo demonstrou que nas condições estudadas, a oxidação da AML se inicia em torno de +0,75V e atinge um valor máximo próximo de +1,0V. Já a oxidação de ATN se inicia em potenciais maiores que +1,2V e vai aumentando até o último potencial estudado (+1,5 V).

Em determinações simultâneas por BIA-MPA, a determinação seletiva de dois compostos é possível mediante a aplicação de dois pulsos de potenciais em função do tempo, no qual uma das espécies é detectada em um pulso de potencial (de menor energia) e a outra (juntamente com a primeira), em um segundo pulso de potencial (de maior energia). Um fator de correção simples é utilizado para ter acesso a corrente proveniente do segundo analito (não detectado no primeiro impulso de potencial), conforme descrito anteriormente [42, 44-46].

Nesse sentido, percebe-se que no intervalo entre os pulsos de +0,75V a +1,2V, apenas AML é oxidada e a partir de potenciais superiores a +1,2 V, ambas as

espécies são oxidadas. Na Figura 21 são apresentados os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +1,0 V e +1,35 V após injeções ($n = 3$) no sistema BIA-MPA de alíquotas de 100 μL de soluções contendo somente ATN, somente AML e uma mistura dos dois compostos.

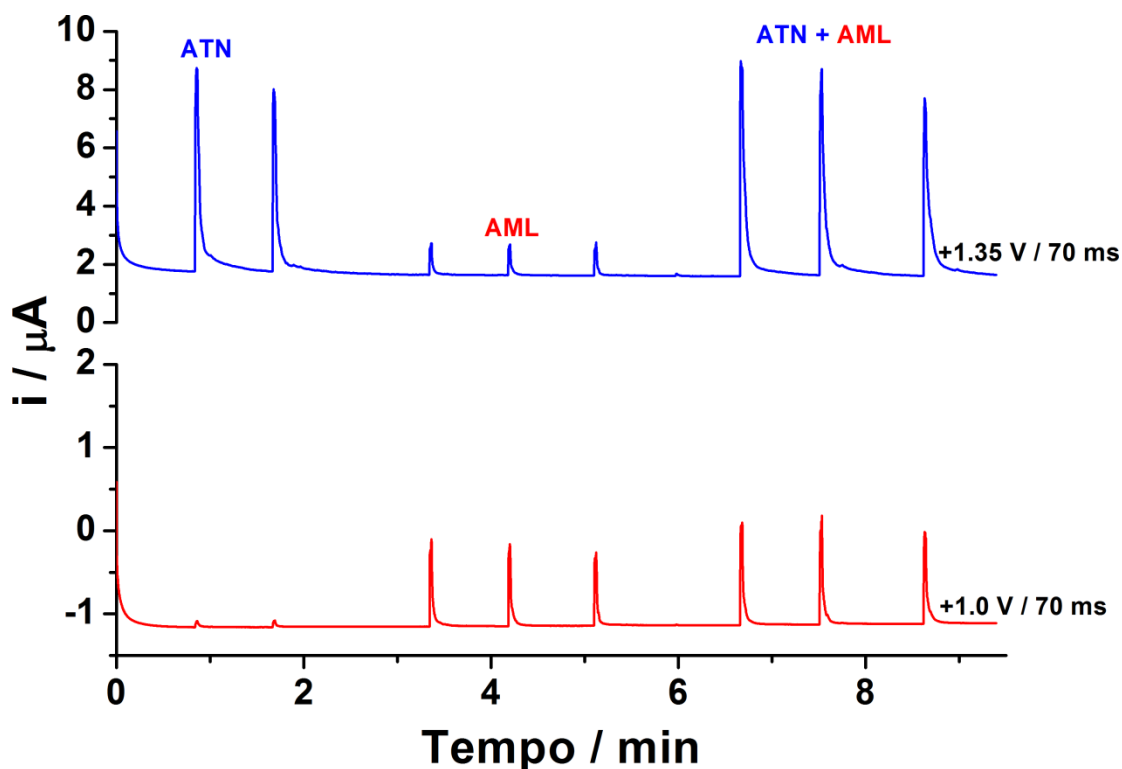


Figura 21. Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN, 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e mistura dos dois compostos (ATN + AML) nas mesmas concentrações anteriores. Demais condições experimentais iguais a Figura 20.

Analisando a Figura 21, é perceptível a oxidação de AML em +1,0 V, sendo que nesse potencial a corrente detectada nas injeções de ATN é muito pequena e pode ser desconsiderada. Dessa forma, em um primeiro momento, selecionou-se a combinação de pulsos de +1,0 V (apenas AML oxida) e de +1,35 V (AML e ATN oxidam), por possuírem uma boa separação ($\Delta E > 0,3 \text{ V}$).

Os resultados demonstram também que os picos anódicos da AML não apresentam a mesma magnitude em ambos os pulsos de potenciais, o que impede o uso de uma subtração simples entre as correntes detectadas nos dois pulsos de potenciais ($i_{+1,35\text{ V}}$ e $i_{+1,0\text{ V}}$) para ter acesso à corrente relacionada somente com a oxidação do ATN. No entanto, este problema pode ser contornado através do uso de um fator de correção (FC), obtido pela razão entre a corrente de oxidação da AML obtida em +1,35 V pela corrente de AML em +1,0 V mediante a injeção de solução contendo apenas AML [42, 46, 47]. Assim, quando uma solução contendo ambos os compostos (ATN + AML) é injetada no sistema BIA, a corrente de oxidação proveniente somente de ATN pode ser obtida pela subtração entre a corrente detectada em +1,35 V e a corrente detectada em +1,0 V multiplicada pelo FC. As equações (4) e (5) serão usadas nos cálculos para obtenção do FC e das correntes relacionadas com a oxidação de ATN, respectivamente.

$$FC = \frac{i_{AML+1,35\text{ V}}}{i_{AML+1,0\text{ V}}} \quad \text{Eq. (4)}$$

$$i_{ATN} = i_{+1,35\text{ V}} - (i_{+1,0\text{ V}} \times FC) \quad \text{Eq. (5)}$$

4.2.1. Otimização de parâmetros do sistema BIA-MPA

Nos estudos iniciais para a determinação simultânea de AML e ATN, os parâmetros do sistema BIA-MPA foram avaliados e otimizados com o objetivo de detectar a maior magnitude de corrente e melhor repetibilidade (estabilidade) do sinal analítico.

4.2.2.1. Definição dos pulsos de potenciais

Nos experimentos iniciais envolvendo a otimização de parâmetros do sistema BIA-MPA foi observado que as correntes de oxidação detectadas mediante injeções sucessivas de solução contendo ATN decaíam sistematicamente, o que pode indicar que o ATN ou seu respectivo produto de oxidação estejam

contaminando (por adsorção) a superfície do eletrodo de BDD. Com o intuito de evitar ou amenizar este fenômeno, a aplicação de um terceiro pulso de potencial para limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho foi inserido no esquema de aplicação dos pulsos de potenciais.

Estudos para definição do pulso de potencial de limpeza foram efetuadas através de injeções sucessivas ($n = 3$) de soluções contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN e $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN, respectivamente. Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos em função da aplicação de diferentes pulsos de potenciais de limpeza. Os demais parâmetros foram os seguintes: tempo de aplicação de cada pulso de detecção (+1,0 e +1,35 V): 70 ms; eletrólito suporte: tampão BR pH 2,0; velocidade de agitação 1225 rpm; volume de injeção 100 μL ; vazão de injeção $113 \mu\text{L s}^{-1}$.

Tabela 3. Comparação dos RSD obtidos em função de aplicação de diferentes pulsos de potenciais de limpeza:

Pulso de +1,0 V				
Potencial de limpeza	Tempo	RSD _{AML}	RSD _{ATN}	RSD _{AML + ATN}
+ 0,0 V	300 ms	3,2%	0,3%	3,7%
+ 1,8 V	300 ms	6,1%	16,9%	3,6%
+ 2,0 V	300 ms	20,7%	22,0%	7,5%
Pulso de +1,35 V				
Potencial de limpeza	Tempo	RSD _{AML}	RSD _{ATN}	RSD _{AML + ATN}
+ 0,0 V	300 ms	1,8	0,7	2,7
+ 1,8 V	300 ms	6,3	8,5	3,6
+ 2,0 V	300 ms	18,5	5,0	5,3

Com base nos valores de desvios padrões relativos calculados mediante aplicação dos pulsos de potenciais selecionados, podemos observar que a aplicação de 0,0 V, durante 300 ms, gera a melhor repetibilidade nas correntes anódicas detectadas nos dois pulsos de potenciais (+1,0 V e +1,35 V).

Após a seleção dos pulsos de potenciais de detecção (+1,0 V e +1,35 V), o tempo de aplicação de cada pulso de potencial também foi estudado, sendo que esse tempo define o número de vezes que a corrente é adquirida pelo programa que controla o potenciostato durante o período que um pico transiente é gerado numa injeção de amostra ou solução padrão.

Ao aplicar um pulso de potencial na presença de material eletroativo, os processos faradaico (I_F) e capacitivo (I_C) ocorrerão simultaneamente. A I_C é alta no início da aplicação do pulso de potencial e decresce rapidamente em função do tempo e a I_F também tende a diminuir em função do aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial [62]. Assim, é evidente a influência da variação do tempo sobre os valores de resposta de corrente.

Nesse sentido, foi necessário realizar esse estudo das respostas de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais. Para tanto, este estudo foi realizado através de injeções sucessivas ($n = 3$) de soluções contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN e $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN e o cálculo do RSD destas medidas sucessivas. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4. Comparação dos RSD obtidos em função de variações no tempo de aplicação dos pulsos de potenciais de detecção:

Pulso de +1,0 V				Pulso de +1,35 V		
Tempo	RSD _{AML}	RSD _{ATN}	RSD _{AML + ATN}	RSD _{AML}	RSD _{ATN}	RSD _{AML + ATN}
50 ms	2,2%	-	0,9%	2,2%	12,7%	8,2%
70 ms	4,9%	-	1,9%	1,0%	4,6%	4,1%
100 ms	5,0%	-	5,6%	3,8%	5,1%	6,8%
150 ms	5,6%	-	7,5%	3,5%	5,4%	5,9%
200 ms	6,0%	-	11,6%	6,4%	7,4%	13,6%

Com base nos valores dos RSD calculados mediante variação do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais de detecção, podemos observar que para os pulsos de +1,0 V e +1,35 V, os tempos que geraram a melhor repetibilidade foram 50 e 70 ms, respectivamente.

Em função dos resultados obtidos, os pulsos de potenciais foram selecionados e aplicados na seguinte ordem:

1º) + 1,0 V por 50 ms para oxidação de AML sem a interferência de ATN;

2º) + 1,35 V por 70 ms para oxidação de ambos analitos (AML e ATN);

3º) 0,0V por 300 ms para limpeza eletroquímica do eletrodo.

4.2.2.2. Agitação

O efeito da agitação da solução do interior da célula BIA foi avaliada através da injeção de soluções contendo ambos os compostos (AML + ATN). Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 22.

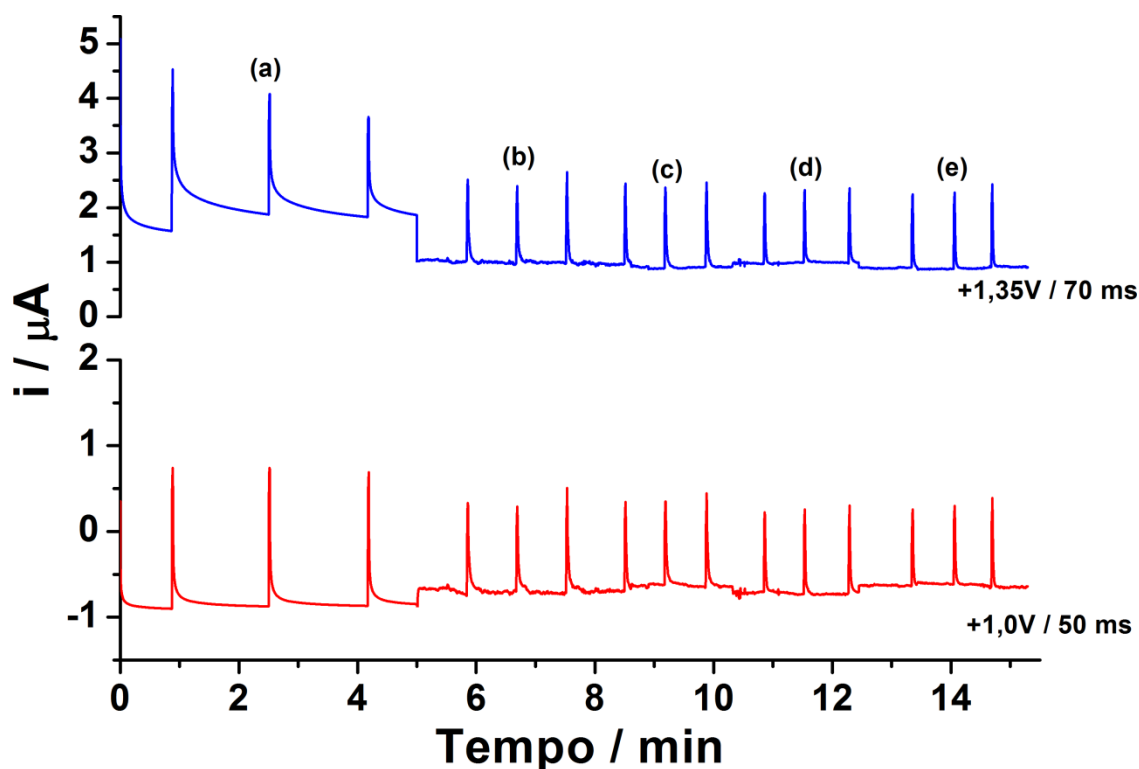


Figura 22. Influência da agitação via micro motor DC na resposta de corrente obtida por BIA-MPA: sem agitação (a), 1200 rpm (b), 1800 rpm (c), 2600 rpm (d) e 4000 rpm (e). Solução injetada $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. Pulso de potencial de limpeza: $0,0 \text{ V} / 300 \text{ ms}$. Demais condições experimentais iguais a Figura 20.

