

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**IRANALDO SANTOS DA SILVA**

**Desenvolvimento de sensores e de métodos  
analíticos para determinação de compostos de  
interesse farmacêutico**

Versão da Tese corrigida

São Paulo

Data de Depósito na SPG

30/08/2013

**IRANALDO SANTOS DA SILVA**

**Desenvolvimento de sensores e de métodos analíticos para determinação de compostos de interesse farmacêutico**

Tese de doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Química).

Orientador: Prof Dr. Lúcio Angnes

São Paulo

Agosto de 2013

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Iranaldo Santos da  
S586d Desenvolvimento de sensores e de métodos analíticos para  
determinação de compostos de interesse farmacêutico / Iranaldo  
Santos da Silva. -- São Paulo, 2013.  
121p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São  
Paulo. Departamento de Química Fundamental.  
Orientador: Angnes, Lúcio

1. Métodos eletroanalíticos : Química analítica 2. Eletroforese  
capilar : Química analítica 4. Fármacos I. T. II. Angnes, Lúcio,  
orientador.

543.0871 CDD

## Iranaldo Santos da Silva

Desenvolvimento de sensores e de métodos analíticos para determinação de compostos de interesse farmacêutico

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*À minha mãe, a quem eu tenho uma admiração eterna,  
por seus exemplos de coragem e perspicácia, sendo  
indubitavelmente a minha fonte de vida.*

**Dedico**

*À minha esposa, com amor, admiração e gratidão por  
sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio  
ao longo do período de elaboração deste trabalho.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Essa jornada não se construiu sozinha. Portanto gostaria de prestar aqui alguns agradecimentos e partilhar meus méritos no desenvolvimento deste trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter a mim concedido o dom da vida.

Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes pela sua amizade, paciência, sabia orientação, e dedicação sendo uma figura marcante na minha formação.

A minha esposa Márcia, que durante essa jornada esteve sempre ao meu lado apoiando-me e incentivando-me nas minhas decisões.

A todos os meus familiares que acreditarem na realização deste projeto, em especial a minha MÃE Iracy, a quem eu tenho uma enorme admiração e uma dívida eterna de gratidão por desde o início ter investido na minha formação e nunca ter desistido deste sonho.

A CAEMA por ter me concedido as condições necessárias à realização deste projeto.

Aos velhos e novos amigos do LAIA (que mais parece um manicômio), Paulo, Luís (sensation), Denis (pimenta), Mauro (B1), Marcos (mineiro), André (metrohm), Fabis, Thiago Correia, Guilherme (Splinter), Minor, Alexandre (peixe), Eric (pop), João (B2), Marcelo (padre), Alvaro, Suely, Fernandinho, Simone, Daniel, Rastislav (Rasto), Daniela, Kelliton, Lúcia, Renata, Thiago Nogueira (Baby), Robson (IC), Bruno, Pamela, pela amizade construída, risadas, discussões científicas, idas e vindas do café no bloco 06, regadas de muita gozação porém com momentos de calorosas discussões científicas e proposições de parcerias (quase nunca frutíferas). Em especial gostaria de agradecer a alguns colegas dentre eles Paulo, Luís, Guilherme, Fernando, Suely, Denis, Marcos, Mauro que dedicaram parte do seu tempo e contribuíram com valiosas sugestões para a revisão do texto.

Ao profs. Claudimir Lúcio do Lago (líder dos frequentadores do tradicional café da tarde no B19) e Ivano G. R. Gutz pela amizade e apoio, além dos ensinamentos recebidos e ricas discussões que foram marcantes na minha formação bem como para elaboração desta tese.

Ao prof. Mauro Bertotti pelo seu exemplo de dedicação profissional bem com pelos ensinamentos, conselhos e incentivos recebidos ao longo do doutorado.

Ao prof. Thiago Paixão pela amizade, ensinamentos e contribuições no exame de qualificação.

Ao prof. Kagan Kerman por ter aberto as portas do seu laboratório e me conceder a oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa. E também a todos os amigos que fiz ao longo da minha estadia em Toronto.

A prof<sup>a</sup>. Silvia Serrano pelos ensinamentos e ricas contribuições científicas marcantes na minha formação.

A todos os amigos do bloco 2 pelos ótimos momentos de descontração vividos no IQ bem como de algumas discussões de trabalho.

A todos os funcionários do IQ-USP e em especial funcionários da CPG Cibele, Milton, Marcelo, Paulo e Emiliano pela atenção e bom atendimento.

Aos guerreiros do “*Areião*” pelos momentos de descontração e que contrariando todas as previsões do tempo sempre estiveram presentes nas terças e quintas no tradicional horário do almoço.

A todos os amigos do IQ-USP tanto da pós-graduação quanto da graduação, pelo bate papo de corredor no Instituto, confraternizações na praça de integração, jogos de futebol, etc.

A USP por ter fornecido a infraestrutura e o ferramental necessários à elaboração das minhas atividades ao longo do doutorado.

Aos professores da Química Analítica, em especial àqueles com quem tive oportunidade de conversar e receber alguns ensinamentos que foram decisivos na minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À CAPES por ter concedido a bolsa de doutorado no exterior e permitido a realização do estágio sanduíche na Universidade de Toronto.

À FAPESP pelo aporte financeiro ao nosso grupo de pesquisa.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para tornar este sonho possível, e que apesar de não expressamente citados aqui, deixo;

O meu muito obrigado.

## **EPIGRAFE**

*“O fracasso é apenas uma oportunidade para começar de novo, de maneira mais inteligente”.*

*Henry Ford*

## RESUMO

Da Silva, I.S. **Desenvolvimento de sensores e de métodos analíticos para determinação de compostos de interesse farmacêutico**. 2013. 121p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A crescente demanda por produtos farmacêuticos tem como consequência a necessidade de elaboração de novos procedimentos analíticos que, via de regra, apresentem características como: elevada frequência analítica, simplicidade, ausência de substâncias altamente tóxicas, e com baixo custo para o controle de qualidade dos fármacos lançados no mercado. Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de procedimentos para determinação de *N*-acetilcisteína (NAC), nimesulida (NMS), trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) em formulações farmacêuticas usando técnicas eletroanalíticas e métodos de separação. Na determinação da NAC foi usado um eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto (CoPc) em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Este sensor mostrou intensa catálise para NAC produzindo um aumento na corrente anódica de cerca de 700 vezes quando comparado com o eletrodo limpo. Um procedimento em FIA foi proposto usando este sensor, e a curva analítica foi linear no intervalo 5,0 × 10<sup>-5</sup> a 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, com coeficiente de correlação maior que 0,999. O DPR de 1,1% (n = 13) foi obtido para uma solução contendo 5,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de NAC. Além disso o método apresentou LD e LQ de 9,0 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> e 3,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A determinação eletroanalítica de NMS foi conduzida em solução de 1,0 mol L<sup>-1</sup> de NaOH usando eletrodo de carbono vítreo, meio em que não ocorre envenenamento da superfície do eletrodo. Desse modo, um método eletroanalítico usando voltametria de onda quadrada foi elaborado para análise de NMS. Nas condições ótimas de análise o método apresentou uma faixa linear no intervalo de 4,3 × 10<sup>-5</sup> a 4,2 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção de 3,2 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. A precisão do método foi avaliada em um mesmo dia de análise por sucessivas medidas voltamétricas (n = 10) em solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de NMS, sem a necessidade de renovação da superfície do eletrodo. Os resultados para esta série de medidas foram avaliados e o DPR calculado foi somente 1,2%, indicando que nessas condições o eletrodo apresentou uma resposta estável além de não sofrer qualquer efeito de envenenamento. Para a determinação simultânea de TMP e SMX foi desenvolvido um método analítico empregando eletroforese

capilar com detecção condutométrica sem contato (C<sup>4</sup>D). Usando uma solução 10 mmol L<sup>-1</sup> lítio-fosfato (pH 7,1 ) como tampão de corrida, a faixa linear de trabalho obtida para ambos os analitos foi de 12,5 a 200 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> com R > 0,999. Nas condições de análise foram obtidos LDs de 1,1 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> para a TMP, e 3,3 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> para o SMX com um tempo total de análise de 2,6 minutos.

**Palavras-chave:** métodos eletroanalíticos, eletroforese capilar, fármacos, FIA, C<sup>4</sup>D, sensores.

## ABSTRACT

Da Silva, I.S. **Development of sensors and analytical methods for determination of compounds of pharmaceutical relevance. 2013.** Ano. 121p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The growing demand for pharmaceutical products has created need for developing new analytical procedures that, as a rule, exhibit characteristics like, high sampling rate, simplicity, absence of highly toxic substances, and low cost for quality control of drugs launched in market. In this work, electroanalytical and capillary electrophoresis methods for determination of *N*-acetylcysteine (NAC), nimesulide (NMS), trimethoprim (TMP) and sulfamethoxazole (SMX) in pharmaceutical formulations were proposed. For NAC determinations a pyrolytic graphite electrode modified with CoPc in 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH was used. This new sensor showed to be catalytic for this compound producing an anodic current increase of 700 times when compared with bare electrode. A FIA procedure was proposed using this new sensor, and the method showed a linear response in a range of 5.0 × 10<sup>-5</sup> to 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> with correlation coefficient better than 0.999. RSD of 1.1% (n = 13) was obtained for a solution containing 5.0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> NAC. Furthermore the method presented DL and QL of 9.0 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> and 3.0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectively. NMS electroanalytical determination was conducted in a 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution using a glassy carbon electrode. In strongly alkaline medium it was verified that NMS does not produce poisoning of the electrode surface. Thus an electroanalytical method using square wave voltammetry was proposed for analysis of NMS. In the optimal analysis conditions proposed method showed a linear response in a range of 4.3 × 10<sup>-5</sup> to 4.2 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, with detection limit of 3.2 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Accuracy of the method was evaluated on the same day by successive voltammetric measurements (n = 10) in a 1.0 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide solution containing 1.0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> of NMS without the needing to renew electrode surface. Results for this series of measures were calculated and standard deviation was of only 1.2%, suggesting that in these conditions the electrode showed a stable response in addition to suffer no poisoning effects. For simultaneous determination of TMP and SMX an analytical method using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (C<sup>4</sup>D) was developed. Using a 10 mmol L<sup>-1</sup> lithium-phosphate (pH 7.1) solution as running buffer, a linear response

range for both analytes was obtained ranging through  $12.5$  to  $200 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  with  $R > 0.999$ . Under these analysis conditions, DL of  $1.1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  for TMP, and  $3.3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  for SMX were obtained, with a total analysis time of only 2.6 minutes.

**Keywords:** Electroanalytical methods, capillary electrophoresis, pharmaceuticals, FIA, C<sup>4</sup>D, sensors.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da <i>N</i> -acetil cisteína (NAC) .....	24
Figura 2: Estrutura química da ftalocianina na forma ácida (H <sub>2</sub> Pc).....	27
Figura 3: Estrutura química da metaloftalocianina (MPc) .....	28
Figura 4: Estrutura química da nimesulida (NMS) .....	31
Figura 5: Estrutura química do sulfametoxazol (SMX) .....	39
Figura 6: Estrutura química da trimetoprima (TMP).....	39
Figura 7: Célula eletroquímica: (1) base de teflon para suporte do copo e fixação da tampa, (2) corpo da célula eletroquímica em vidro Pyrex <sup>®</sup> , (3) tampa, (4) orifício para o eletrodo de referência, (5) orifício para purga de gás, (6) orifício para o eletrodo de trabalho, (7) orifício para o eletrodo auxiliar, (8) orifício para adição do analito. ....	49
Figura 8: (A) Detalhes da célula de fluxo utilizada nesse estudo: (a) base para o eletrodo (Teflon); (b) contato elétrico; (c) corpo do eletrodo resinado em epóxi; (d) corpo da cela de fluxo em acrílico; (e) agulha de aço inox (eletrodo auxiliar); (f) saída do fluxo; (g) entrada do fluxo; (h) eletrodo de referência; (i) disco de grafite pirolítico; (j) fita de Teflon; (B) Sistema de análise por injeção em fluxo usado nas determinações de NAC: (a) reservatório da solução transportadora; (b) bomba peristáltica; (c) seringa para aspirar a amostra; (d) injetor proporcional; (e) reservatório de amostra (f) cela de fluxo (descrita em detalhes em A); (g) potenciostato; (h) computador. ....	50
Figura 9: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico não modificado (A) e com CoPc adsorvida (B) em solução de 0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH saturada com nitrogênio. Velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> . <i>Adaptado referência (46)</i> .....	57
Figura 10: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc em solução 0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH saturada com N <sub>2</sub> usando diferentes velocidades de varredura (V s <sup>-1</sup> ): (a) 0,05; (b) 0,10; (c) 0,20; (d) 0,30; (e) 0,40 e (f) 0,50. (B) Regressão linear entre a corrente de pico anódico ( <i>i<sub>pa</sub></i> ) e a velocidade de varredura ( <i>v</i> ). <i>Adaptado referência (46)</i> .....	58

- Figura 11: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc na ausência (c) e na presença (d) de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH saturada com  $\text{N}_2$ . Inserido no gráfico: voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo não modificado na ausência (a) e na presença (b) de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC. Velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 60
- Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite modificado com CoPc em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH saturada com  $\text{N}_2$ , contendo NAC na faixa de concentração de  $109$  a  $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Equação da reta:  $I_p = 0,023 (\pm 2,73 \times 10^{-4}) C_{\text{NAC}} + 1,53 (\pm 0,173)$  ..... 62
- Figura 13: Sinais FIA para NAC usando um eletrodo de grafite pirolítico limpo (A) e modificado com CoPc (B). Cada pico corresponde à injeção de  $150 \text{ } \mu\text{L}$  de solução  $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NAC. Vazão:  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; potencial:  $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl KCl}_{(\text{Sat})}$  ..... 63
- Figura 14: Influência da vazão da solução carregadora sobre a corrente de pico de NAC. Concentração de NAC –  $750 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Condições do FIA: vazão – (a)  $0,5$  (b)  $1,0$  (c)  $1,5$  (d)  $2,0$  e (e)  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume de amostra –  $75 \text{ } \mu\text{L}$ ; percurso –  $15 \text{ cm}$ ; solução transportadora –  $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 65
- Figura 15: Influência do volume da alça de amostragem sobre a corrente de pico de NAC. Concentração de NAC –  $750 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Condições do FIA: vazão –  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Volumes de amostra – (a)  $25$  (b)  $50$  (c)  $75$  (d)  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ; percurso –  $15 \text{ cm}$ ; solução transportadora –  $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 65
- Figura 16: Sinais amperométricos obtidos no sistema FIA com detecção amperométrica para análise do conteúdo de NAC em formulações farmacêuticas. A análise das amostras ( $A_1$  a  $A_4$ ) foram acompanhadas pela injeção de uma série de soluções padrão (antes e depois) contendo (a)  $1,00$ , (b)  $0,75$ , (c)  $0,50$ , (d)  $0,25$ , (e)  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NAC. Experimentos realizados em  $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl KCl}_{\text{sat}}$ , com vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de amostra de  $75 \text{ } \mu\text{L}$ . 69
- Figura 17: Sinais voltamétricos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (1) e contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS. As curvas (2) e (3) correspondem a primeira e segunda varreduras, respectivamente.  $E_i = -0,5 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 1} = 0,8 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 2} = -0,5 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ . ..... 73
- Figura 18: Sinais voltamétricos registrados em eletrodo de carbono vítreo em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (1) e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS (2, 3, 4). As curvas (2), (3) e (4) correspondem

à primeira, segunda e terceira varreduras, respectivamente.  $E_i = -0,5 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda I} = 0,8 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 2} = -0,5 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ . ..... 75

Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS em diferentes velocidades de varredura.  $E_i = 0,0 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda I} = -0,9 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,01$  a  $1,00 \text{ V s}^{-1}$ . ..... 77

Figura 20: Relação entre a corrente pico catódica ( $I_{pc}$ ) e anódica ( $I_{pa}$ ) como função da velocidade de varredura em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , extraídas da Figura 19. .... 77

Figura 21: Variação do sinal de redução obtidos por voltametria cíclica para uma solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS. Sinais preenchidos representam as respostas obtidas em tampão BR pH 4,0 – 30% de álcool etílico. Sinais sem preenchimento representam as respostas obtidas em NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura:  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ . ..... 79

Figura 22: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo de  $0,5$  a  $6,9 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $a - j$ ) de NMS.  $E_i = 0,0 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda I} = -0,9 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .  $I_{pc} (\mu\text{A}) = -0,633 + 0,00851 \cdot C_{\text{NIM}}$ , ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). ..... 80

Figura 23: Voltamograma de onda quadrada obtido em eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS; Parâmetros da VOQ:  $f = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . ..... 81

Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (a) e na presença de NMS: (b)  $4,35 \times 10^{-5}$ ; (c)  $8,37 \times 10^{-5}$ ; (d)  $1,21 \times 10^{-4}$ ; (e)  $1,56 \times 10^{-4}$ ; (f)  $1,88 \times 10^{-4}$ ; (g)  $2,19 \times 10^{-4}$ ; (h)  $2,47 \times 10^{-4}$ ; (i)  $2,99 \times 10^{-4}$ ; (j)  $3,45 \times 10^{-4}$ ; (k)  $3,86 \times 10^{-4}$ ; (l)  $4,24 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; parâmetros da onda quadrada:  $f = 50 \text{ Hz}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ; (B) curva analítica correspondente:  $\Delta I_{pa} (\text{A}) = -1,53 \times 10^{-6} (\pm 5,04 \times 10^{-8}) + 0,055 (\pm 1,52 \times 10^{-4}) \times C_{\text{NIM}} (\mu\text{mol L}^{-1})$ . ..... 85

Figura 25: Estruturas químicas para a TMP e o SMX, com os valores de  $pK_a$  de equilíbrio correspondendo a  $\equiv\text{NH}^+ \rightleftharpoons \equiv\text{N} + \text{H}^+$  e  $=\text{NH} \rightleftharpoons =\text{N}^- + \text{H}^+$ , respectivamente. Valores de  $pK_a$  extraídos da referência (117) ..... 88

Figura 26: Eletroferogramas obtidos no primeiro e segundo detectores para injeções de  $\text{H}_2\text{O}$  (1),  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de SMX (2),  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de TMP (3), e de uma solução contendo  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de SMX (2) mais  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de TMP (4). Condições – Eletrólito de corrida:  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato de lítio ( pH 7,1); potencial de corrida:  $30 \text{ kV}$ ; injeção

hidrodinâmica: 25 kPa por 5 s; coluna capilar: 50  $\mu\text{m}$  d.i, 48 cm de comprimento total, 10 e 39 cm referentes ao comprimento efetivo para o primeiro e para o segundo detectores, respectivamente, a partir do ponto de injeção. .... 91

Figura 27: A – Eletroferogramas para diferentes concentrações de TMP mantendo a concentração de SMX fixa ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); B – Relação entre o sinal analítico das espécies e a concentração; C – Eletroferogramas para diferentes concentrações de SMX mantendo a concentração de TMP fixa ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); D – Relação entre o sinal analítico das espécies e a concentração. .... 93

Figura 28: Superposição de seis eletroferogramas obtidos no segundo detector para soluções padrão contendo  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TMP e  $690 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $175 \text{ mg L}^{-1}$ ) de SMX. Medidas realizadas na presença de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de potássio usado como padrão interno. Para melhor visualização dos sinais, a linha base foi deslocada verticalmente..... 96

Figura 29: Eletroferogramas de uma amostra farmacêutica e duas subseqüentes adições de  $17,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TMP e  $98,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) de SMX na mesma amostra. As demais condições são as mesmas da Figura 26..... 96