Como pode ser observado, quando a solução do interior da célula não é submetida à agitação, os picos gerados no sistema BIA decrescem ou retornam a linha base de maneira mais lenta, ocasionando dificuldades de estabilização da linha base e, conseqüentemente, menor frequência analítica ($43 \text{ injeções h}^{-1}$).

A agitação no sistema acelera a remoção do material eletroativo da interface eletrodo/solução e a corrente gerada (pico transiente) retorna para a linha base mais rapidamente, o que aumenta a frequência analítica do sistema. Também é importante quando um pulso de potencial para constante limpeza eletroquímica é empregado, pois contribui significativamente para a remoção do contaminante da superfície do eletrodo [106].

Logo, quando a solução no interior da célula se encontrava sob agitação, o retorno do sinal gerado para a linha base era rápido com ganho considerável em frequência analítica (de 43 para 80 injeções h^{-1}). Observou-se ainda que para uma velocidade de agitação de 1800 rpm eram obtidos sinais analíticos mais estáveis e consequentemente mais reprodutíveis (RSD = 4,6% para +1,0 V e 2,3% para +1,35V).

4.2.2.3. Volume de injeção

O efeito do volume injetado de solução padrão ou amostra na corrente detectada no sistema BIA proposto também foi estudado. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 23. Além dos amperogramas registrados nos dois pulsos de potenciais (+1,0 e +1,35 V), o número de pontos de aquisição de corrente no ápice de picos transientes também são apresentados.

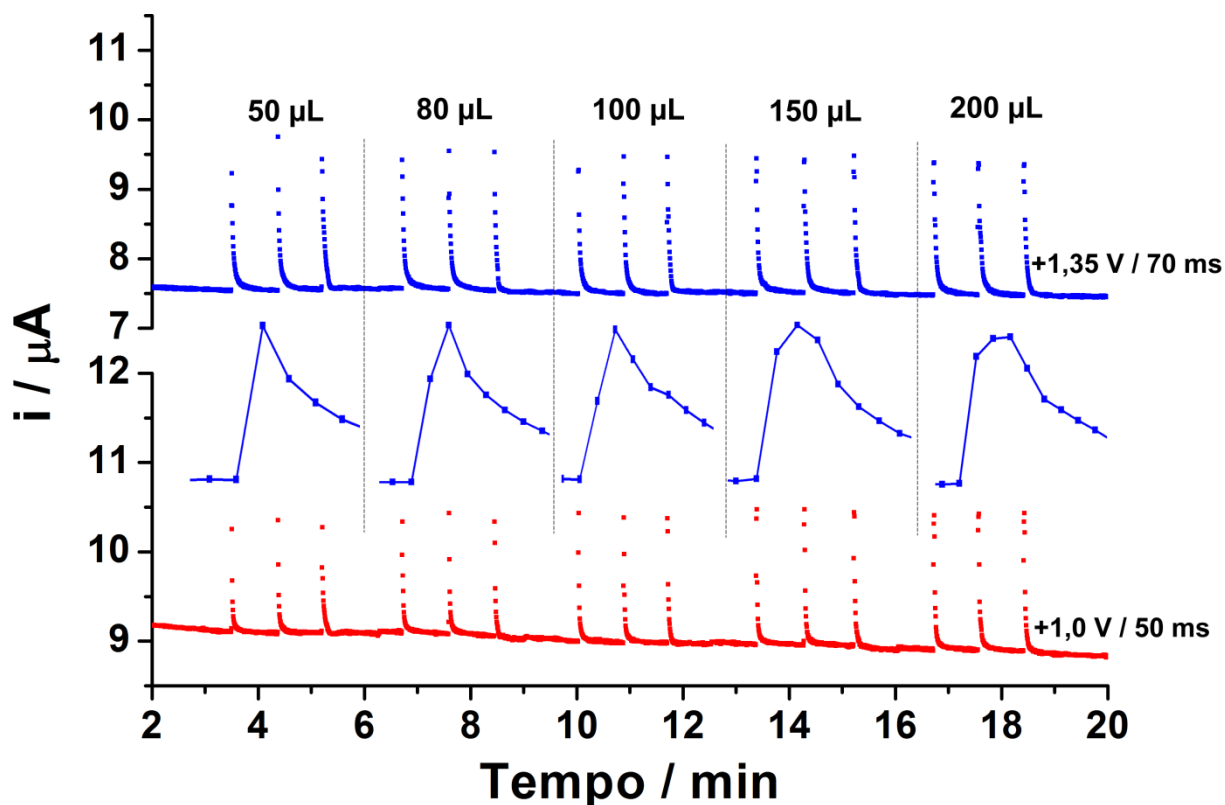


Figura 23. Influência do volume injetado na resposta obtida com o sistema BIA-MPA (magnitude e número de pontos de aquisição de corrente no ápice dos picos). Volumes de injeção estudados: de 50 a 200 μL . Solução injetada: 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. Eletrodo de BDD ativado catodicamente. Pulso de potencial de limpeza: 0,0 V / 300 ms. Agitação 1800rpm. Demais condições experimentais iguais a Figura 20.

A partir da Figura 23, foi possível calcular o RSD para as injeções em triplicata ($n = 3$) de soluções contendo a mistura de 7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5. Comparação dos RSD obtidos em função de variações no volume de injeção:

	Pulso de +1,0 V	Pulso de +1,35 V
Volume (μL)	RSD _{AML + ATN}	RSD _{AML + ATN}
50	5,3%	13,6%
80	4,6%	4,5%
100	1,8%	5,8%
150	0,3%	1,7%
200	1,9%	0,5%

Pode-se perceber na Figura 23 que a magnitude dos sinais amperométricos somente varia um pouco para os menores volumes de injeção estudados (50 e 80 μL). A partir do volume de 100 μL , a corrente detectada passa a ser máxima e constante (sem diluição da alíquota injetada). Estes resultados demonstram que o filme de solução (eletrólito inerte) existente entre a ponteira da pipeta e a superfície do eletrodo de trabalho ($\sim 2\text{ mm}$) somente causa a diluição da alíquota injetada se o volume for inferior a 80 μL . É importante salientar que estes resultados foram obtidos com a vazão de injeção de $113\text{ }\mu\text{L s}^{-1}$. Se a vazão de injeção ou a distância entre a ponteira e a superfície do eletrodo forem diferentes, os resultados podem variar.

Os pontos de aquisição de corrente no ápice de cada pico demonstram que com o aumento no volume injetado, esse número de pontos vai aumentando na região (patamar) de corrente máxima, o que pode aumentar a definição ou resolução do pico transiente detectado e, conseqüentemente, aumentar a repetibilidade do sistema. Nesse sentido, os valores de RSD calculados e apresentados na Tabela 5, demonstram que há melhor repetibilidade para os maiores valores de volume de injeção estudados, ou seja, 150 e 200 μL .

Assim, avaliando-se a intensidade e a repetibilidade da corrente de oxidação detectada, o volume de injeção de 150 μL foi utilizado nos demais estudos.

4.2.2.4. Vazão de injeção

Estudos sobre a influência da vazão de injeção na resposta do sistema BIA-MPA também foram realizados variando a vazão entre $43 \mu\text{L s}^{-1}$ a $345 \mu\text{L s}^{-1}$. Os resultados obtidos (magnitude de corrente e número de pontos de aquisição de corrente) são apresentados na Figura 24.

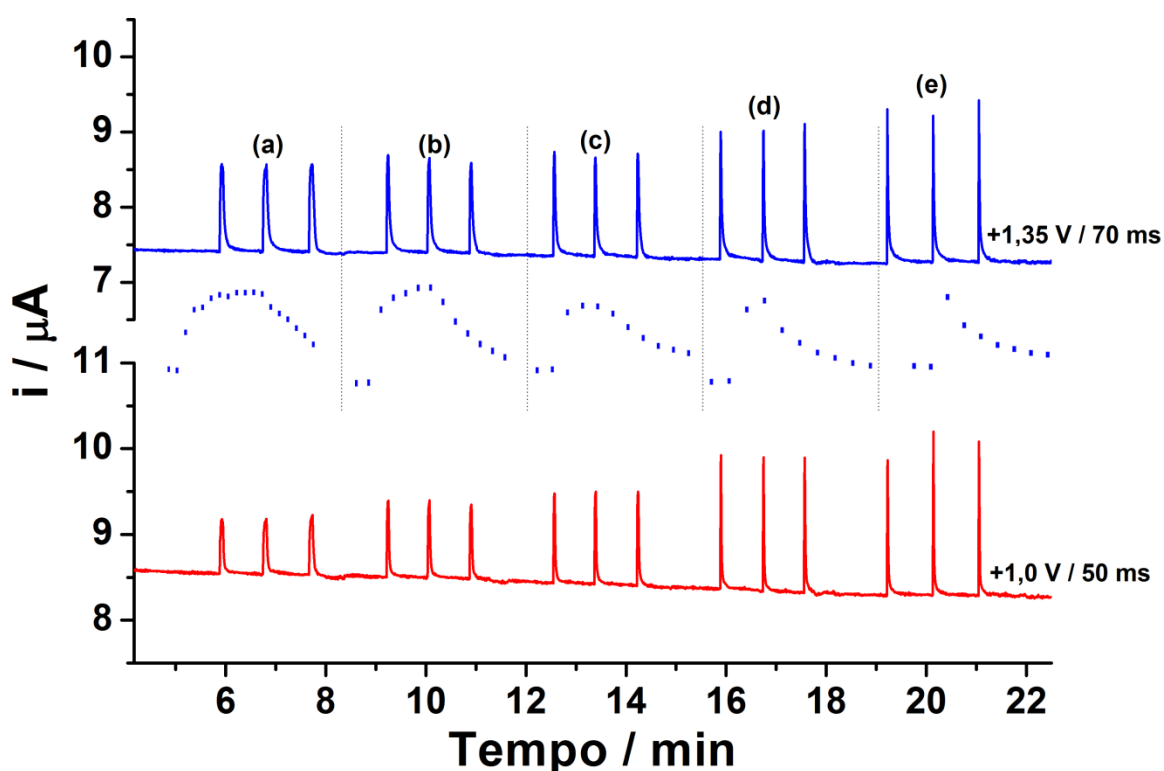


Figura 24. Influência da vazão de injeção na resposta de corrente obtida por BIA-MPA: (a) $43 \mu\text{L s}^{-1}$; (b) $75 \mu\text{L s}^{-1}$; (c) $113 \mu\text{L s}^{-1}$; (d) $193 \mu\text{L s}^{-1}$; (e) $345 \mu\text{L s}^{-1}$. Solução injetada $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. Volume de injeção $150 \mu\text{L}$. Demais condições experimentais iguais a Figura 20.

A partir da Figura 24, foi possível calcular o RSD para as injeções em triplicata ($n = 3$) de soluções contendo a mistura de $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6. Comparação dos RSD obtidos em função de variações na vazão de injeção:

	Pulso de +1,0 V	Pulso de +1,35 V
Vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$)	RSD _{AML + ATN}	RSD _{AML + ATN}
43	3,1%	0,8%
75	1,9%	3,7%
113	2,6%	3,0%
193	0,7%	4,4%
345	9,1%	5,3%

De acordo com os resultados apresentados na Figura 24 é possível perceber que há um aumento nas correntes de oxidação detectadas com o aumento na vazão de injeção estudada. Isto ocorre devido ao aumento na taxa de transporte de massa para a superfície do eletrodo de trabalho.

No entanto, além da magnitude das correntes de oxidação, a repetibilidade na aquisição do sinal de corrente deve ser considerada. Nesse, sentido, os pontos de aquisição de corrente no ápice de cada pico demonstram que, com o aumento da vazão de injeção, esse número de pontos vai decrescendo na região (patamar) de corrente máxima, o que pode diminuir a definição ou resolução do pico transiente detectado e, conseqüentemente, reduzir a repetibilidade do sistema. De fato, os valores de RSD calculados e apresentados na Tabela 6, demonstram que, ao utilizar vazões de injeção superiores a $193 \mu\text{L s}^{-1}$, há uma perda significativa da repetibilidade do sinal de corrente.

Assim, avaliando-se a intensidade e repetibilidade do sinal amperométrico detectado, observou-se que a melhor resposta foi obtida para a vazão de injeção de $113 \mu\text{L s}^{-1}$.

A Tabela 7 reúne os parâmetros relacionados com a técnica de BIA-MPA avaliados e otimizados neste estudo.

Tabela 7. Parâmetros do sistema BIA-MPA estudados e respectivos valores otimizados:

Parâmetros	Faixa Estudada	Valor otimizado
Potencial de limpeza (V)	0,0; 1,8 e 2,0	0,0
Agitação (rpm)	0 – 4000	1800
TAP de +1,0V (ms)	50 – 200	50
TAP de +1,35V (ms)	50 – 200	70
Volume de Injeção (μL)	50 – 200	150
Vazão de Injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	43 – 345	113

TAP: tempo de aplicação do pulso

4.2.2. Repetibilidade/estabilidade do sistema

Um método analítico adequado requer que o sinal obtido (resposta analítica) tenha elevada estabilidade. Para tanto, avaliou-se a repetibilidade do sistema BIA-MPA através de injeções sucessivas de três soluções de composições distintas: (i) ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 8$); (ii) AML $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 8$); (iii) ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ + AML $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 16$). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 14.

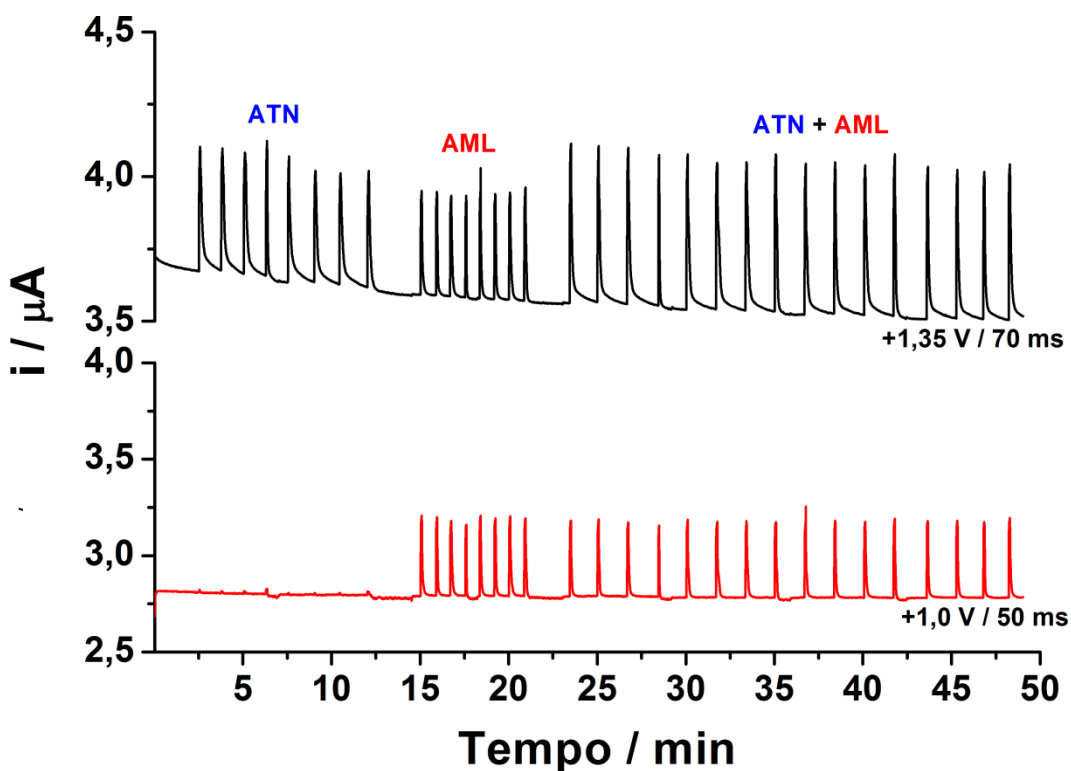


Figura 25. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo: (i) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN; (ii) $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; (iii) $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. Pulso de potencial de limpeza eletroquímica: $0,0 \text{ V} / 300 \text{ ms}$. Eletrólito: tampão BR pH 2,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Agitação 1800rpm. Volume de injeção $150 \mu\text{L}$. Vazão de injeção de $113 \mu\text{L s}^{-1}$.

As correntes de oxidação médias ($n = 8$ para as soluções individuais e $n=16$ para a mistura) e os desvios padrões relativos obtidos no estudo de repetibilidade são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Estudo para repetibilidade do método.

Solução	$i_{\text{média}} / \mu\text{A}$	RSD
+1,0 V / 50 ms		
ATN	-	-
AML	0,399	4,1%
ATN + AML	0,400	5,3%
+1,35 V / 70 ms		
ATN	0,430	6,9%
AML	0,378	8,6%
ATN + AML	0,537	3,1%

Como é possível observar, a corrente de oxidação em ambos os pulsos de potenciais (+1,00 e +1,35 V) se mantiveram relativamente constantes (RSD < 8,6 %), demonstrando uma razoável repetibilidade do método proposto.

4.2.3. Estudos para identificação das faixas lineares de resposta

Após as etapas de otimização dos parâmetros do sistema BIA-MPA, estudos foram realizados para identificar as faixas de concentração de AML e ATN onde a relação entre concentração e corrente de oxidação detectada é linear ($R \geq 0,99$). Os resultados obtidos estão plotados na Figura 26.

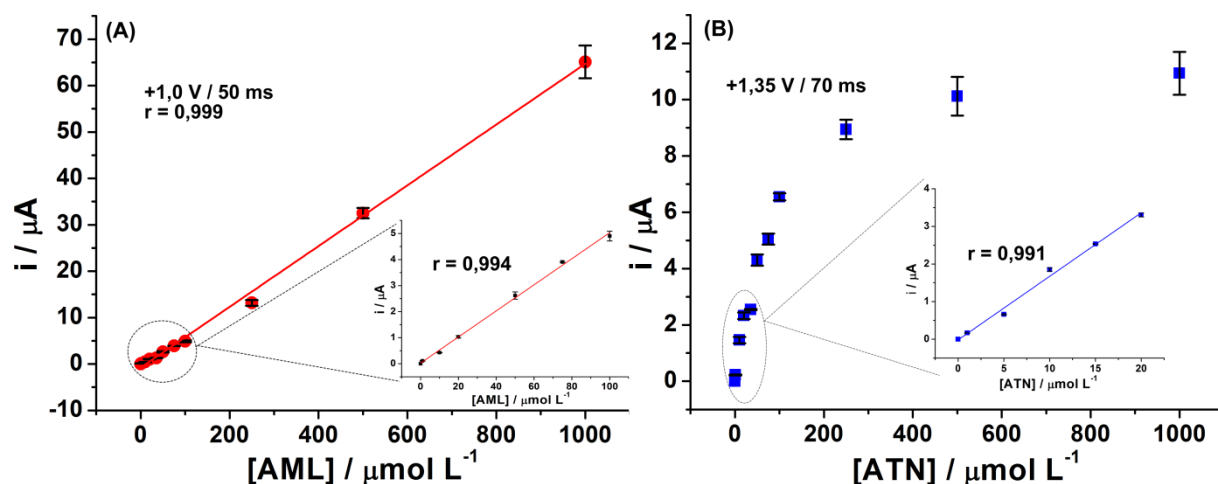


Figura 26. Curvas de calibração para injeção de soluções de: **(A)** 2 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e **(B)** de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. Demais condições experimentais conforme Figura 25.

Analisando a figura 26B é possível observar uma acentuada contaminação do eletrodo, na medida em que a concentração de ATN é aumentada. Provavelmente, isso se deve à adsorção irreversível do ATN ou dos produtos de oxidação deste na superfície do eletrodo (mesmo usando o pulso de potencial de limpeza), ocasionando problemas de bloqueio de resposta e dificuldades da renovação da superfície do eletrodo de BDD.

Nesse estudo, ficou definido a existência de faixa linear de resposta entre 2 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e entre 2 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para ATN.

4.2.4. Amostras comerciais

Na determinação simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas comerciais, além de considerar a faixa linear de resposta de cada analito, as proporções dos constituintes (analitos) encontradas nas formulações também necessitam ser consideradas. A Tabela 1 traz informações sobre as composições de amostras comerciais contendo os dois princípios ativos.

Apesar dos dois compostos apresentarem potenciais de oxidação separados ($\Delta E > 0,3 \text{ V}$), a determinação simultânea não foi possível devido a diferença de concentração existente entre os compostos em amostras reais (1:7,6 e 1:15,3 de AML:ATN, respectivamente). Neste caso, na curva de calibração, o uso de concentrações muito maiores de ATN era necessário, em contrapartida a faixa linear para o ATN entre 2 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ impedia essa possibilidade.

4.2.5. Definição de uma nova combinação de pulsos de potenciais

Na tentativa de obter uma faixa linear mais ampla para o ATN, foi variado o segundo potencial de +1,35V para +1,65V, acreditando-se que em um potencial mais positivo, o ATN teria uma oxidação mais efetiva e com possibilidade de minimizar problemas de adsorção. Inicialmente, avaliou-se a repetibilidade do sinal obtido nesse pulso de potencial (+1,65 V).

A repetibilidade do sistema BIA-MPA no pulso de potencial de +1,65 V foi avaliada através de injeções sucessivas de soluções de ATN 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 9$). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 27 e os respectivos RSD calculados são apresentados na Tabela 9.

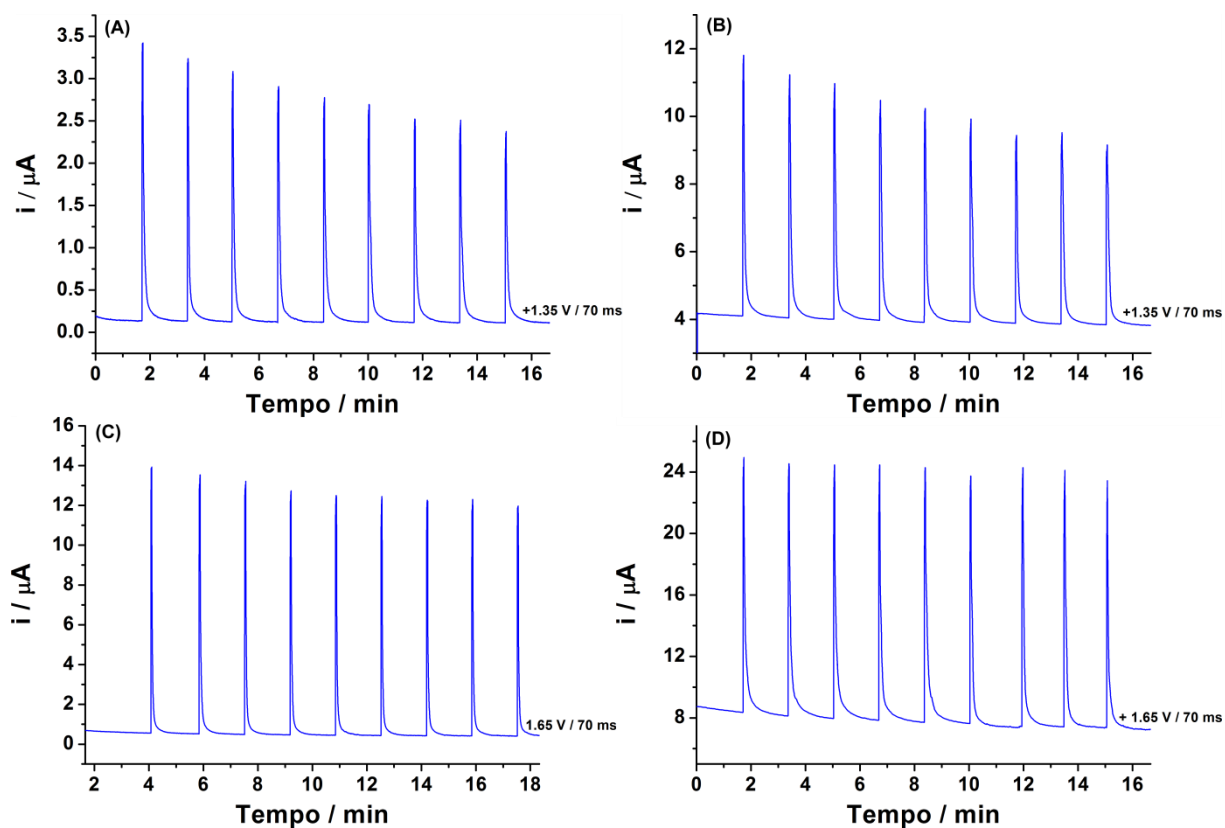


Figura 27. Amperogramas a potencial constante (A e C) e de amperometria pulsada (B e D) para ATN a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=9$): (A) pulso de +1,35 V / 70 ms sem potencial de limpeza; (B) pulso de +1,35 V / 70 ms com potencial de limpeza de 0,0 V / 300ms; (C) pulso de +1,65 V / 70 ms sem potencial de limpeza; (D) pulso de +1,65V / 70ms com potencial de limpeza de 0,0V / 300 ms. Demais condições experimentais conforme Figura 25.

Tabela 9. Resultados obtidos nos estudos de repetibilidade ($n=9$) para ATN $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=9$) em +1,35 e +1,65 V (com e sem uso de pulso de potencial de limpeza):

Pulso/Tempo	Potencial de Limpeza/Tempo	$I_{\text{média}} (\mu\text{A})$	RSD %
+1,35 V / 70ms	-	2,72	4,3
+1,35 V / 70ms	0,0V/300ms	6,36	4,2
+1,65 V / 70ms	-	12,31	1,7
+1,65 V / 70ms	0,0V/300ms	16,54	0,4

Os resultados obtidos demonstraram que com a aplicação do pulso de +1,65V associado a um pulso de potencial de limpeza de 0,0V há uma melhora significativa na detectabilidade e repetibilidade do método proposto.