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Algumas propriedades físico-químicas da NAC (15, 16).....	26
Tabela 2: Algumas propriedades físico-químicas da NMS (65, 67) .....	32
Tabela 3 : Algumas propriedades físico-químicas do SMX (114, 115) .....	41
Tabela 4 : Algumas propriedades físico-químicas da TMP (118).....	41
Tabela 5: Reagentes utilizados .....	46
Tabela 6: Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas .....	66
Tabela 7: Comparação das características analíticas para determinação de NAC pelo método proposto com métodos eletroanalíticos da literatura. ....	67
Tabela 8: Determinação do NAC em amostras farmacêuticas usando o método proposto e o método oficial, descrito na Farmacopéia Brasileira (5).....	70
Tabela 9: Concentrações toleradas de alguns excipientes presentes nas formulações farmacêuticas na determinação de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC usando o método proposto.....	71
Tabela 10: Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada para obtenção da melhor resposta na determinação de NMS.....	83
Tabela 11: Resultados de recuperação para adições de solução padrão de NMS em duas amostras farmacêuticas.....	84
Tabela 12: Comparação das características analíticas para determinação de NMS pelo método proposto com métodos eletroanalíticos da literatura. ....	86
Tabela 13: Resultados obtidos para determinação de NMS em amostras farmacêuticas pelo método oficial (5) e usando o método voltamétrico proposto. ....	87
Tabela 14: Comparação entre métodos de eletroforese capilar usados para determinação simultânea de TMP e SMX. ....	94
Tabela 15: Resultados obtidos para determinação de trimetoprima e sulfametoxazol em amostras farmacêuticas pelo método proposto (CE-C <sup>4</sup> D) e pelo método de HPLC. ....	98
Tabela 16: Resultados do estudo de adição e recuperação de TMP/SMX em diferentes amostras farmacêuticas.....	99

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$a$  – amplitude da onda quadrada

$A$  – área do eletrodo

**AF** – Ácido fólico

**AINES** – anti-inflamatórios não esteroides

**ANVISA** – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

**BFT** – 1-benzil-4-ferrocenil-1H(1,2,3)-triazol

**BR** – Tampão Britton-Robinson

**C<sup>4</sup>D** – Detector condutométrico sem contato

**CE** – Eletroforese capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis*)

**CE-MS/MS** – Eletroforese capilar com detecção MS/MS

**CoPc** – ftalocianina de cobalto

**COX-1** – cicloxigenase-1

**COX-2** – cicloxigenase-2

**CSF** – do inglês, “*cerebrospinal fluid*”

**d.e.** – diâmetro externo

**d.i.** – diâmetro interno

**DHFR** – enzima diidrofolato redutase

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DPR** – desvio padrão relativo

**ECS** – eletrodo de calomelano saturado

**EOF** – Fluxo eletro-osmótico (do inglês, “*Electroosmotic Flow*”)

$E_{pa}$  – potencial de pico anódico

$E_{pc}$  – potencial de pico catódico

$F$  – Constante de Faraday

$f$  – frequência da onda quadrada

**FIA** – do inglês, “*Flow Injection Analysis*”

**FOIP** – enzima diidropteroato sintetase

**HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, “*high-performance liquid chromatography*”)

$i_{pa}$  - corrente de pico anódica

$i_{pc}$  – corrente de pico catódica

**$I_r$**  – corrente resultante

**IUPAC** – do inglês, “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”

**LD** – limite de detecção

**LQ** – limite de quantificação

**MS** – Espectrometria de massas

**NAC** – *N*-acetil cisteína

**NMS** – nimesulida

**pKa** – logaritmo da constante de acidez

**PVC** – Policloreto de vinila

**Q** – carga

**SD** – sulfadiazina

**SMX** – sulfametoxazol

**TMP** – trimetoprima

**UV** – ultra-violeta

**UV-VIS** – ultravioleta-visível

**v/v** – relação volume-volume

**V<sub>app</sub>** – Potencial de pico a pico

**ΔEs** – incremento de potencial

**μ<sub>a</sub>** – mobilidade eletroforética do analito

**μ<sub>o</sub>** – mobilidade eletroforética contra-íon

**μ<sub>s</sub>** – mobilidade eletroforética do co-íon

**v** – velocidade de varredura

**Γ** – recobrimento superficial do eletrodo

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Considerações gerais .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Analitos estudados .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 N-acetil cisteína (NAC) .....	24
1.2.2 Métodos para a determinação de NAC .....	26
1.2.3 Nimesulida (NMS) .....	31
1.2.4 Métodos para determinação de NMS .....	33
1.2.5 Trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX).....	38
1.2.6 Métodos para determinação de TMP e SMX .....	42
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 INSTRUMENTAÇÃO .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Medidas eletroquímicas .....	48
3.2.2 Análises em Fluxo .....	49
3.2.3 Medidas por eletroforese capilar .....	50
3.2.4 Medidas espectrofotométricas .....	51

3.2.5 Medidas cromatográficas.....	51
<b>3.3 PROCEDIMENTOS .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Modificação do eletrodo com CoPc .....	52
3.3.2 Preparo de amostras.....	52
3.3.3 Determinação de NAC.....	53
3.3.4 Determinação de NMS .....	54
3.3.5 Determinação simultânea de TMP e SMX .....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Determinação de <i>N</i>-acetil cisteína .....</b>	<b>56</b>
4.1.1 Comportamento eletroquímico da ftalocianina de cobalto (CoPc) .....	56
4.1.2 Oxidação eletrocatalítica do <i>N</i> -acetil-cisteína (NAC).....	59
4.1.3 Análise por injeção em fluxo da NAC.....	61
4.1.4 Aplicação analítica .....	68
4.1.5 Estudos de interferentes e recuperação.....	70
<b>4.2. Determinação voltamétrica de NMS.....</b>	<b>72</b>
4.2.1 Comportamento eletroquímico da NMS.....	72
4.2.2 Voltametria de onda quadrada .....	80
4.2.1.1 Otimização dos parâmetros .....	81
4.2.3 Estudo de interferentes e recuperação .....	83
4.2.4 Curva analítica e precisão.....	84
4.2.5 Aplicação analítica .....	87

<b>4.3. Determinação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) por eletroforese capilar .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Características analíticas.....	92
4.3.2 Precisão e efeito de matriz.....	94
4.3.3. Aplicação analítica .....	97
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>100</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>115</b>
<b>Trabalhos em paralelo .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>119</b>
<b>Atividades realizadas durante o doutorado .....</b>	<b>119</b>
Artigos publicados em periódicos indexados .....	119
Trabalhos apresentados.....	120
Congressos nacionais.....	120
Congressos Internacionais .....	120
Estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Toronto .....	121
Estágio Supervisionado em Docência .....	121

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

A Química Analítica está presente na medicina, na indústria e nos mais diversos ramos da ciência. Com seu vasto conjunto de ferramentas serve de aplicação em diversas áreas tais como a própria química, bioquímica e biotecnologia, saúde, química farmacêutica, química ambiental e de materiais. Ela é extremamente importante para a indústria, pois permite que os produtos e processos sejam rigorosamente avaliados e estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos.

Nos dias atuais, as investigações em química analítica estão relacionadas principalmente com o desenvolvimento e aplicação de novos métodos analíticos físicos e físico-químicos com métodos instrumentais de análise. Frente a essa nova realidade, o interesse pelos métodos clássicos de análise como gravimetria e análise volumétrica é cada vez menor, pois estes apresentam menor sensibilidade, limite de detecção mais elevado e em muitos casos, estão mais sujeitos a erros de reprodutibilidade sendo, por isso, difícil de responderem a muitas das atribuições do químico analítico (1).

A crescente demanda por produtos farmacêuticos tem como consequência a necessidade de elaboração de novos métodos analíticos que, via de regra, requerem para o controle de qualidade dos fármacos lançados no mercado, elevada frequência analítica, simplicidade, ausência de substâncias altamente tóxicas, e com baixo custo (2). Os fármacos quando administrados de forma inadequada podem ser muito nocivos à saúde, podendo levar o paciente à morte. Por essa razão, para garantir o sucesso do tratamento além de minimizar

os efeitos colaterais (tanto por falta como por excesso do princípio ativo), informações corretas sobre o teor do princípio ativo no medicamento administrado são necessárias.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (3) os medicamentos podem ser definidos como:

*“produtos especiais elaborados com a finalidade de diagnosticar, prevenir, curar doenças ou aliviar seus sintomas, sendo produzidos com rigoroso controle técnico para atender às especificações determinadas pela ANVISA”.*

Ainda nesse contexto, os fármacos são considerados como as substâncias químicas que constituem os princípios ativos do medicamento, enquanto que os medicamentos genéricos são descritos como, aqueles que apresentam o princípio ativo na mesma dose e forma farmacêutica, sendo administrados pela mesma via e com mesma indicação terapêutica. Além disso, os medicamentos genéricos devem ser iguais ao medicamento de referência e possuir qualidade, eficácia terapêutica e segurança comprovadas por meio de testes científicos registrados pela ANVISA (3).

Dentro da indústria farmacêutica, a análise de medicamentos é feita pelos próprios laboratórios da indústria, devendo ser executados com a frequência necessária para assegurar o bom funcionamento da mesma, garantindo a qualidade do produto final e oferecendo segurança aos usuários. Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria farmacêutica consiste na adulteração e falsificação de medicamentos. Esses eventos têm crescido significativamente com o aumento do consumo e da rentabilidade na área. Uma das formas de

combater este problema seria detectar os produtos farmacêuticos que não atendem às especificações de qualidade.

A indústria farmacêutica adota diversos procedimentos analíticos que são classificados como os métodos oficiais, os quais estão compilados em uma extensa série de monografias compondo a farmacopéia, e são utilizados como métodos de referência para o controle de qualidade, sejam para a matéria prima sejam para o produto final. A determinação e caracterização de cada composto descrito na farmacopéia são realizadas por métodos físicos e químicos específicos.