Com base nesse estudo, os seguintes pulsos de potenciais foram aplicados nos estudos subsequentes:

1º) + 1,0 V por 50 ms para oxidação de AML sem a interferência de ATN;

2º) + 1,65 V por 70 ms para oxidação de ambos analitos (AML e ATN);

3º) 0,0V / 300 ms: limpeza eletroquímica do eletrodo.

Com essa outra combinação de pulsos de potenciais, os seguintes estudos foram repetidos: (i) a seletividade (Figura 28); (ii) a faixa de concentração de ATN com relação linear com a corrente de oxidação (Figura 29) e (iii) a repetibilidade (Figura 30).

4.2.6. Seletividade

Como já discutido, em determinações simultâneas por BIA-MPA, a determinação seletiva dos compostos é possível mediante a aplicação de pelo menos dois pulsos de potenciais em função do tempo, no qual uma das espécies é detectada em um pulso de potencial e a outra em um segundo pulso de potencial (juntamente com a outra espécie). Na Figura 28 são apresentados os amperogramas obtidos nos pulsos de potenciais de +1,0 V e +1,65 V após injeções ($n = 3$) no sistema BIA-MPA de alíquotas de 150 μL de soluções contendo somente AML, somente ATN e uma mistura dos dois compostos.

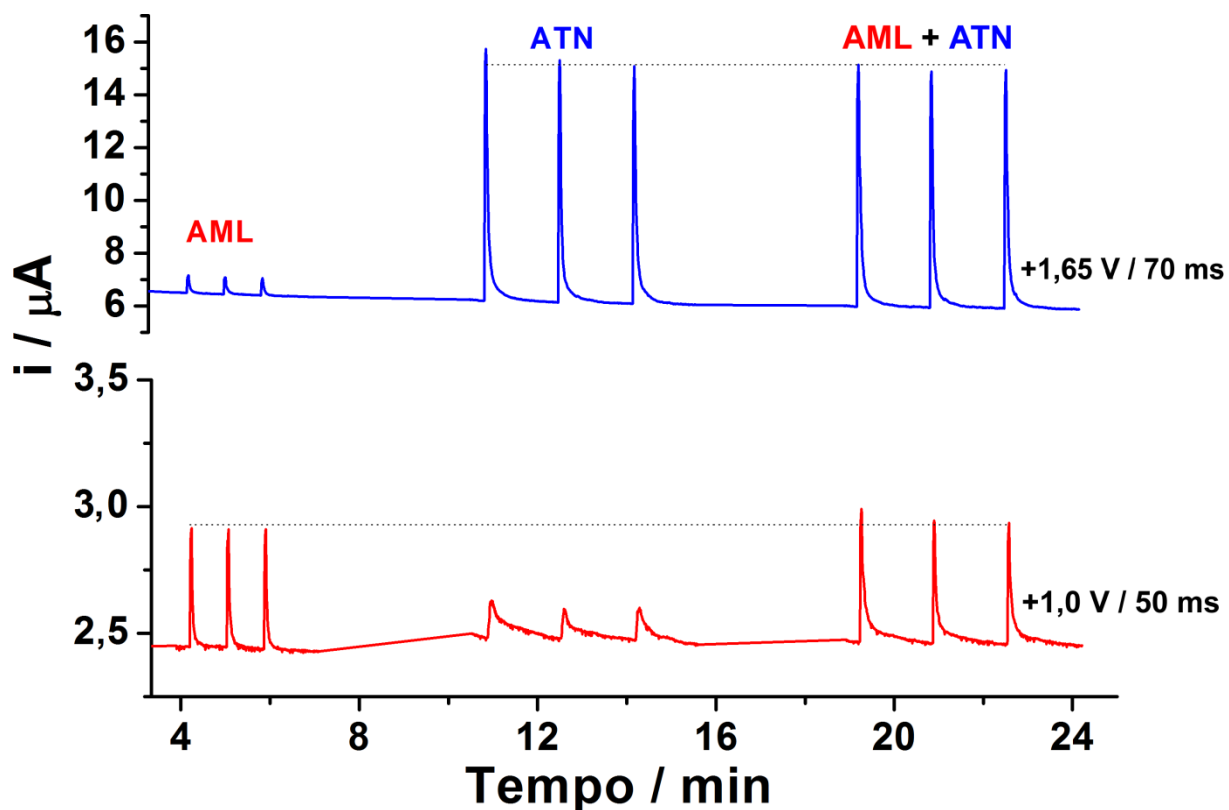


Figura 28. Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e uma mistura dos dois compostos (ATN + AML) nas mesmas concentrações anteriores. Demais condições experimentais iguais a Figura 25.

Analisando a Figura 28 é possível observar que a AML é oxidada no pulso de $+1,0 \text{ V}$ e que nesse potencial a corrente detectada nas injeções de ATN é pequena e pode ser desconsiderada. A semelhança na corrente detectada na injeção das duas soluções (AML e AML + ATN) também indica que não há interação química entre os compostos ou com os respectivos produtos de oxidação.

Em $+1,65 \text{ V}$, tanto AML como ATN são oxidados, sendo observado que a corrente detectada nas injeções de AML é muito pequena frente aos valores observados para as injeções de ATN, podendo ser desconsiderada. De forma análoga ao potencial de $+1,0 \text{ V}$, a corrente detectada para a solução de ATN é semelhante a corrente detectada na injeção da mistura das soluções (AML + ATN).

Desta forma, os resultados demonstrados na Figura 28 evidenciam que a corrente gerada pela oxidação da mistura de soluções de AML e ATN pode ser considerada como sendo devida à oxidação de AML para o potencial de +1,0 V e à oxidação de ATN para o potencial de +1,65 V. Nesse caso, não há necessidade de uma subtração de correntes com o uso do fator de correção (FC), sendo possível detectar direta e seletivamente as correntes de oxidação de AML e ATN quando presentes na mesma solução.

4.2.7. Identificação da faixa linear de resposta

Como o intuito era o de obter uma faixa linear mais ampla para o ATN, estudos foram realizados para identificar as faixas de concentração de ATN onde a relação entre concentração e corrente de oxidação detectada é linear ($R \geq 0,99$). Os resultados obtidos estão plotados na Figura 29.

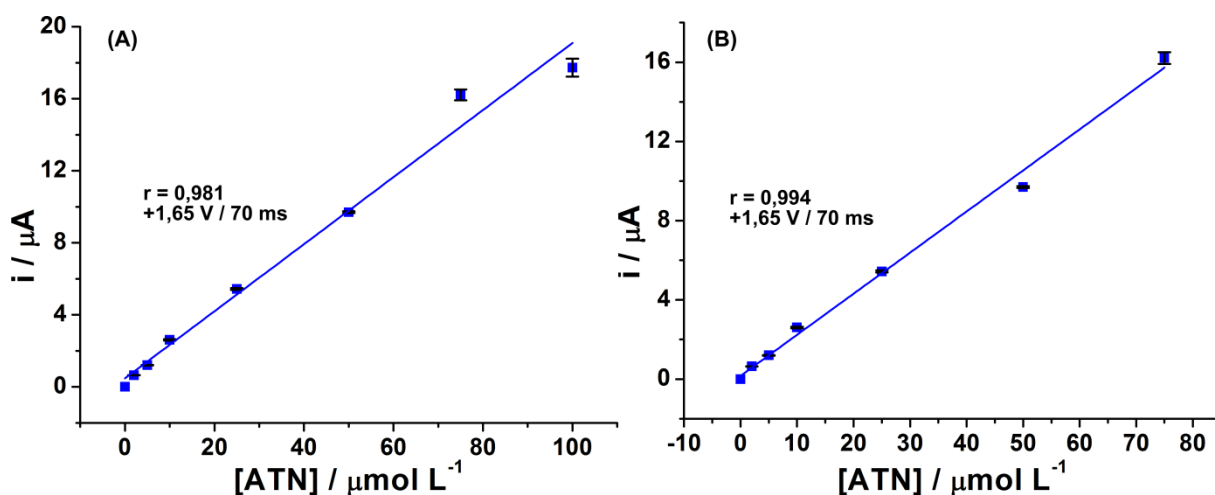


Figura 29. Estudo da faixa linear para ATN: (A) faixa de concentração de 2 a 100 $\mu mol L^{-1}$ de ATN e (B) faixa de concentração de 2 a 75 $\mu mol L^{-1}$ de ATN. Condições experimentais conforme Figura 25.

Nesse estudo foi observado que a relação entre concentração e corrente detectada somente é linear na faixa de concentração entre 2 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN ($R \geq 0,99$) (Figura 29B). Ampliando a faixa de concentração (até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), uma piora na linearidade foi observada ($R = 0,981$, Figura 29A).

4.2.8. Estudo da repetibilidade

Uma vez definida a faixa de concentração, a estabilidade de resposta do eletrodo de BDD foi avaliada através de injeções sucessivas ($n=10$) de duas soluções contendo AML + ATN em concentrações distintas: 2 + 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e 10 + 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b), respectivamente. Os amperogramas obtidos neste estudo com a aplicação de três pulsos de potenciais (+1,0 V / 50 ms; +1,65 V / 70 ms e 0,0 V / 300 ms) são apresentados (exceto o de limpeza – 0,0 V) na Figura 30.

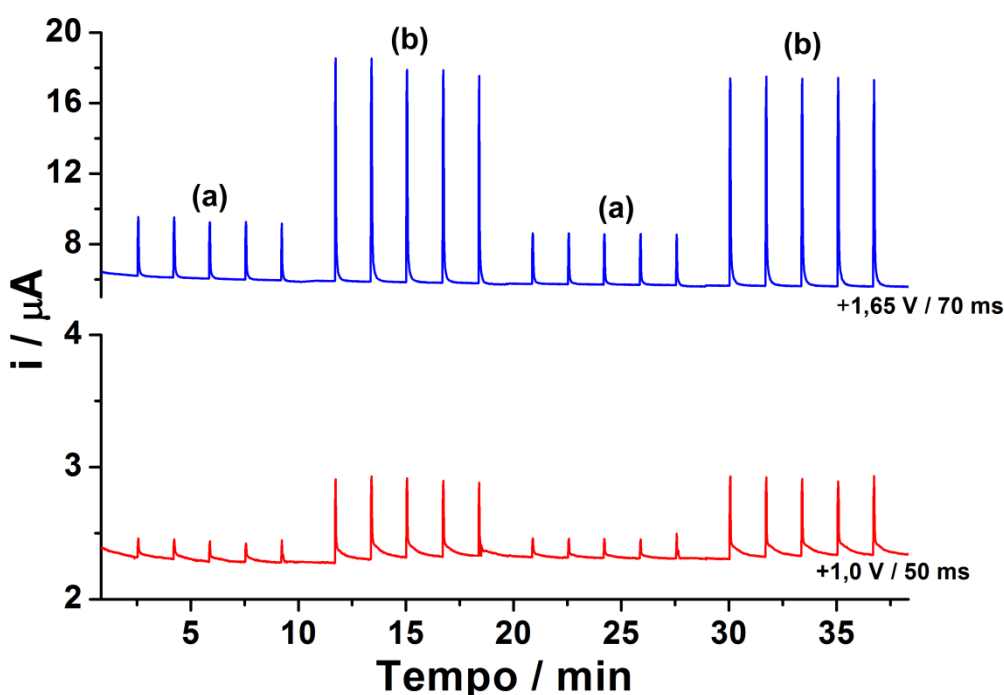


Figura 30. Amperogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo, respectivamente, AML + ATN 2 + 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e 10 + 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b) ($n = 10$). Condições experimentais conforme Figura 25.

As correntes de oxidação médias ($n = 10$) e os desvios padrões relativos obtidos no estudo de repetibilidade são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Estudo para repetibilidade do método.

Solução	$i_{\text{média}} / \mu\text{A}$	RSD
+1,0 V / 50 ms		
2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML + 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN	0,151	3,4%
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML + 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN	0,586	1,6%
+1,65 V / 70 ms		
2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML + 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN	3,082	2,3%
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML + 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN	12,013	0,9%

Como é possível observar, as correntes de oxidação em ambos os pulsos de potenciais (+1,00 e +1,65 V) se mantiveram relativamente constantes com baixos desvios padrões relativos, demonstrando uma boa repetibilidade do método.

4.3. Aplicação do sistema BIA-MPA na análise simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas

O método proposto foi avaliado na quantificação simultânea de AML e ATN na formulação farmacêutica comercial previamente identificada como S1 (proporção molar 1:7,6). A Figura 31 apresenta um dos amperogramas obtidos em +1,65 V para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (a - e) e decrescente (e - a) de concentrações de AML + ATN. Duas amostras da formulação farmacêutica S1 (proporção molar 1:7,6) diluídas no eletrólito suporte (1 e 2) também foram injetadas.

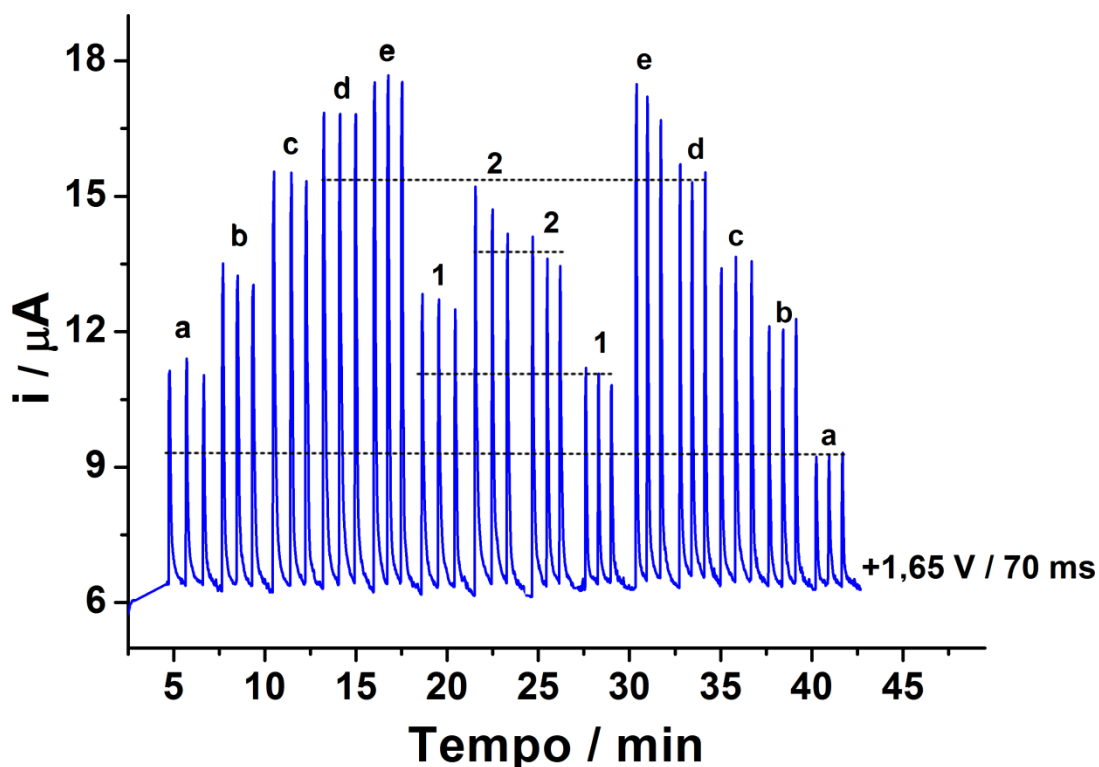


Figura 31. Amperograma referente ao pulso de +1,65V obtido para injeções de cinco soluções padrão (a-e) contendo simultaneamente AML ($3 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATN ($21 - 70 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras adequadamente diluídas (1 e 2). Demais condições experimentais conforme Figura 25.

Na Figura 31 pode ser observado que as soluções padrões injetadas em ordem crescente e decrescente de concentração apresentaram respostas distintas, o que pode ser devido ao fenômeno de adsorção do ATN ou do produto de oxidação na superfície do eletrodo de trabalho. A área ativa do eletrodo de BDD vai diminuindo e consequentemente a corrente de oxidação da espécie em análise também diminui.

Esse estudo demonstrou que mesmo obtendo-se uma relação linear na faixa de concentração entre 2 e $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o ATN, existe a possibilidade de que ao trabalhar em concentrações próximas ao extremo superior dessa faixa ($\sim 75 \mu\text{mol L}^{-1}$), o ATN ainda possa apresentar problemas adsortivos, produzindo resultados de definição duvidosa e não proporcionais à concentração do analito. Nesse caso, sugere-se que a faixa de aplicação do método analítico possa ser menor que a faixa linear de resposta proposta.

Mesmo com esta nova faixa de concentração, ela ainda não é ampla o suficiente para a determinação simultânea de AML e ATN em medicamentos disponíveis no mercado nacional.

As duas relações molares existentes entre AML:ATN em formulações comerciais são: 1:7,6 e 1:15,33, respectivamente. Assim, na construção de uma curva analítica para determinação simultânea de AML e ATN, mesmo que trabalhássemos com uma solução amostra contendo concentrações muito diluídas de AML, ainda estaríamos fora da faixa linear para o ATN.

Para exemplificar, simula-se uma análise (semelhante à realizada na Figura 31) de uma formulação farmacêutica comercial contendo a menor diferença em concentração entre AML e ATN (1:7,6). Para uma curva de cinco pontos teríamos o seguinte:

- ponto 1: $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML para $15,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN;
- ponto 2: $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML para $30,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN;
- ponto 3: $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML para $45,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN;
- ponto 4: $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML para $60,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN
- o próximo ponto, o ATN já estaria fora da faixa linear, ou muito próximo de estar.

Dessa forma, nas condições estudadas, a determinação simultânea se mostrou inviável.

Como alternativa, foram realizado testes utilizando uma calibração única em BIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos com injeção das soluções da amostra em diluições diferentes. Nesse caso, o método proposto foi obter dois amperogramas simultâneos, um em $+1,0 \text{ V}$ e um em $+1,65 \text{ V}$, para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações de AML + ATN e, a partir desse experimento obter as curvas de calibração para os pares de compostos. A Figura 33 apresenta os amperogramas obtidos para injeções em triplicata de soluções em ordem crescente (a - e) de concentração de AML + ATN. Uma solução contendo

somente (AML) foi injetada no início e ao término para verificarmos a estabilidade do sistema. Cada uma das duas amostras de formulações farmacêuticas foram previamente diluídas no eletrólito de duas formas distintas: (i) a amostra S_1 (Tabela 1) foi diluída e denominada como “1” e “2”; (ii) a amostra S_2 (Tabela 1) foi diluída e denominada “3” e “4” (Figura 32).

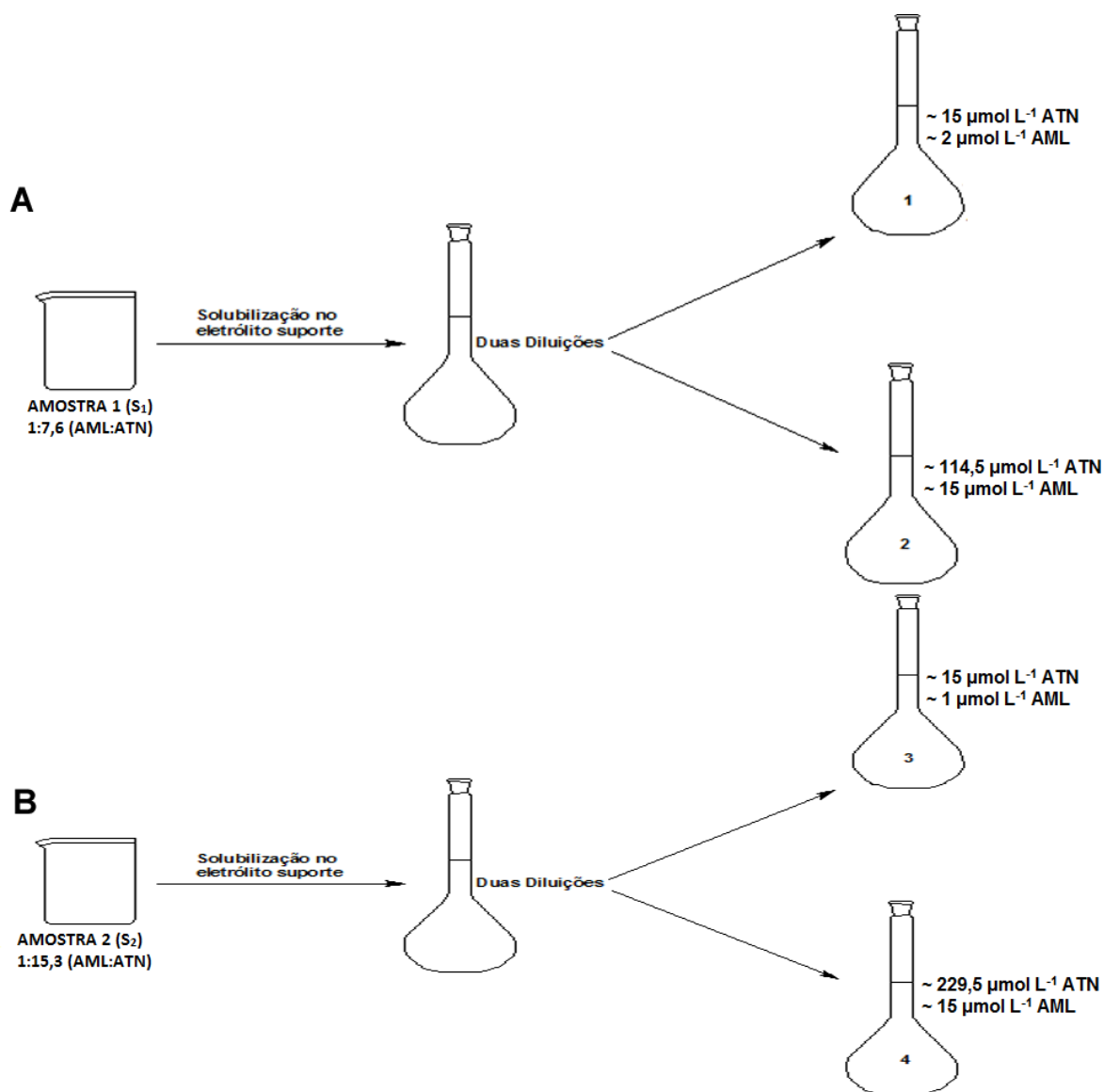


Figura 32. Diluição das amostras: (A) amostra S_1 e (B) amostra S_2 , as concentrações obtidas foram estimadas de acordo com as informações contidas no rótulo/bula.

As respectivas curvas de calibração também são apresentadas (Figura 33).

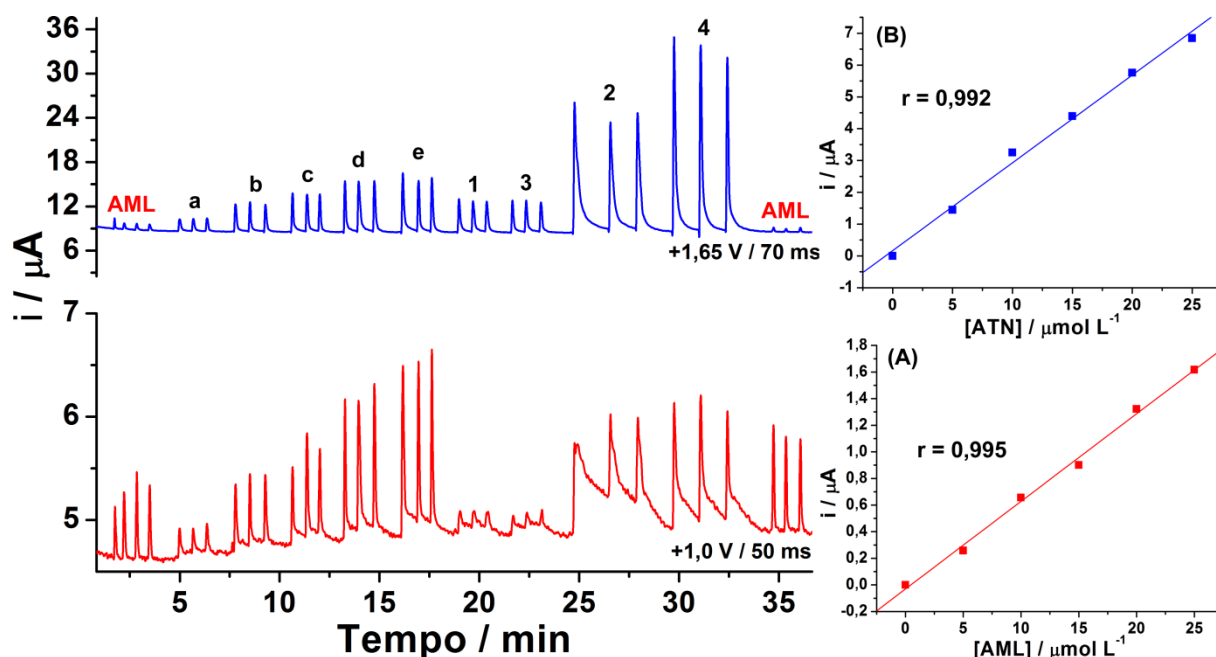


Figura 33. Amperogramas obtidos para injeções de uma solução contendo somente AML ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$), cinco soluções (a-e) contendo simultaneamente AML ($5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATN ($5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e duas amostras distintas adequadamente diluídas: (i) S_1 como “1” e “2”; (ii) S_2 como “3” e “4”. (A e B), respectivas curvas de calibração obtidas para AML ($r = 0,995$) e ATN ($r = 0,992$). Demais condições: idem Figura 25.

Os cálculos foram então realizados por meio das equações (6) e (7) obtidas pelas curvas de calibração e estão expostos na Tabela 11:

$$y = 0,0658 (\pm 0,0021)[\text{AML}] - 0,0306 (\pm 0,0320) \quad (r=0,995) \quad \text{Eq. (6)}$$

$$y = 0,2760 (\pm 0,0108)[\text{ATN}] + 0,1661 (\pm 0,1635) \quad (r=0,992) \quad \text{Eq. (7)}$$

Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta com os valores rotulados.