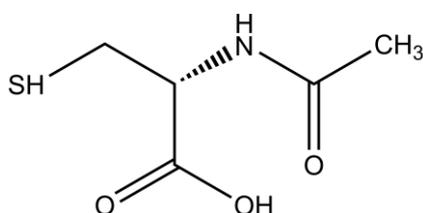
Dentre os métodos descritos na farmacopéia para dosagem do princípio ativo nos medicamentos, diversos apresentam inconvenientes, pois demandam etapas exaustivas de pré-tratamento da amostra, o que encarece o custo dos processos além do emprego, na maioria das vezes, de solventes altamente tóxicos, gerando resíduos indesejáveis que requerem tratamento posterior. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação, caracterização e quantificação de analitos de interesse farmacêutico, que combinem características como: menor tempo de análise, maiores sensibilidade e seletividade, bem como simplicidade de aplicação e baixo custo são extremamente importantes.

Frente às necessidades antes mencionadas, o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam simples, com elevada frequência analítica e de baixo custo, que possam ser utilizados no controle de qualidade, tanto para os produtos farmacêuticos industriais quanto para os medicamentos manipulados, são potencialmente de grande interesse. Dessa forma, os métodos eletroanalíticos baseados em eletrodos modificados ou alternativamente eletrodos não modificados que não sofram efeitos de envenenamento, além de métodos utilizando eletroforese capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”), apresentam características muito atraentes para serem explorados no controle de qualidade das formulações farmacêuticas (4).

## 1.2 Analitos estudados

### 1.2.1 *N*-acetil cisteína (NAC)

A NAC (Figura 1) é um pó cristalino, branco ou quase incolor, que apresenta alta solubilidade em água e etanol (5).



**Figura 1:** Estrutura química da *N*-acetil cisteína (NAC)

Usada principalmente como agente mucolítico direto, este fármaco atua sobre as características reológicas do muco, uma vez que ela é eficiente na quebra das ligações de dissulfeto, constituintes das macromoléculas mucoproteicas presentes na secreção brônquica, convertendo-as em dois grupos tiólicos. Essa ação farmacológica promove uma redução no tamanho da cadeia, e está relacionada à presença de um grupo tiol (-SH) livre na molécula de NAC, que lhe proporciona a sua atividade biológica. Como resultado da formação de moléculas com peso molecular inferior, a viscosidade do muco é reduzida, o que contribui para uma maior fluidez permitindo uma fácil eliminação do mesmo.

A NAC é eficaz na redução da consistência e viscosidade do muco, observando-se uma relação dose e tempo/resposta. Os aumentos progressivos das concentrações de NAC provocam uma maior e mais rápida redução de viscosidade do muco. Também tem sido usada de forma preventiva, como antídoto, em caso de intoxicações por paracetamol (6).

Estudos utilizando a NAC como agente oxidante associada à hidratação salina demonstraram uma ação desse composto prevenindo a redução da função renal, comparativamente à hidratação salina usada isoladamente, após exposição aos contrastes radiológicos, em pacientes com insuficiência renal crônica preexistente (7, 8).

A dosagem típica oral para NAC como agente mucolítico, e para a maioria das outras indicações clínicas, é 600 – 1.500 mg dividida em três doses ao longo de 24 horas. Em pacientes com câncer ou doenças cardíacas a dose terapêutica é maior, usualmente no intervalo de 2–4 gramas diariamente. A NAC também tem sido usado como antídoto em casos de envenenamento por paracetamol. A NAC atua como agente redutor promovendo a eliminação do N-acetil-p-benzoquinona – NAPQI, metabólito responsável pela toxicidade do paracetamol. Para envenenamento por paracetamol, a NAC é administrada por via oral com uma carga de  $140 \text{ mg kg}^{-1}$  e 17 doses subsequentes de  $70 \text{ mg kg}^{-1}$  a cada quatro horas, que assim evitam os danos nos hepatócitos e pode ser seguramente excretado. Nas intoxicações por paracetamol é importante iniciar a administração da NAC dentro das primeiras 8–10 horas passadas da overdose para garantir sucesso no tratamento. A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas deste fármaco.

A NAC pode prevenir tumores atuando como um agente bloqueador, isto é, prevenindo os passos de iniciação ou promoção na carcinogênese como resultado da interação direta com o carcinogênico ou seus produtos metabólitos. Além disso, esse fármaco apresenta uma elevada ação antioxidante, e alguns autores têm sugerido que a NAC possa auxiliar na complexação e eliminação de metais, bem como ser um agente quimiopreventivo efetivo em modelos de carcinogênese animal, quando associado à dieta, agindo sobre a diminuição da incidência de alguns tipos de câncer (9-14).

**Tabela 1: Algumas propriedades físico-químicas da NAC (15, 16)**

Nome IUPAC	2-acetamido-3-ácido mercaptopropanóico
Fórmula molecular	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S
Massa Molar	163,2
Densidade (g cm <sup>-3</sup> )	1,294
Ponto de fusão	106 – 108 °C
p <i>K</i> <sub>a1</sub> e p <i>K</i> <sub>a2</sub>	3,24 e 9,52
Solubilidade em água	100 mg mL <sup>-1</sup> (com aquecimento)

### 1.2.2 Métodos para a determinação de NAC

A literatura descreve diversos métodos para determinação de NAC em amostras farmacêuticas, incluindo métodos titulométricos (17-19), cromatográficos (20-22), espectrofotométricos (23-29), fluorimétricos (30, 31), turbidimétricos (32, 33).

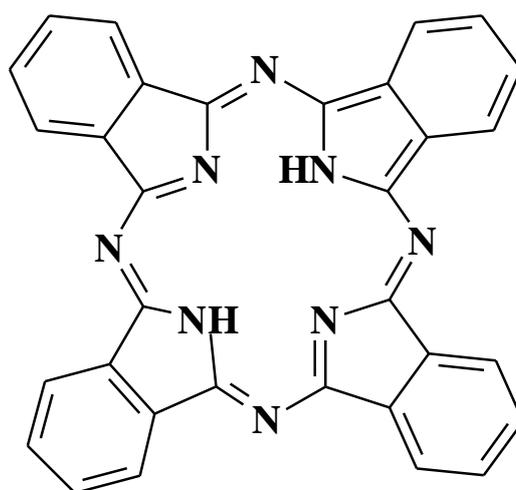
Vários métodos eletroquímicos também são relatados na literatura para quantificação de NAC aplicados nas mais diversas matrizes (34-40). Comparados aos métodos anteriores, os métodos eletroquímicos apresentam vantagens como, seletividade, rapidez e sensibilidade.

A oxidação da NAC em eletrodos não modificados geralmente ocorre em potenciais elevados e produz uma resposta eletroquímica relativamente baixa (41). A determinação electrocatalítica de tióis foi explorada usando eletrodo de grafite pirolítico (*edge plane*) (42). Nesse estudo, os autores verificaram que a resposta electrocatalítica no grafite pirolítico *edge plane* foi superior quando comparada com aquelas obtidas em outros substratos à base de carbono. Além disso, eles também atestaram que a metodologia proposta pode ser empregada

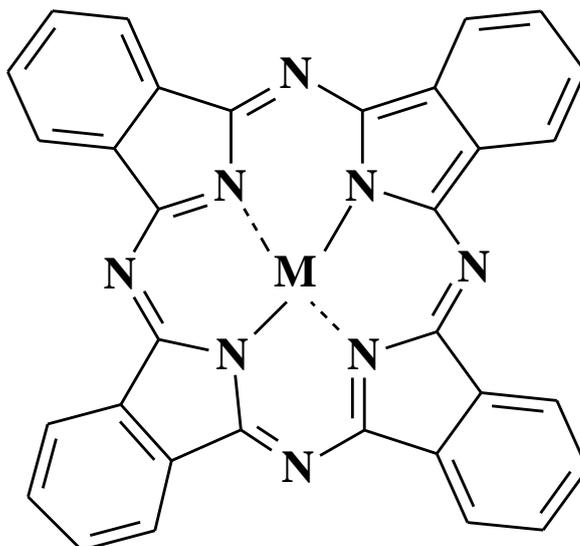
em um protocolo analítico simples, rápido e sensível para detectar tióis em matrizes biológicas usando voltametria ou em protocolos que utilizem etapas de separação.

Para superar os problemas de baixa atividade eletroquímica, valores de sobretenção elevados e envenenamento da superfície do eletrodo, novos eletrodos modificados para a determinação da NAC têm sido desenvolvidos. Algumas estratégias de modificação de eletrodos recentes que incluem zeolita Y-Co(II) (38), complexo Salen-Mn(III) associado com nanotubos de carbono (36), acetaminofeno eletrodepositado em nanopartículas de óxido de rutênio (43), ferroceno (44) e nanopartículas de óxido ferro (III) combinado com hexacianoferrato de cobalto (45) têm sido aplicadas para a determinação seletiva de NAC.

As “ftalocianinas” são uma classe de compostos orgânicos que apresentam uma estrutura em forma de anel (macrocíclico), ligado por pontes de nitrogênio, a partir de quatro unidades isoladas de isoindol (46). Na sua forma ácida (Figura 2), ela apresenta dois átomos centrais de hidrogênio que podem ser substituídos, possibilitando a coordenação com cátions metálicos. Essa nova estrutura é denominada de metaloftalocianinas (Figura 3).



**Figura 2:** Estrutura química da ftalocianina na forma ácida ( $H_2Pc$ )



**Figura 3:** Estrutura química da metaloftalocianina (MPc)

As metaloftalocianinas têm sido apresentadas na literatura como catalisadores eficientes, com interesse especial na oxidação eletroquímica de tióis, e que ainda apresentam capacidade de adsorção sobre superfícies de carbono e grafite em níveis de monocamadas (46, 47). Eletrodos modificados por estes materiais exibem atividade eletrocatalítica marcante para diversos analitos dentre eles: oxigênio (48, 49), peróxido de hidrogênio (50), nitrito (51), carbamato (52), hidrazina (53, 54) e dopamina (55, 56). Em particular, eletrodos modificados com ftalocianina de cobalto adsorvida sobre o eletrodo apresentaram atividade eletrocatalítica marcante para *L*-cisteína, 2-mercaptoetanol e *L*-glutathiona reduzida (57-59), em soluções aquosas alcalinas.