Amostra	Valor da Bula (mg / cápsula)		BIA-MPA (mg / cápsula)	
	AML	ATN	AML	ATN
S_1	6,944	25	6,3	24,8
S_2	6,944	50	8,5	50,3

Pode ser observado na Figura 33 que as injeções das amostras previamente diluídas para determinar AML (“2” e “4”, Figura 32), prejudicaram a repetibilidade e definição dos picos de corrente e, conseqüentemente, houve evidente discrepância com os valores rotulados. Também foi verificada diferença significativa de resposta para o padrão de AML adicionado no início e término do estudo. É provável que as altas concentrações de ATN presentes tenham contaminado o eletrodo de trabalho e interferido nesses fatores.

4.4. Determinação sequencial de AML e ATN

Os estudos realizados anteriormente demonstraram que a determinação simultânea de ATN e AML não é possível empregando o sistema BIA-MPA. Na amostra adequadamente diluída para determinação de AML, a concentração concomitantemente presente de ATN é elevada ocorrendo, assim, a contaminação da superfície do eletrodo de trabalho.

Assim, os estudos foram direcionados para o desenvolvimento de um método que permitisse a determinação sequencial dos dois compostos, mantendo-se a maioria dos parâmetros experimentais já otimizados. Nesta proposta, duas curvas de calibração foram geradas separadamente com o sistema BIA com detecção amperométrica: (1) Aplicação do potencial de +1,0 V e obtenção de curva de calibração para AML (5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sem a interferência de ATN (somente oxida em potenciais mais positivos); (2) Aplicação do potencial de +1,65 V e obtenção de curva de calibração para ATN (5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com provável interferência de AML que também oxida neste potencial. Como a concentração de AML já era conhecida, a possibilidade de subtração do sinal poderia ser estudada. Neste caso, a amostra teria que ser preparada em duas diluições diferentes.

4.4.1. Estudo de interferência de AML na determinação de ATN

Como foi proposta a determinação sequencial de AML e ATN em amostras contendo os dois compostos simultaneamente, um estudo foi realizado para verificar

a interferência de um analito na determinação do outro. A Figura 34 mostra o diagrama de diluição simulando as amostras S_1 e S_2 , em destaque, as situações em que as concentrações dos “interferentes” são máximas.

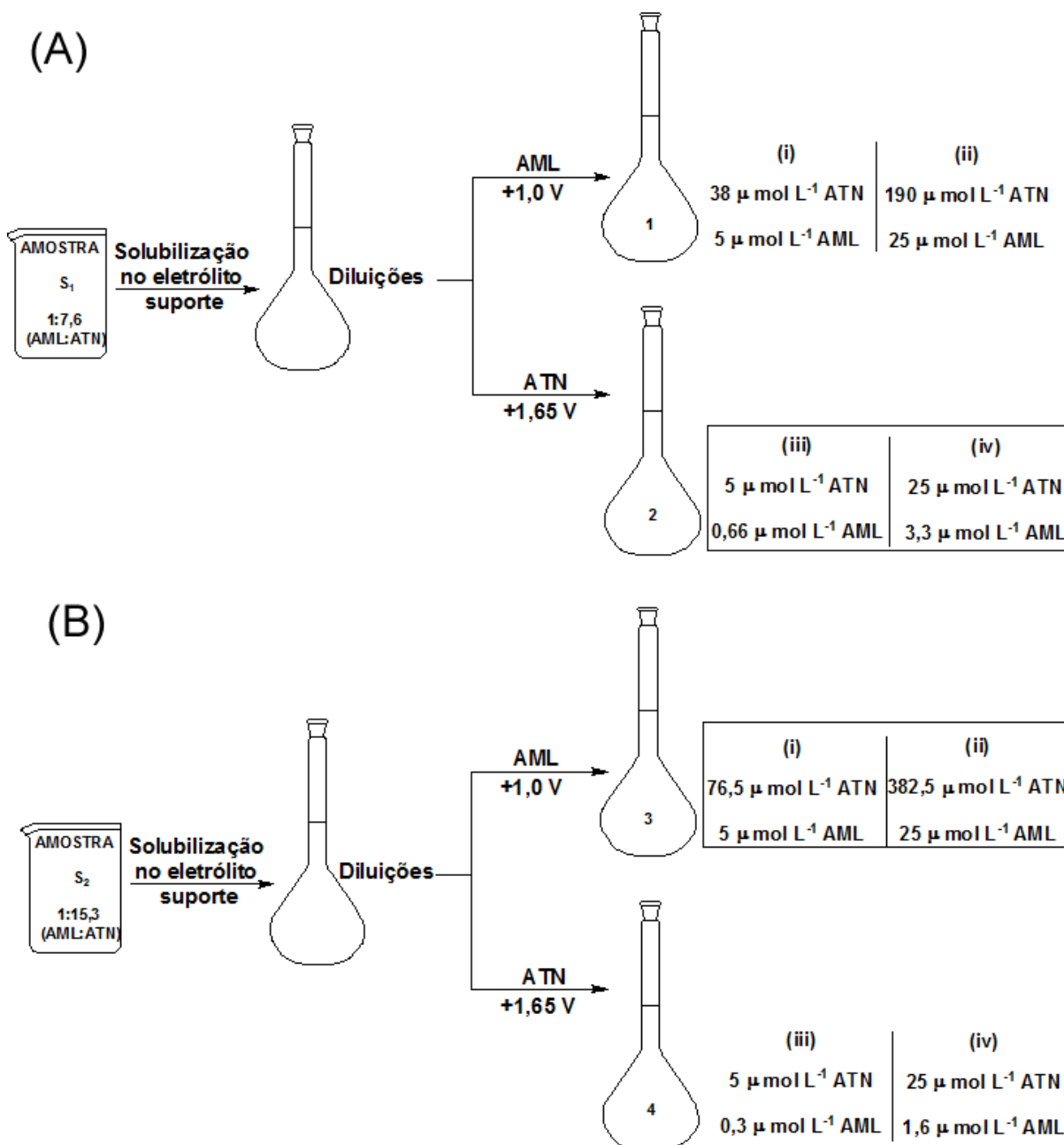


Figura 34. Diluição de amostras simuladas. **(A)** amostra S_1 : diluída para (i) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (ii) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e para (iii) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (iii) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. **(B)** amostra S_2 diluída analogamente a amostra S_1 .

Na Figura 35 são apresentados os resultados obtidos na análise de soluções padrões com composição similar de uma amostra comercial que contém ambos os compostos. Na Figura 35A (+1,0 V) são apresentados os resultados obtidos com soluções padrões simulando a composição de uma amostra para a determinação de AML em presença da máxima concentração de ATN (amostra S₂, Figura 34B). Na Figura 35B (+1,65 V), o mesmo estudo foi realizado simulando a determinação de ATN em presença da máxima concentração de AML (amostra S₁, Figura 34A).

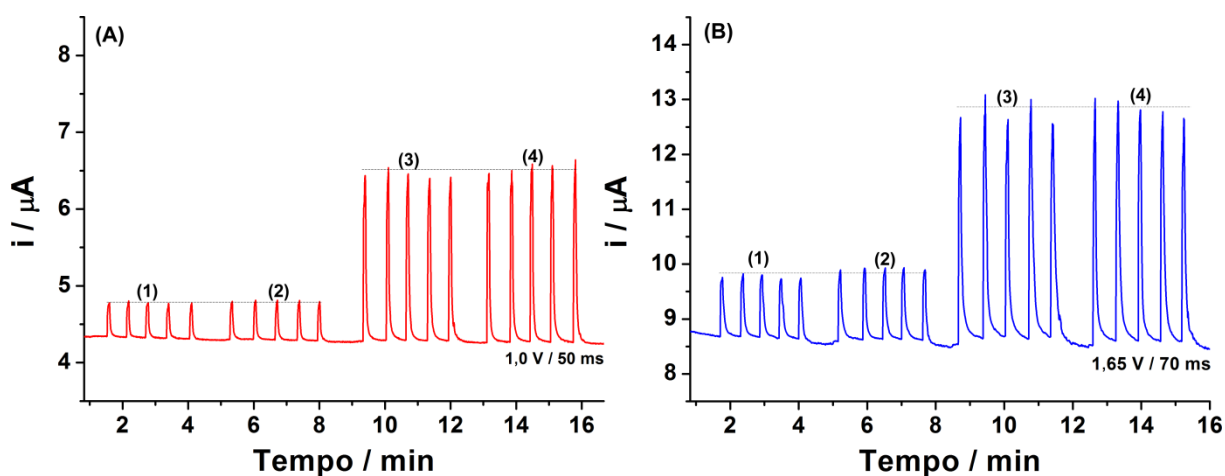


Figura 35. Estudo de interferência do ATN na determinação de AML (+1,0 V / 50 ms); **(B)** Estudo de interferência do AML na determinação de ATN (+1,65 V/70 ms). Soluções injetadas: **(A)** (1) 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; (2) 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + 77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN; (3) 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; (4) 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML + 383 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN. **(B)** (1) 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN; (2) 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN + 0,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; (3) 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN; 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ATN com 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML. Pulso de potencial de limpeza: 0 V / 300 ms. Condições experimentais conforme Figura 25.

Como pode ser observado na Figura 35A (amperograma registrado no potencial de +1,0 V.), as soluções contendo somente AML (Fig. 35A – 1 e 3) apresentaram corrente de oxidação muito similar às soluções contendo AML + ATN (Fig. 35A – 2 e 4). Analogamente, na Figura 35B (amperograma registrado no potencial de +1,65 V.) pode ser observado que as soluções contendo somente ATN (Fig. 35B – 1 e 3) apresentaram corrente de oxidação muito similar às soluções contendo ATN + AML (Fig. 35B – 2 e 4). Em ambos os estudos, a relação de

concentração entre AML e ATN é similar a relação existente entre estes compostos em amostras comerciais. Os valores de RSD ($n = 10$) calculados a partir dos resultados obtidos na Figura 35 são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados do estudo de interferência de AML para detecção de ATN (em +1,65 V) e de ATN para detecção de AML (em +1,0 V).

Solução	RSD ($n = 10$)
+1,0 V / 50 ms	
5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML sem ($n = 5$) e com 76,65 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN ($n = 5$)	2,0%
25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML sem ($n = 5$) e com 383 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN ($n = 5$)	1,2%
+1,65 V / 70 ms	
5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN sem ($n = 5$) e com 0,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML ($n = 5$)	3,2
25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ATN sem ($n = 5$) e com 3,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AML ($n = 5$)	0,9

Com base nos resultados exibidos na Figura 35 e Tabela 12, podemos concluir que, para as proporções de AML e ATN encontradas nas formulações, não há interferência significativa de um analito na determinação do outro quando a análise for realizada de forma sequencial.

4.4.2. Aplicação do sistema BIA com detecção amperométrica na análise sequencial de AML e ATN em formulações farmacêuticas.

Os amperogramas (amperometria pulsada / PAD) em BIA foram então obtidos isoladamente (de forma sequencial), nos seguintes pulsos de potenciais:

1º) Aplicação do pulso de + 1,0 V / 50 ms para oxidação de AML associado a 0,0 V / 300 ms para limpeza eletroquímica do eletrodo. Foram adicionadas à célula BIA cinco concentrações crescentes dos padrões de AML de 5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 25A – “a” a “e”). Em seguida cada amostra (S_1C_1 e S_2C_1 – Tabela 1) fora injetada

duas vezes de modo alternado (Fig. 25A – “1” e “2”) e por fim as mesmas cinco concentrações dos padrões foram injetadas de modo decrescente ($25 - 5 \mu\text{mol L}^{-1}$).

A partir do amperograma obtido (Fig. 25A), foi possível construir a curva de calibração da corrente (i) em função da concentração de AML (Fig. 26A).

2º) Pulso de $+1,65 \text{ V} / 70 \text{ ms}$ para oxidação de ATN associado a $0,0 \text{ V} / 300 \text{ ms}$ para limpeza eletroquímica do eletrodo (Figura 36B). Foram adicionadas à célula BIA, em injeções sucessivas, soluções dos padrões de ATN de forma análoga à descrita para AML. As amostras (S_1C_2 e S_2C_2 – Tabela 1) também foram injetadas duas vezes de modo alternado (Fig. 25B – “1” e “2”).

As Figuras 36B e 37B são referentes ao amperograma e respectiva curva de calibração da corrente (i) em função da concentração de ATN.