Embora poucos eletrodos modificados tenham sido empregados com sucesso na determinação da NAC, a maioria desses materiais apresenta diversas desvantagens tais como perda expressiva do agente modificador, estabilidade baixa em prazos longos e contaminação. Por essa razão, ainda se faz muito necessário explorar e desenvolver métodos que sejam simples e práticos para fabricar novos eletrodos modificados para determinação electrocatalítica da NAC.

FOULADGAR et al. (60) propuseram a elaboração de um sensor voltamétrico de pasta de carbono quimicamente modificado com nanotubos de paredes múltiplas combinado com etenilferroceno para determinação de NAC. Este sensor eletroquímico foi sensível e seletivo para determinação de baixas quantidades de NAC na presença de elevadas concentrações de triptofano. Estes autores verificaram que o método voltamétrico exibiu um comportamento linear em duas faixas distintas (0,2 a 35 e 35,0 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), com limite de detecção de 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A separação entre os potenciais de pico da NAC e do triptofano foi de 400 mV usando a método de voltametria de onda quadrada. O método foi aplicado em amostras de urina e farmacêuticas.

SALMANIPOUR et al. (61) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com 1-benzil-4-ferrocenil-1H-(1,2,3)-triazol (BFT)/nanotubos de carbono para determinação simultânea de NAC e ácido fólico (AF). As propriedades eletrocatalíticas do eletrodo modificado foram usadas na oxidação da NAC e do AF em soluções aquosas empregando voltametria cíclica, cronoamperometria e voltametria de onda quadrada. A separação do potencial de pico de oxidação entre as duas espécies foi de 280 mV. A curva de calibração obtida para NAC foi linear no intervalo de 0,10 a 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com limite de detecção (S/N = 3) igual 62  $\text{nmol L}^{-1}$  para NAC. O coeficiente de difusão e a constante de velocidade catalítica para oxidação da NAC usando o eletrodo modificado foram calculados como  $(3,5 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $(9,85 \pm 0,4) \times 10^4 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. O método foi empregado na quantificação de NAC e AF em algumas amostras reais de urina e produtos farmacêuticos.

Estratégia muito similar foi proposta por KEYVANFARD et al. (62). Esses autores usaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de paredes múltiplas e vinilferroceno para determinação de NAC e AF. A voltametria de onda quadrada foi usada no desenvolvimento de um método altamente seletivo para determinação simultânea destes dois

analitos. As correntes de pico aumentaram linearmente no intervalo de  $0,100 - 662 \mu\text{mol L}^{-1}$  (NAC) e  $10,0 - 900 \mu\text{mol L}^{-1}$  (AF), com limites de detecção de  $0,09$  e  $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O DPR para uma solução contendo  $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NAC foi de  $1,5\%$ , enquanto que para  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AF foi de  $1,9\%$ . O eletrodo modificado foi aplicado na determinação simultânea de NAC e AF em amostras farmacêuticas, urina e soro sanguíneo.

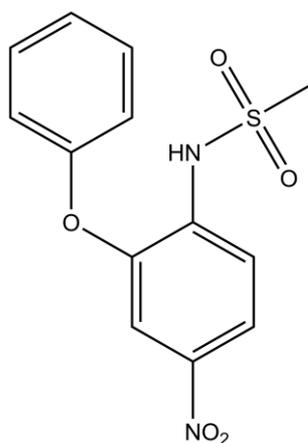
KARIMI-MALEH et al. (44) construíram um novo sensor introduzindo nanotubos de carbono e ferroceno em pasta de carbono, e usaram este novo eletrodo modificado para determinar NAC em níveis de traços. Usando voltametria cíclica e cronoamperometria, estes autores mostraram que o sensor proposto catalisa a oxidação de NAC em solução de tampão fosfato produzindo um pico de oxidação estreito. Usando voltametria de pulso diferencial, o método proposto apresentou intervalo de calibração linear situado entre  $1,0$  e  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com limite de detecção de  $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Finalmente, o eletrodo modificado foi avaliado como novo sensor eletroquímico para determinação de NAC em amostras de medicamentos, soro e urina.

DO CARMO et al. (63) realizaram estudos eletroquímicos usando nitroprussiato de ferro (II) como mediador redox para oxidação electrocatalítica de *L*-cisteína e NAC. O catalisador foi incorporado em um eletrodo de pasta de carbono e apresentou resposta electrocatalítica para oxidação de compostos sulfídricos sendo usado para determinação NAC e *L*-cisteína. O sensor apresentou resposta linear no intervalo de  $0,92 - 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $0,96 - 14,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , para determinação de *L*-cisteína e NAC, respectivamente. O limite de detecção calculado para *L*-cisteína foi igual a  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  sendo que para NAC foi igual  $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ . Como aplicação analítica o método proposto foi empregado na determinação de NAC em amostras farmacêuticas.

### 1.2.3 Nimesulida (NMS)

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) constituem uma classe de fármacos que estão entre os mais utilizados no mundo, sendo os agentes terapêuticos amplamente prescritos para tratamento de processos inflamatórios e musculoesqueléticos dolorosos. O mecanismo de ação antiinflamatória dos AINEs ocorre por inibição prostaglandina por inativação das enzimas cicloxigenase-1 e cicloxigenase-2 (COX-1 e COX-2), que são enzimas responsáveis pela síntese da prostaglandina (64).

A NMS é um fármaco da classe dos AINEs que apresenta um modo de ação específica com propriedades analgésicas e antipiréticas. De acordo com a classificação da IUPAC, a NMS é designada quimicamente como N-(4-Nitro-2-fenoxifenil)metanossulfonamida cuja estrutura química está representada na (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura química da nimesulida (NMS)

Apresenta-se na forma de um pó amarelo pálido, cristalino, levemente untuoso ao tato, inodoro e não higroscópico. Possui  $pK_a$  ao redor de 6,5 (65) podendo se comportar como ácido ou base fraca em função do solvente, sendo praticamente insolúvel em água ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),

contudo, sendo facilmente solúvel em etanol e metanol, muito solúvel em acetona, clorofórmio, acetonitrila e dimetilformamida. Também é solúvel em soluções alcalinas e insolúvel em soluções ácidas. As propriedades químicas e físicas estão apresentadas na Tabela 2.

Essa substância provou ser um fármaco seguro e eficaz no tratamento de um amplo espectro de processos inflamatórios e no combate a dor, incluindo osteoartrite, desordens extra-articulares tais como tendinites e bursite, dor pós-operatório, dismenorréia primária. Diferentemente dos AINEs convencionais que apresentam os grupos funcionais carboxila ou hidroxila, a NMS é um análogo da sulfoanilida (66).

**Tabela 2: Algumas propriedades físico-químicas da NMS (65, 67)**

Nome IUPAC	N-(4-Nitro-2-fenoxifenil)metanossulfonamida
Fórmula molecular	$C_{13}H_{12}N_2O_5S$
Massa Molar ( $g\ mol^{-1}$ )	308,31
Densidade ( $g\ cm^{-3}$ )	1,476
Ponto de fusão	143 – 145 °C
$pK_a$	6,5 (65)
Solubilidade (água)	$10\ \mu g\ mL^{-1}$

A NMS inibe seletivamente a enzima COX-2, reduzindo a síntese de prostaglandinas relacionadas à inflamação. Sua potência de inibição frente a COX é intermediária, mas é relativamente seletiva para a enzima COX-2 o que permite minimizar os danos gástricos e intolerância. Os efeitos terapêuticos da NMS são um resultado do seu completo modo de ação, que tem como alvo, um número de mediadores importantes do processo inflamatório,

tais como: prostaglandinas mediadas pela enzima COX-2, radicais livres, enzimas proteolíticas e histamina (68).

Outro efeito importante na administração desse fármaco está relacionado ao combate a radicais livres, que ajudam a proteger os danos aos tecidos que ocorrem durante o processo inflamatório. A potente ação antiinflamatória desse fármaco sugere uma possível ativação biológica do composto, uma vez que todos esses mecanismos descritos apresentam melhor eficiência “*in vivo*”. Além do que alguns estudos relatam ter a NMS melhor tolerabilidade e causar menor incidência de efeitos colaterais comparando com outros fármacos desta classe terapêutica (68, 69).

Com uma dose de 100 mg, a NMS é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal, alcançando o pico de concentração plasmática em 2-3 horas. O nível de ligação às proteínas plasmáticas é cerca de 99%, e a meia-vida de eliminação é de 2 a 5 horas. O estado de equilíbrio estável (do inglês, “*steady-state*”) é alcançado dentro de 24 a 36 horas, com duas administrações diárias. Este fármaco é completamente metabolizado no fígado sendo biotransformado em seu principal metabólito, hidroxinimesulida, tanto na forma conjugada quanto na forma livre, que também é farmacologicamente ativo. A eliminação é predominantemente renal, mais de 80%, não dando origem a fenômenos de acúmulo mesmo após administrações repetidas. Esses efeitos fornecem ao fármaco uma boa tolerabilidade sistêmica e gastrointestinal (70, 71).

#### ***1.2.4 Métodos para determinação de NMS***

Desde os primeiros métodos analíticos datados de 1977 (72) a determinação de NMS tem sido conduzida principalmente por técnicas cromatográficas, seguida pelas técnicas espectroscópicas.

Para dosagem da NMS em produtos farmacêuticos, a farmacopéia brasileira recomenda os métodos de titulação potenciométrica usando hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como titulante, espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta em meio alcalino com medidas sendo executadas em 392 nm, e HPLC-UV (do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”) com fase móvel consistindo de uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 50:50 (v/v).

Como mencionado anteriormente, os métodos cromatográficos representam uma grande fatia dentre os métodos empregados para determinação de NMS em diversas amostras. Desses métodos, HPLC com detecção espectrofotométrica (73-84), MS (85, 86) e detecção eletroquímica (87) tem sido reportados.

Um método HPLC-UV foi proposto por FERRARIO et al. (88) para quantificação de NMS e um de seus metabólitos, hidroxinimesulida (M1), em amostras de plasma de ratos, fluido cérebro-espinhal (CSF, do inglês, “*cerebrospinal fluid*”) e tecido cerebral. Estes autores conseguiram limites de detecção da ordem de  $65 \text{ nmol L}^{-1}$  em CSF e  $81 \text{ nmol L}^{-1}$  em plasma e tecido cerebral. Os autores ainda comentaram que o método também é interessante para estudar o papel da NMS na modulação de processos neuroinflamatórios.

RUELA et al. (89) desenvolveram e validaram um método analítico para uma determinação rápida de NMS em amostras farmacêuticas. A separação foi realizada em coluna cromatográfica LiChrospher® RP-select B com 12,5 cm de comprimento, 4,0 mm d.i. e 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato pH = 6,0 (55:45) com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . A detecção foi conduzida em 300 nm com temperatura mantida em 25 °C. O método foi aplicado nas análises de NMS em estudos de liberação *in vitro* apresentando uma rápida e eficiente alternativa analítica para avaliação de perfis de dissolução do fármaco.

Os métodos espectrofotométricos também foram frequentemente usados para as análises de NMS, com destaques para aqueles com derivatização com reagente cromogênico (90-95), UV (96) e espectrofotometria UV derivativa de segunda ordem (97, 98).

Uma revisão recente publicada na literatura (99), apresenta o levantamento das técnicas analíticas para determinação de fármacos AINEs durante o período de 1990 até 2008 mostrando que apenas 9% dos trabalhos publicados para determinação de NMS correspondem a métodos eletroanalíticos.

Dos primeiros trabalhos explorando técnicas eletroquímicas ALVAREZ-LUEJE et al. (100) realizaram um estudo dos processos redox da NMS empregando eletrodos de carbono vítreo para avaliar a oxidação do composto, e eletrodo gotejante de mercúrio para a redução. Em solução hidro-alcoólica (tampão BR com 30% de álcool etílico), o processo de redução foi dependente do pH do meio podendo apresentar até 3 picos de redução, e que esses processos são devidos ao grupo nitro presente na molécula. Por outro lado, a oxidação do composto apresentou apenas um pico bem definido consistindo de um processo irreversível no intervalo de pH estudado, que fora atribuído à oxidação do grupo metilsulfonamida. Contudo, para os propósitos analíticos esses autores escolheram o eletrodo de gotejante de mercúrio e as medidas foram realizadas em meio misto contendo etanol-tampão BR na proporção 30:70 e pH 7. Usando voltametria de pulso diferencial, o método apresentou linearidade no intervalo compreendido entre 5,0 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limite de detecção de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O método foi aplicado na determinação de NMS em amostras farmacêuticas.

Um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow Injection Analysis*) com detecção amperométrica foi proposto por CATARINO et al. (101) e aplicado para determinação de alguns compostos que provocam o envenenamento rápido do eletrodo de trabalho. Esse sistema consistiu de dois canais de fluxo paralelos, e para determinação de NMS a solução transportadora consistiu em mistura etanol-Tampão BR (30:70) com pH 6,1, e

para o condicionamento e limpeza da superfície do eletrodo a solução usada apresentou a mesma composição química que a anterior porém com 70% de etanol. O movimento no módulo de análise seguiu o princípio de relocação multi-sítio do detector combinando a configuração tubular do detector voltamétrico com o deslocamento do injetor comutador. Esse arranjo foi satisfatoriamente empregado na determinação de diltiazem e NMS. No caso dos resultados obtidos para diltiazem, estes foram comparados com o método oficial da farmacopéia americana enquanto que para NMS apenas testes de adição e recuperação foram avaliados e apresentaram valores de 101,1% com DPR de 1,1% para uma solução contendo  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS.

O desenvolvimento e validação de um método, aplicando planejamento fatorial combinado com voltametria adsortiva para determinação de NMS foi proposto por FURLANETTO et al. (102). A NMS foi acumulada em 0 V por 46 s no eletrodo de gota pendente de mercúrio e após se estabelecer as melhores condições de análise, o método apresentou linearidade na faixa de  $3,32 \text{ nmol L}^{-1}$  a  $0,385 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com níveis de recuperação e DPR ( $n = 9$ ) de 101,3% e 1,3%, respectivamente.

Um método potenciométrico foi proposto por KUMAR et al. (103) para determinação de NMS usando um sensor de PVC contendo NMS-ácido molibdofosfórico. A quantificação foi realizada com base na formação do par complexo NMS-ácido molibdofosfórico como material eletroativo e o intervalo de resposta encontrado ficou situado entre  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Alguns trabalhos também fizeram uso de eletrodos modificados para determinação de NMS em amostras farmacêuticas. Nanotubos de carbono e ácido cisteico formado a partir da oxidação de *L*-cisteína foram usados na forma de um filme fino na superfície do carbono vítreo para determinação eletroanalítica de NMS (104). Um pico de oxidação foi registrado em 1,251 V por voltametria de pulso diferencial com faixa de trabalho variando de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Ainda usando nanotubos de carbono,

só que de paredes múltiplas, ZHANG et al. (105) propuseram uma nova estratégia de preparação de eletrodo para determinação de NMS mediante modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Esses autores destacam que o eletrodo modificado apresentou melhores propriedades catalíticas para redução de NMS em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,6) com o potencial de redução sendo deslocado positivamente de  $-0,665 \text{ V}$  para  $-0,553 \text{ V}$  em relação ao eletrodo limpo. A sensibilidade apresentou um aumento em 7 vezes. Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  também foram usadas como agente modificador de eletrodo na elaboração de um novo sensor (106). Em tampão HAc-NaAc  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0) o processo de redução da NMS foi irreversível no novo sensor, além de apresentar propriedades catalíticas favoráveis. O pico de redução foi deslocado em 58 mV para potencias mais positivos. Nas condições de análise o limite de detecção encontrado foi da ordem de  $0,13 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . GHAVAMI & NAVAEI (107) usaram eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbeto de silício para investigar a eletroquímica do fármaco NMS por voltametria e cronoamperometria. Os resultados demonstraram que o eletrodo modificado apresentou ótimo efeito catalítico, pois conseguiu antecipar o processo de redução da NMS em 137 mV, além de aumentar a sensibilidade em um fator de 5,8 vezes. A faixa de trabalho conseguida foi de 0,09 a  $8,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  com limite de detecção de  $30 \text{ nmol L}^{-1}$ .

Apenas em dois estudos foram usados eletrodos não modificados para determinação da NMS. O baixo interesse na utilização de eletrodos não modificados é motivado pelo rápido bloqueio da superfície do eletrodo pelos subprodutos gerados do processo redox. EL-SAYED et al. (108) aproveitaram as propriedades adsorptivas da NMS na superfície de carbono vítreo e elaboraram um método eletroanalítico com uma etapa de preconcentração por 90 segundos em  $-400 \text{ mV}$ . Como estratégia para evitar o envenenamento, esses autores estabeleceram um procedimento de limpeza por imersão do eletrodo em solução etanol a 95% por um período de 2 minutos antes de cada medida. Com LD e LQ iguais a  $0,32 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $106 \text{ nmol L}^{-1}$ ,

respectivamente (obtidos em tampão BR, pH 5,3 contendo 10% de álcool), o método foi satisfatoriamente aplicado em formulações farmacêuticas. Por outro lado, MALODE et al. (109) estudaram a oxidação da NMS em tampão fosfato em condições fisiológicas usando um eletrodo de pasta de carbono. Após 20 s de pré-concentração em condições de circuito aberto, um pico de oxidação bem definido foi obtido no intervalo de potencial de 0,4 a 1,4 V por voltametria cíclica em diferentes pHs, sendo a melhor resposta obtida em pH 7,0. Usando a voltametria de pulso diferencial o método foi aplicado em amostras farmacêuticas e biológicas.

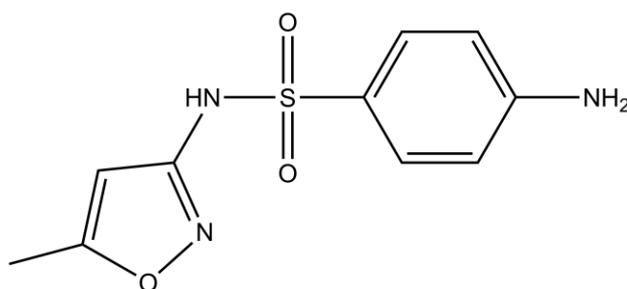
### ***1.2.5 Trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX)***

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos que apresentam propriedades de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. De acordo com a definição anterior, e segundo o seu modo de ação, estes compostos podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (110).

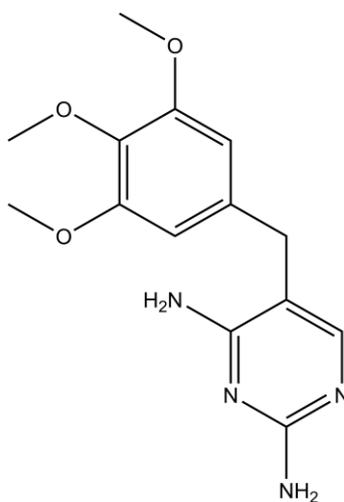
Tentativas de utilização de compostos químicos ou composições no tratamento de enfermidades são conhecidas ao longo da história, porém seu uso como terapia no combate de agentes (microorganismos) causadores de infecções no organismo teve maior êxito com o advento da descoberta da penicilina, que aconteceu de forma bem casual pelo bacteriologista escocês Alexander Fleming, em 1928.