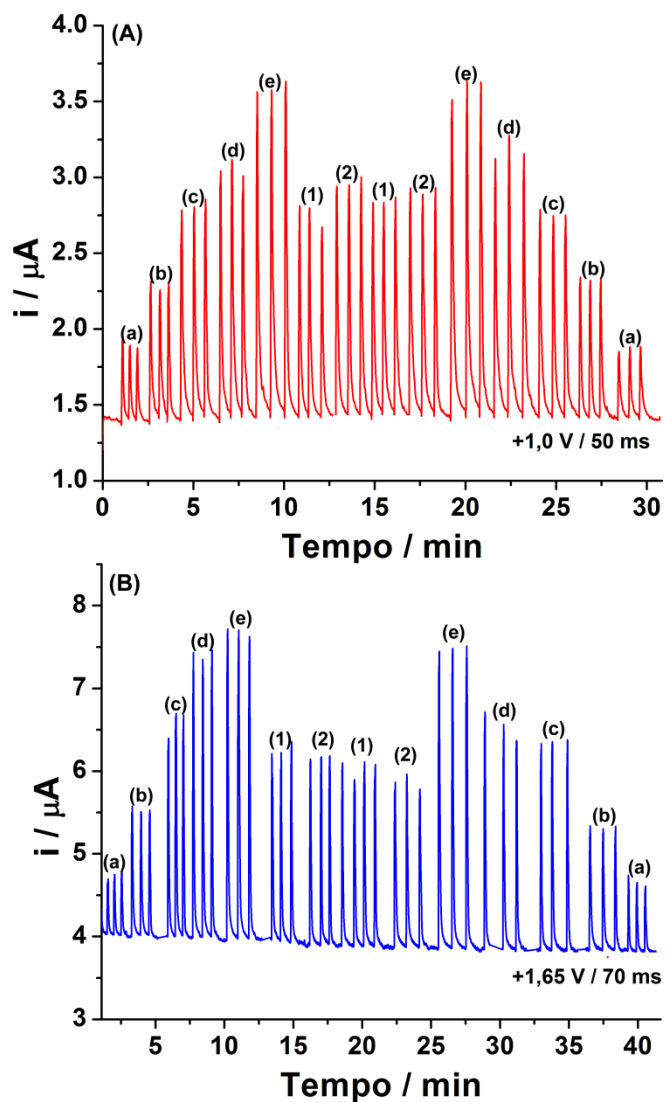


Figura 36. (A) Amperograma obtido com a injeção de cinco soluções padrões de AML em ordem crescente de concentração (a-e: $5\text{-}25\ \mu\text{mol L}^{-1}$), duas amostras devidamente diluídas (1 e 2) e soluções padrões em ordem decrescente de concentração (e-a). **(B)** Amperograma obtido com a injeção de cinco soluções padrões de ATN (a-e: $5\text{-}25\ \mu\text{mol L}^{-1}$), duas amostras devidamente diluídas (1 e 2) e soluções padrões em ordem decrescente de concentração (e-a). Condições experimentais conforme Figura 25.

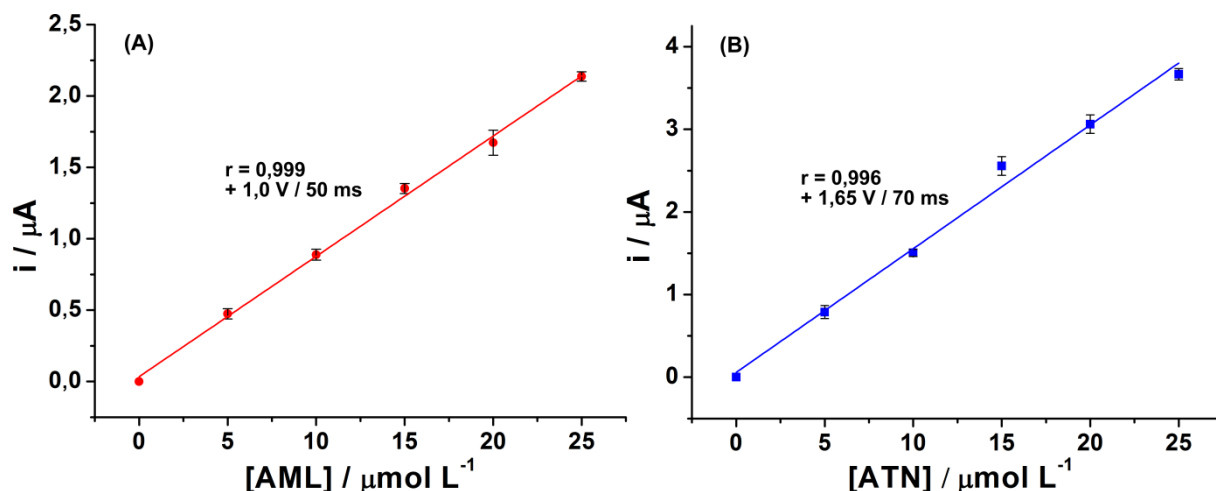


Figura 37. Curvas de calibração obtidas para AML (A; $r = 0,999$) e ATN (B; $r = 0,996$) a partir de dados obtidos da Figura 36.

As curvas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de correlação adequados ($r = 0,999$ e $r = 0,996$ para AML e ATN, respectivamente) para as concentrações estudadas, com a obtenção das seguintes equações de reta:

$$y = 0,0843 (\pm 0,0020) [\text{AML}] + 0,0338 (\pm 0,0290) \quad (r=0,999) \quad \text{Eq. (8)}$$

$$y = 0,1500 (\pm 0,0064) [\text{ATN}] + 0,0576 (\pm 0,0780) \quad (r=0,996) \quad \text{Eq. (9)}$$

Como pode ser observado, as soluções padrões injetadas em ordem crescente ou decrescente de concentração para cada espécie apresentaram respostas semelhantes, confirmando que o fenômeno da contaminação do eletrodo ou efeito de memória estão ausentes, mesmo usando um eletrodo de trabalho sem modificação química.

As características analíticas do método proposto de determinação sequencial de AML + ATN encontram-se listadas na Tabela 13.

Tabela 13. Características analíticas do método proposto para determinação sequencial de AML + ATN.

Característica	AML	ATN
r	0,999	0,996
Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	$0,0843 \pm 0,0020$	$0,1500 \pm 0,0064$
Intercepto (μA)	$0,0338 \pm 0,0290$	$0,0576 \pm 0,0780$
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,074	0,073
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,25	0,23
Frequência Analítica (injeções h^{-1})	86	70
Repetibilidade Intra-dia	3,1%	1,9%

Onde: r: coeficiente de correlação; LOD: limite de detecção e LOQ: limite de quantificação.

4.4.3. Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto (BIA) e o método cromatográfico (HPLC).

A fim de avaliar o método proposto (BIA), os resultados obtidos foram comparados aos obtidos com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (método de referência)[36]. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos com os respectivos desvios padrões ($n=3$).

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta (BIA) e por HPLC.

Amostra	(mg /cápsula)					
	Valor da Bula (mg / cápsula)		BIA-PAD		HPLC	
	AML	ATN	AML	ATN	AML	ATN
S ₁	6,944	25	$7,0 \pm 0,2$	$24,3 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,1$	$25,1 \pm 0,7$
S ₂	6,944	50	$7,1 \pm 0,1$	$49,5 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,1$	$51,1 \pm 0,2$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, podemos calcular os erros relativos em relação aos valores rotulados de AML e ATN nas amostras e em relação aos resultados obtidos por HPLC (Tabela 15).

Tabela 15. Erros relativos para comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta.

Amostra	Analito	ER ₁	ER ₂
S ₁	AML	1,1%	1,9%
S ₂	AML	2,5%	3,2%
S ₁	ATN	2,8%	4,2%
S ₂	ATN	1,0%	3,1%

Onde ER₁: erro relativo tipo 1 (erro em relação ao valor rotulado); ER₂: erro relativo tipo 2 (erro em relação ao valor obtido por HPLC).

Os erros relativos foram calculados de acordo com as equações (10) e (11):

$$ER_1 = \frac{V_{BIA} - V_{ROT}}{V_{ROT}} \times 100 \quad \text{Eq. (10)} \quad ER_2 = \frac{V_{BIA} - V_{HPLC}}{V_{HPLC}} \times 100 \quad \text{Eq. (11)}$$

Nas quais:

V_{BIA} = valor obtido pelo sistema BIA-PAD;

V_{ROT} = valor rotulado;

V_{HPLC} = valor obtido por HPLC.

Os resultados apresentados na Tabela 15 demonstram que não há diferenças significativas entre o método proposto e o método de referência. Os resultados obtidos pelos dois métodos também foram comparados aplicando-se o teste t pareado (n = 3), os valores foram plotados na Tabela 16.

Tabela 16. Teste t pareado para comparação dos resultados por BIA-PAD e HPLC.

Amostra	Analito Determinado	T_{exp}	T_{crítico} (95%)
S₁	AML	2,02	2,57
S₂	AML	2,53	
S₁	ATN	1,58	
S₂	ATN	2,43	

Esses resultados também demonstram que os valores obtidos na determinação de AML e ATN por BIA e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%, confirmando a boa exatidão da metodologia proposta.

4.4.4. Comparação entre o método proposto (BIA) e métodos anteriormente publicados.

A Tabela 17 apresenta uma comparação entre as características do método analítico proposto (BIA-PAD) com métodos já publicados para a determinação de combinações de AML e ATN.

Tabela 17. Comparação de características analíticas entre o método proposto e outros métodos analíticos publicados para a determinação de combinações de AML e ATN.

Método	Analito	r	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Repetibilidade Intra-dia (%)	Frequência Analítica (h^{-1})	Solvente	Ref.
HPLC	AML	0,999	-	0,21	-	Acetonitrila e metanol	[36]
	ATN	0,999	-	0,20	-		
HPTLC	AML	0,999	10,581	1,38	-	Metanol	[37]
	ATN	0,999	11,264	1,12	-		
UV	AML	0,999	-	0,95	-	Metanol	[38]
	ATN	0,999	-	0,86	-		
BIA-PAD	AML	0,999	0,074	3,1	86	Aquoso	Este
	ATN	0,996	0,073	1,9	70		

Os trabalhos publicados anteriormente, em geral, apresentam lineariidade similar e valores de RSD um pouco melhores no estudo de repetibilidade. No entanto, os valores obtidos por BIA-PAD são adequados para análises farmacêuticas, pois se mostraram precisos, sensíveis (baixos limites de detecção) e com maior frequência analítica (análises hora). Por fim, o método proposto, apresenta várias vantagens sobre os métodos relatados: (i) frequências analíticas elevadas (> 70 injeções h^{-1}); (ii) preparação mínima de amostras (apenas dissolução e diluição, não é necessária filtração); (iii) não há necessidade de uso solventes orgânicos; (iv) baixa geração de resíduos químicos (pequenos volumes de amostras e reagentes são utilizados); (v) o sistema de BIA apresenta características portáteis e pode ser facilmente utilizado em laboratórios com infra-estrutura limitada. A disponibilização da versão comercial da célula BIA também poderá contribuir para que métodos usando este sistema passem a ser implementados na indústria em um futuro próximo [107].

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a inviabilidade da análise simultânea por BIA-MPA de AML e ATN nos compostos farmacêuticos estudados. Como alternativa, a análise do tipo sequencial proposta se mostrou precisa e demonstrou bons resultados: adequada sensibilidade, bons limites de detecção e quantificação e boas frequências analíticas. Estatisticamente, os resultados foram considerados concordantes aos obtidos por HPLC.

Conclui-se que o método proposto é de grande relevância, inovando pela exclusão do uso de solventes orgânicos no preparo das amostras de AML e ATN e sendo considerado rápido, simples e de baixo custo.

Por fim, tem-se que a metodologia desenvolvida é de grande interesse analítico, pois, até o momento, não foi descrito nenhum método eletroanalítico para a determinação da combinação de AML e ATN. Também não há descrito o emprego do sistema BIA para determinações do tipo sequenciais, podendo inclusive ser utilizada como estratégia de determinação de outras combinações de analitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fogari, R., et al., *Comparative Evaluation of Effect of Valsartan/Amlodipine and Atenolol/Amlodipine Combinations on Atrial Fibrillation Recurrence in Hypertensive Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2008. **51**(3): p. 217-222.
2. Rajanandh, M.G., A.S. Parihar, and K. Subramaniyan, *Comparative Effect of Racemic Amlodipine and its Enantiomer with Atenolol on Hypertensive Patients—A Randomized, Open, Parallel Group Study*. Journal of Experimental & Clinical Medicine. **5**(6): p. 217-221.
3. Dunselman Md, P.H.J.M., et al., *Value of the Addition of Amlodipine to Atenolol in Patients With Angina Pectoris Despite Adequate Beta Blockade*. The American Journal of Cardiology, 1998. **81**(2): p. 128-132.
4. Gimenes, D.T., et al., *Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Analytical Methods, 2014. **6**(10): p. 3261-3267.
5. Tormin, T.F., et al., *Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **202**: p. 93-98.
6. Montes, R.H., et al., *Fast determination of ciprofloxacin by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Electroanalysis, 2014. **26**(2): p. 432-438.
7. Silva, R.A.G., et al., *Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **733**(0): p. 85-90.
8. Kohlmann Jr., O., et al., *III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 1999. **43**: p. 257-286.
9. Passos, V.M.d.A., T.D. Assis, and S.M. Barreto, *Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional*. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 2006. **15**: p. 35-45.
10. Araújo, G.B.d.S. and T.R. Garcia, *Adesão ao tratamento anti-hipertensivo: uma análise conceitual*. Rev. eletrônica enferm, 2006. **8**(2): p. 259-272.
11. Flynn, J.T., W.E. Smoyer, and T.E. Bunchman, *Treatment of hypertensive children with amlodipine*. American Journal of Hypertension, 2000. **13**(10): p. 1061-1066.

12. Pfammatter, J., et al., *Amlodipine once-daily in systemic hypertension*. European journal of pediatrics, 1998. **157**(8): p. 618-621.
13. Brunton, L.L., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Vol. 12. 2011: McGraw-Hill Medical New York.
14. Mehta, J.L., et al., *Double-blind evaluation of the dose-response relationship of amlodipine in essential hypertension*. American heart journal, 1993. **125**(6): p. 1704-1710.
15. Goyal, R.N. and S. Bishnoi, *Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals*. Bioelectrochemistry, 2010. **79**(2): p. 234-240.
16. Valezi, C.F., et al., *An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **205**(0): p. 234-243.
17. Silva, L.P., B.C. Lourencao, and O. Fatibello-Filho, *Simultaneous voltammetric determination of amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in synthetic urine samples using a boron-doped diamond electrode*. Química Nova, 2015. **38**(6): p. 801-806.
18. Mansano, G.R., et al., *Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode: Improving the simultaneous voltammetric determination of amlodipine and valsartan in urine and combined dosage forms*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015. **738**(0): p. 188-194.
19. Mansano, G.R., A.P.P. Eisele, and E.R. Sartori, *Electrochemical evaluation of a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of an antihypertensive ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan in pharmaceuticals*. Analytical Methods, 2015. **7**(3): p. 1053-1060.
20. Gazy, A.A.K., *Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids*. Talanta, 2004. **62**(3): p. 575-582.
21. Švorc, L.u., et al., *Sensitive electrochemical determination of amlodipine in pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **728**(0): p. 86-93.
22. Dogan-Topal, B., et al., *Electroanalytical Studies and Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatine Calcium in Binary Mixtures Using First Derivative of the Ratio-Voltammetric Methods*. Electroanalysis, 2009. **21**(22): p. 2427-2439.
23. Ram, C.V.S., *Beta-Blockers in Hypertension*. The American Journal of Cardiology, 2010. **106**(12): p. 1819-1825.

24. Carlberg, B., O. Samuelsson, and L.H. Lindholm, *Atenolol in hypertension: is it a wise choice?* The Lancet, 2004. **364**(9446): p. 1684-1689.
25. Morris, K.F., et al., *Molecular dynamics simulation and NMR investigation of the association of the β -blockers atenolol and propranolol with a chiral molecular micelle.* Chemical Physics, 2015. **457**: p. 133-146.
26. Schiffrin, E.L., L.Y. Deng, and P. Larochele, *Effects of a beta-blocker or a converting enzyme inhibitor on resistance arteries in essential hypertension.* Hypertension, 1994. **23**(1): p. 83-91.
27. Goyal, R.N., et al., *Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode.* Electrochemistry Communications, 2006. **8**(1): p. 65-70.
28. Arvand, M., M. Vaziri, and M. Vejdani, *Electrochemical study of atenolol at a carbon paste electrode modified with mordenite type zeolite.* Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(5): p. 709-714.
29. Khoobi, A., et al., *Multivariate curve resolution-alternating least squares assisted by voltammetry for simultaneous determination of betaxolol and atenolol using carbon nanotube paste electrode.* Bioelectrochemistry, 2013. **94**(0): p. 100-107.
30. Amiri, M., E. Amali, and A. Nematollahzadeh, *Poly-dopamine thin film for voltammetric sensing of atenolol.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **216**: p. 551-557.
31. Sartori, E.R., et al., *Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode.* Talanta, 2010. **81**(4-5): p. 1418-1424.
32. Arvand, M., M. Vejdani, and M. Moghimi, *Construction and performance characterization of an ion selective electrode for potentiometric determination of atenolol in pharmaceutical preparations.* Desalination, 2008. **225**(1-3): p. 176-184.
33. Behpour, M., E. Honarmand, and S. Ghoreishi, *Nanogold-modified carbon paste electrode for the determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine by voltammetric methods.* Bull. Kor. Chem. Soc, 2010. **31**: p. 845-849.
34. Kristoffersen, L., et al., *Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: Method development and robustness testing by experimental design.* Journal of Chromatography B, 2007. **850**(1): p. 147-160.
35. Sankar, R., et al., *Simultaneous estimation of atenolol and amlodipine in formulations by reversed phase-HPLC.* Indian journal of pharmaceutical sciences, 1997. **59**(4): p. 171.

36. Barman, R.K., et al., *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of atenolol and amlodipine in pharmaceutical-dosage form*. Pak. J. Pharm. Sci, 2007. **20**(4): p. 274-279.
37. Argekar, A.P. and S.G. Powar, *Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000. **21**(6): p. 1137-1142.
38. Lamie, N.T., *Simultaneous determination of binary mixture of amlodipine besylate and atenolol based on dual wavelengths*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **149**: p. 201-207.
39. Kasture, A. and M. Ramteke, *Simultaneous UV-spectrophotometric method for the estimation of atenolol and amlodipine besylate in combined dosage form*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2006. **68**(3): p. 394.
40. Prasad, C., et al., *Simultaneous Determination of Atenolol-Amlodipine and Haloperidol-Trihexyphenidyl in Combined Tablet Preparations by Derivative Spectroscopy*. Pharmacy and Pharmacology Communications, 1998. **4**(7): p. 325-330.
41. Rathee, P., et al., *Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Atenolol as API and in Tablet Dosage Forms by Vierodt's Method using UV Spectrophotometry*. International Journal of ChemTech Research, 2010. **2**(1): p. 62-68.
42. Gimenes, D.T., et al., *Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **212**(0): p. 411-418.
43. Norouzi, P., et al., *Coulometric differential FFT admittance voltammetry determination of Amlodipine in pharmaceutical formulation by nano-composite electrode*. Talanta, 2015. **131**(0): p. 577-584.
44. Pereira, P.F., et al., *Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode*. Diamond and Related Materials, 2013. **39**(0): p. 41-46.
45. Pereira, P.F., et al., *Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **713**(0): p. 32-38.
46. da Silva, R.A.B., et al., *Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode*. Analytical Methods, 2011. **3**(12): p. 2804-2808.
47. Freitas, J.M., et al., *Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection*. Talanta, 2015.

48. Freitas, J.M.d., *Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos*, 2015. Universidade Federal de Uberlândia.
49. Pereira, P.F., et al., *Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol*. Talanta, 2012. **90**(0): p. 99-102.
50. Silva, R.A., et al., *Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **733**: p. 85-90.
51. Crow, D.R., *Principles and applications of electrochemistry*. 1994: CRC Press.
52. Ticianelli, E.A. and E.R. Gonzalez, *Eletroquímica: Princípios e Aplicações Vol. 17*. 1998: Edusp.
53. Quintino, M.d.S.M., *Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas*, 2003. Universidade de São Paulo.
54. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Vol. 2. 1980: Wiley New York.
55. Gong, J., Z. Guan, and D. Song, *Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **39**(1): p. 320-323.
56. Arribas, A.S., et al., *Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes*. Food chemistry, 2013. **136**(3): p. 1183-1192.
57. Medeiros, R.A., et al., *Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode*. Talanta, 2012. **99**: p. 883-889.
58. Oliveira, G.K., et al., *Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity*. Food chemistry, 2016. **192**: p. 691-697.
59. Felix, F.S., et al., *Quantification of terbinafine in pharmaceutical tablets using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection and batch injection analysis with amperometric detection*. Talanta, 2012. **101**: p. 220-225.
60. Dornellas, R.M., R.A. Munoz, and R.Q. Aucelio, *Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry*. Microchemical Journal, 2015.
61. Chailapakul, O., et al., *Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis*. Sensors, 2006. **6**(10): p. 1383-1410.

62. dos Santos, W.T.P., et al., *Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações*. Quimica nova, 2011. **34**(10): p. 1753-1761.
63. Torres Pio dos Santos, W., et al., *Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection*. Electroanalysis, 2008. **20**(17): p. 1878-1883.
64. dos Santos, W.T., et al., *Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009. **20**(7): p. 1249-1255.
65. Wang, D., et al., *Electrooxidation of methanol, ethanol and 1-propanol on pd electrode in alkaline Medium*. Int. J. Electrochem. Sci, 2009. **4**: p. 1672-1678.
66. Silva, R.A.B.d., *Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho*, 2012. Universidade Federal de Uberlândia.
67. Wang, J. and Z. Taha, *Batch injection analysis*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(10): p. 1053-1056.
68. Ramsing, A., J. Růžicka, and E. Hansen, *The principles and theory of high-speed titrations by flow injection analysis*. Analytica Chimica Acta, 1981. **129**: p. 1-17.
69. Tormin, T.F., et al., *Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection*. Talanta, 2011. **85**(3): p. 1274-1278.
70. Quintino, M.S.M. and L. Angnes, *Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool*. Electroanalysis, 2004. **16**(7): p. 513-523.
71. Wang, J., et al., *Computerized pipettes with programmable dispensation*. Analytica chimica acta, 1992. **267**(1): p. 171-177.
72. Brett, C.M., et al., *Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **468**(1): p. 26-33.
73. Wang, J. and L. Chen, *Small-volume batch-injection analyser*. Analyst, 1994. **119**(6): p. 1345-1348.
74. Thavarungkul, P., et al., *Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection*. Biosensors and Bioelectronics, 1999. **14**(1): p. 19-25.
75. Simões, F.R., C.M. Vaz, and C.M. Brett, *Electroanalytical detection of the pesticide paraquat by batch injection analysis*. Analytical letters, 2007. **40**(9): p. 1800-1810.

76. Dornellas, R.M., et al., *Electrochemical Oxidation of the Fungicide Dimoxystrobin and Its Amperometric Determination by Batch-Injection Analysis*. Analytical Letters, 2014. **47**(3): p. 492-503.
77. Karim, S.E.A., R.M. El-Nashar, and A.H. Abadi, *Potentiometric Determination of Imatinib under Batch and Flow Injection Analysis Conditions*. Int. J. Electrochem. Sci, 2012. **7**: p. 9668-9681.
78. El Gohary, N.A., R.M. El Nashar, and H.Y. Aboul-Enien, *Potentiometric determination of sibutramine using batch and flow injection analysis*. Analytical Letters, 2011. **44**(1-3): p. 241-257.
79. Brett, C.M., A.M. Oliveira Brett, and L.C. Mitoseriu, *Amperometric and voltammetric detection in batch injection analysis*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(19): p. 3145-3150.
80. Brett, C., A.M.O. Brett, and L.C. Mitoseriu, *Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow*. Electroanalysis, 1995. **7**(3): p. 225-229.
81. Bezerra da Silva, R.A., et al., *Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes*. Electroanalysis, 2011. **23**(11): p. 2601-2606.
82. Gimenes, D.T., et al., *Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid*. Electroanalysis, 2010. **22**(1): p. 74-78.
83. Karuwan, C., et al., *Pulsed amperometry for anti-fouling of boron-doped diamond in electroanalysis of β -agonists: application to flow injection for pharmaceutical analysis*. Sensors, 2006. **6**(12): p. 1837-1850.
84. Schiavon, G., et al., *Pulsed amperometric detection of ethanol in breath by gold electrodes supported on ion exchange membranes (solid polymer electrolytes)*. Electroanalysis, 1996. **8**(6): p. 544-548.
85. Codognoto, L., S. Machado, and L. Avaca, *Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations*. Diamond and related materials, 2002. **11**(9): p. 1670-1675.
86. Lawrence, N.S., et al., *Electroanalytical applications of boron-doped diamond microelectrode arrays*. Talanta, 2006. **69**(4): p. 829-834.
87. Pecková, K., J. Musilová, and J. Barek, *Boron-doped diamond film electrodes—new tool for voltammetric determination of organic substances*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2009. **39**(3): p. 148-172.
88. Švorc, L.u., et al., *Voltammetric determination of harmaline in natural food products using boron-doped diamond electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015. **744**: p. 37-44.

89. Alfaro, M.A.Q., et al., *Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2006. **17**(2): p. 227-236.
90. Pleskov, Y.V., *Electrochemistry of diamond: A review*. Russian Journal of Electrochemistry, 2002. **38**(12): p. 1275-1291.
91. de Barros, R.d.C.M., et al., *Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização*. Quim. Nova, 2005. **28**(2): p. 317-325.
92. Pleskov, Y.V., *Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis*. Journal of Analytical Chemistry, 2000. **55**(11): p. 1045-1050.
93. Swain, G. and C. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, 2007, Elsevier Amsterdam.
94. Kraft, A., *Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material*. Int. J. Electrochem. Sci, 2007. **2**(5): p. 355-385.
95. Rao, T. and A. Fujishima, *Recent advances in electrochemistry of diamond*. Diamond and Related Materials, 2000. **9**(3): p. 384-389.
96. Salazar-Banda, G.R., et al., *On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments*. Electrochimica Acta, 2006. **51**(22): p. 4612-4619.
97. Terashima, C., et al., *Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes*. Analytical chemistry, 2003. **75**(7): p. 1564-1572.
98. Pedrotti, J.J., L. Angnes, and I.G. Gutz, *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*. Electroanalysis, 1996. **8**(7): p. 673-675.
99. Britton, H.T.S. and R.A. Robinson, *CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1931: p. 1456-1462.
100. Brasil, M., *ANVISA (2003) Resolução nº 899 de 29/05/2003, DOU de 02/06/2003*. Guia paravalidação de métodos analíticos e bioanalíticos.
101. DOQ-CGCRE, I., *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. Rio de Janeiro. Brasil, 2002.
102. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, 2004. **27**: p. 771-780.
103. Skoog, D.A., et al., *Principios de análise instrumental*. Vol. 5. 2001: McGraw-Hill España.
104. Services, U.S.D.o.H.a.H. *Guidance for Industry: Q3C — Tables and List*, 2012. Acessado em 21/05/2015, disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073395.pdf>.

105. Swain, M., *Chemicalize. org*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(2): p. 613-615.
106. Gimenes, D.T., *Uso do método do padrão interno em sistemas FIA e BIA e determinação simultânea de diclofenaco e codeína em formulações farmacêuticas por amperometria de múltiplos pulsos*, 2013.
107. S.A., E.D. *Batch Injection Analysis (BIA) cell*, 2015. Acessado em 24/11/2015, disponível em http://www.dropsens.com/en/whats_new.html.