O SMX é um fármaco que associada à trimetoprima TMP torna-se um poderoso antibiótico que tem sido largamente usado em tratamentos quimioterápicos por mais de 40 anos. O SMX é designado quimicamente como 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida consiste, de acordo com a Farmacopéia, em um pó cristalino branco

ou quase branco, praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetona, ligeiramente solúvel em soluções diluídas de hidróxido de sódio. Com gosto ligeiramente amargo, é inodoro ou quase inodoro além de ser obtido por síntese química (5). A TMP é denominada segundo a IUPAC 5-((3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2,4- pirimidinadiazina e apresenta-se como um pó cristalino branco ou branco amarelado, praticamente inodoro com gosto ligeiramente amargo, com polimorfismo e obtido por síntese química. Também muito pouco solúvel em água, ligeiramente solúvel em clorofórmio ou metanol (5). As estruturas químicas são apresentadas nas Figura 5 e Figura 6.



**Figura 5:** Estrutura química do sulfametoxazol (SMX)



**Figura 6:** Estrutura química da trimetoprima (TMP)

Essa combinação é comercializada com diferentes nomes e tem sido usada no tratamento de diversos tipos de infecções dos tratos respiratório, urinário e gastrointestinal. O elevado efeito antimicrobiano dessa combinação de fármacos é devido a sua ação sinérgica sobre o metabolismo do ácido fólico, sendo antibióticos efetivos comumente usados em associação para o tratamento de diversos processos infecciosos (111). O SMX e a TMP interferem no bloqueio sequencial de duas enzimas que catalisam estágios sucessivos de biossíntese do ácido fólico no micro-organismo. O SMX é um antibiótico da classe das sulfonamidas que apresenta um amplo espectro de atuação e atua inibindo a enzima bacteriana sintetase diidropteroato (*FolP*), que catalisa a adição de difosfato de diidropterina ao ácido p-amino-benzóico, que possui estrutura análoga ao SMX (112). Por outro lado, a TMP age como um inibidor da enzima diidrofolato redutase (*DHFR*), inibindo a conversão do diidrofolato a tetraidrofolato e provocando erros de divisão celular durante o processo de replicação dos microorganismos (113). O produto formado durante ação da *FolP*, 7,8-diidropteroato, reage com glutamato para formar diidrofolato, que é reduzido a tetraidrofolato pelo ação da diidrofolato redutase (*DHFR*), o alvo da TMP. O Tetraidrofolato é um cofator essencial envolvido na transferência de uma unidade de carbono o que implica na biossíntese das bases purínicas e pirimidínicas bem como na biosíntese e catabolismo de alguns aminoácidos. Essa combinação também impede o aparecimento de resistência aos fármacos e foi demonstrado ter um efeito sinérgico em diversas bactérias.

Esses compostos apresentam elevada absorção pelo trato gastro-intestinal. Apresentam pico plasmático no período de 1 a 4 horas após a administração oral. A meia vida desses compostos no organismo humano é muito semelhante sendo de 10 horas para eliminar a TMP e 11 horas para o SMX. A excreção ocorre majoritariamente pela urina. Algumas propriedades químicas e físicas são apresentadas nas Tabela 3 e Tabela 4.

**Tabela 3 : Algumas propriedades físico-químicas do SMX (114, 115)**

Nome IUPAC	4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazolil)benzenossulfonamida
Fórmula molecular	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
Massa Molar ( $g\ mol^{-1}$ )	253,28
Densidade ( $g\ cm^{-3}$ )	1,462
Ponto de fusão	167 °C
$pK_{a1}$ ; $pK_{a2}$	1,6; 5,7 (116) 5,6 (117)
Solubilidade (água)	610 $mg\ L^{-1}$ (37 °C)

---

**Tabela 4 : Algumas propriedades físico-químicas da TMP (118)**

Nome IUPAC	5-((3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2,4- pirimidinadiazina
Fórmula molecular	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Massa Molar ( $g\ mol^{-1}$ )	290,32
Densidade ( $g\ cm^{-3}$ )	1,3
Ponto de fusão	199-203 °C
$pK_a$	7,3 (117)
Solubilidade (água)	400 $mg\ L^{-1}$ (25 °C)

---

### ***1.2.6 Métodos para determinação de TMP e SMX***

A literatura apresenta uma imensa lista de métodos analíticos para determinação de sulfonamidas e seus metabólitos em amostras de alimentos, fluidos biológicos e águas naturais. Em particular a espectrofluorimetria (119), espectrofotometria (120), voltametria (121-123) e cromatografia (124-129) são alguns exemplos de métodos usados na determinação de TMP e SMX nessas amostras.

Métodos eletroanalíticos foram elaborados por ANDRADE et al. (130) para determinação simultânea de TMP e SMX usando as propriedades do eletrodo de diamante dopado com boro na oxidação dessas espécies. Apesar das ótimas características analíticas do método proposto associadas à análise simultânea destes compostos, o método ainda apresentava como desvantagem o fato de ser em batelada. Estes mesmos autores propuseram uma nova estratégia para determinação de TMP e SMX combinando as características do método eletroanalítico anterior em um módulo de FIA (131). O sistema de fluxo foi baseado em multicomutação com parada de fluxo, devido à limitação que o sistema FIA apresenta quando acoplado com os métodos voltamétricos clássicos para determinação de dois componentes da amostra em uma mesma medida. Apesar dos avanços no novo método conseguidos à custa da mecanização do procedimento analítico, a frequência analítica foi de 30 análises por hora.

A determinação de antibióticos, geralmente, é realizada prevendo a análise de dois analitos ou mais. Com base nessas informações os métodos de separação são os mais adequados para esses propósitos. Por isso, os métodos cromatográficos representam ainda uma grande fatia dos métodos desenvolvidos para determinação desses analitos.

Contudo a maioria desses métodos geralmente é muito laboriosa apresentando diversas etapas no preparo das amostras fazendo com que as análises sejam demoradas, o que é um fator indesejável no controle de qualidade.

A técnica de CE representa uma alternativa muito interessante, pois apresenta como vantagem frente às outras técnicas de separação, maior eficiência e resolução em um tempo menor de análise associado à utilização de volumes reduzidos da amostra (1 – 10 nL por injeção) e do eletrólito de trabalho (10 – 100 mL diários) (132).

A CE usando detecção UV-VIS tem sido explorada para quantificação de TMP e SMX em uma ampla variedade de matrizes, tais como em produtos farmacêuticos (133-135), e sangue humano (136, 137). Estes mesmos compostos também foram detectados em amostras de alimentos e amostras ambientais por CE-MS/MS (138) e em produtos farmacêuticos usando equipamento de CE com detecção amperométrica (139).

CHU et al. (140) realizaram a determinação de TMP, SMX e SD (sulfadiazina) em amostras farmacêuticas utilizando CE com detecção amperométrica. Apesar dos baixos limites de detecção encontrados para os três compostos, (0,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para TMP, 0,31  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SD e 0,20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SMX), a separação completa dos três analitos foi conseguida somente com 14 minutos em condições otimizadas de análise.

BERZAS-NEVADO et al. (133) também propuseram um método de CE para detecção de sulfanilamidas (SD e SMX) e compostos associados em formulações farmacêuticas. Este método consistiu na detecção UV-VIS com detector de arranjo de diodos e apresentou limites da ordem de 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SMX e 3,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o TMP. A separação foi conduzida aplicando 30 kV a 25 °C em tampão fosfato 15  $\text{mmol L}^{-1}$  com pH ajustado para 6,2. Nessas condições o tempo total de análise foi de 6 minutos.

TESHIMA et al. (137) realizaram a determinação de TMP e SMX em plasma por CE com detecção UV-VIS em 220 nm. Os analitos foram extraídos do plasma com acetato de etila sendo analisados em 20 kV a 25 °C em tampão fosfato (15 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,2). O tempo total de corrida foi de 8 minutos e os limites de detecção encontrados foram de 39,5 e 6,89 µmol L<sup>-1</sup>, para SMX e TMP, respectivamente. O método foi aplicado no monitoramento desses compostos em pacientes que receberam tratamento quimioterápico de infecções por *Pneumocystis carinii*.

Um método de CE microfluídico com detecção UV em 214 nm acoplado a um sistema FIA foi desenvolvido por FAN et al. (141). Neste estudo foi explorada a pré-concentração on-line em condições *stacking* (empilhamento de espécies carregadas no capilar durante o processo de injeção da amostra) – que ocorre devido à diminuição na velocidade dos analitos ao migrarem de uma zona de pH baixo (a amostra foi dissolvida em HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>) para uma zona de pH elevado (30 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 8,5). Este sistema favoreceu a rápida separação dos analitos apresentando uma frequência de análises de 38 amostras por hora. O método foi satisfatoriamente aplicado na quantificação de TMP e SMX em amostras farmacêuticas.

Esta tese apresenta os resultados desenvolvidos ao longo do doutorado, que apresentavam como ponto em comum a sua aplicação analítica, ou seja, a determinação do analito em formulações farmacêuticas. Esses resultados serão apresentados e descritos em detalhes nas páginas seguintes.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos desta tese foram explorar novas estratégias de análise empregando técnicas eletroanalíticas e eletroforese capilar para a determinação de compostos de interesse farmacêutico. Os compostos farmacêuticos aqui estudados foram *N*-acetilcisteína (NAC), nimesulida (NMS), trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX).

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Na Tabela 5 estão relacionados os principais reagentes utilizados neste trabalho. Todos os reagentes usados foram de grau analítico e sem qualquer etapa de purificação.

Tabela 5: Reagentes utilizados	
REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Ftalocianina de cobalto	Sigma-Aldrich
Nimesulida	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -acetil-cisteína	Sigma-Aldrich
Trimetoprima	Sigma-Aldrich
Sulfametoxazol	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico	Sigma-Aldrich
Hidróxido de lítio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	Merck
Cloreto de potássio	Merck
Acetonitrila	Merck
Metanol	Synth
Trietilamina	Vetec

---

Com exceção da solução da CoPc, preparada pela dissolução de quantidade adequada do composto em DMSO, todas as demais soluções foram preparadas com água purificada através do sistema NANOpure, Barntead/Thermolyne Co., Dubuque, Iowa, EUA), com resistividade superior 18 M $\Omega$  cm.

Soluções estoques de NAC e NMS foram preparadas diariamente por dissolução de massa adequada do composto em solução de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio.

Soluções de cloreto de potássio foram preparadas por dissolução de quantidade apropriada do sal em água desionizada.

Soluções estoque 1,00  $\times$  10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de trimetoprima e sulfametoxazol foram preparadas em metanol. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em água desionizada.

O eletrólito de corrida, tampão lítio-fostato (pH 7,1) usado nas medidas de eletroforese capilar, foi preparado a partir do ácido fosfórico a 10,0 mmol L<sup>-1</sup> e o pH da solução foi corrigido com hidróxido de lítio.

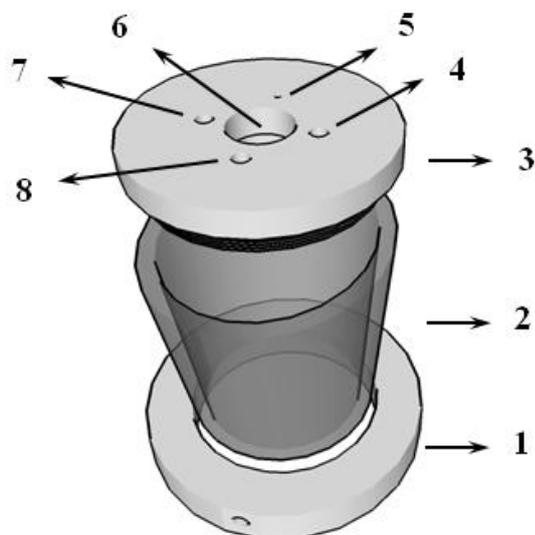
## 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

### 3.2.1 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab modelo  $\mu$ AutoLab tipo III (EcoChemie, Utrecht, Holanda) equipado com software GPES versão 4.9.007.

Os experimentos eletroquímicos realizados em condições estacionárias foram conduzidos em uma célula confeccionada em vidro (Figura 7) e com tampa em Teflon<sup>®</sup> contendo entrada para três eletrodos. Eletrodos de carbono vítreo (d.i. = 3,0 mm) e grafite pirolítico plano basal – GPB (8,0 mm de comprimento, 5,0 mm de diâmetro da Union Carbide Co., Cleveland, Ohio, USA) preparado em resina epóxi, foram usados como eletrodos de trabalho. Como eletrodos auxiliar e de referência foram usados, respectivamente, um fio de platina e Ag/AgCl KCl<sub>(sat)</sub> (142) construídos no próprio laboratório. Em alguns estudos realizados para NAC utilizou-se também um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência.

A limpeza do eletrodo de carbono vítreo foi realizada mediante polimento com alumina de granulometrias de 1, 0,3 e 0,05  $\mu$ m, seguida por 2 minutos em banho ultrassônico. A renovação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico foi realizada utilizando lixa de carvão de silício de granulometria 2000 mesh.



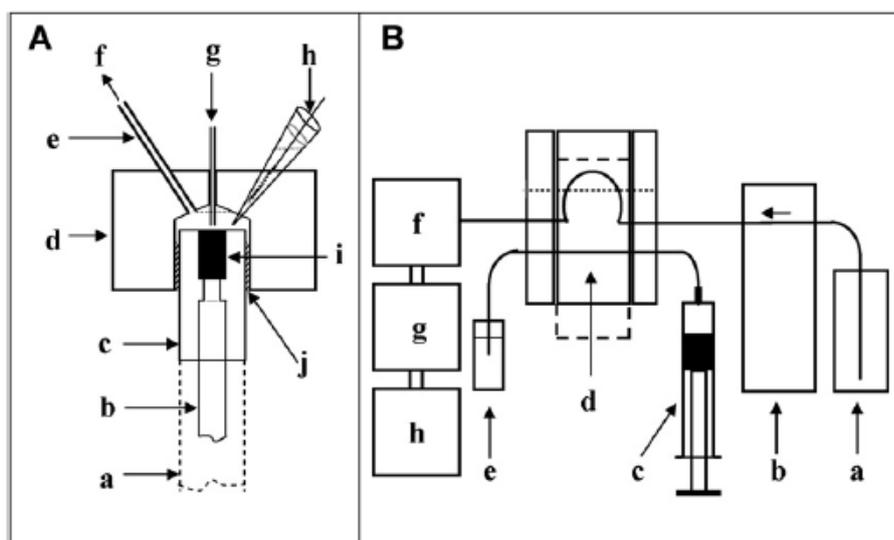
**Figura 7:** Célula eletroquímica: (1) base de teflon para suporte do copo e fixação da tampa, (2) corpo da célula eletroquímica em vidro Pyrex<sup>®</sup>, (3) tampa, (4) orifício para o eletrodo de referência, (5) orifício para purga de gás, (6) orifício para o eletrodo de trabalho, (7) orifício para o eletrodo auxiliar, (8) orifício para adição do analito.

### 3.2.2 Análises em Fluxo

Para os experimentos em condições de fluxo foi utilizada uma célula de fluxo construída no próprio laboratório (Figura 8A) com dimensões adequadas para adaptação do eletrodo de grafite pirolítico previamente descrito.

As medidas em fluxo foram realizadas em um sistema de linha única conectado a uma célula de fluxo do tipo *wall-jet* construída no próprio laboratório. Uma bomba peristáltica (Figura 8B-b) (Modelo 78016-30, Ismatec) foi usada para propulsão da solução transportadora (Figura 8B-a). Como solução transportadora foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . O injetor comutador (Figura 8B-d) foi usado para introduzir as soluções padrões e amostras (Figura 8B-e), que foram aspiradas manualmente com auxílio de uma seringa (Figura 8B-c). Na posição da linha pontilhada o injetor encontra-se na condição de amostragem, e ao ser deslizado para outra posição (posição atual na Figura 8B-d),

a alça de amostra é deslocada para a linha da solução transportadora, sendo dessa forma direcionada para a cela de fluxo (Figura 8B-f). Por fim, tubos de polipropileno (0.8 mm d.i.) serviram para conectar as partes do sistema. Todas as medidas foram realizadas em condições de temperatura ambiente de  $23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura 8:** (A) Detalhes da célula de fluxo utilizada nesse estudo: (a) base para o eletrodo (Teflon); (b) contato elétrico; (c) corpo do eletrodo resinado em epóxi; (d) corpo da cela de fluxo em acrílico; (e) agulha de aço inox (eletrodo auxiliar); (f) saída do fluxo; (g) entrada do fluxo; (h) eletrodo de referência; (i) disco de grafite pirolítico; (j) fita de Teflon; (B) Sistema de análise por injeção em fluxo usado nas determinações de NAC: (a) reservatório da solução transportadora; (b) bomba peristáltica; (c) seringa para aspirar a amostra; (d) injetor proporcional; (e) reservatório de amostra (f) cela de fluxo (descrita em detalhes em A); (g) potenciostato; (h) computador.

### 3.2.3 Medidas por eletroforese capilar

Os experimentos foram executados usando um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. Este equipamento apresenta dois detectores (143, 144) posicionados em 10 e 39 cm, respectivamente, em um capilar de sílica fundida de 48 cm de comprimento (Agilent, Folsom, CA, USA, 50- $\mu\text{m}$  d.i.  $\times$  375- $\mu\text{m}$  d.e.). O equipamento

possui uma fonte bipolar de 30 kV, com sistema de controle de temperatura e o capilar é posicionado em contato com um bloco de alumínio termostaticado, o que permite um melhor controle sobre a dissipação de calor e campo radial. Os detectores operam em 1,1 MHz e  $4 V_{app}$ . Antes do uso, o capilar foi condicionado com uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por 15 minutos, seguido por 10 minutos com água desionizada e depois por 10 minutos com eletrólito de corrida. Por fim, o equipamento foi condicionado mediante a aplicação de alta voltagem por um período de tempo de 30 minutos.

### ***3.2.4 Medidas espectrofotométricas***

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Femto modelo 600 plus, utilizando cubeta de quartzo convencional com caminho ótico de 1 cm e volume total de 4 mL, sendo medido no comprimento de onda fixado em 392 nm.

### ***3.2.5 Medidas cromatográficas***

O equipamento utilizado nas medidas cromatográficas foi um HPLC Shimadzu LC-10AS, equipado com detector de UV-VIS SPD-6AV e válvula de injeção Shimadzu com alça de amostragem de  $5 \mu\text{L}$ . As análises foram executadas em coluna cromatográfica Phenomenex C18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ) ( $4 \mu\text{m}$ ) e pré-coluna Phenomenex C18 ( $30 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ) ( $4 \mu\text{m}$ ). O comprimento de onda do detector foi ajustado para 254 nm. Como fase móvel foi usada uma mistura de água-acetonitrila-trietilamina preparado como segue: 1400 mL de água desionizada foram misturados com 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em balão volumétrico de 2000 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,9 completando-se o volume com água desionizada até a marca. A vazão da fase móvel foi ajustada para 2,0 mL/minuto, conforme recomendação da farmacopéia brasileira (5).

## 3.3 PROCEDIMENTOS

### 3.3.1 *Modificação do eletrodo com CoPc*

Antes da modificação, o eletrodo de grafite pirolítico plano basal foi lixado em lixas de carvão de silício de 2000 mesh, sendo então transferido para um béquer contendo água desionizada e sonificado em banho ultrassônico por 2 min. Na sequência, o eletrodo foi removido do ultrassom, lavado com pequenas porções de água desionizada e seco com leve fluxo de nitrogênio. Após a limpeza, o eletrodo foi imerso em uma solução  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de CoPc preparada em DMSO, com agitação constante, por um período de 20 minutos. Finalmente, o eletrodo foi lavado com água desionizada para remover possíveis moléculas de CoPc fracamente adsorvidas à superfície do eletrodo. Após a modificação do eletrodo, o filme foi condicionado no próprio eletrólito suporte ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH), mediante a execução de voltamogramas cíclicos até obter um perfil voltamétrico constante.

### 3.3.2 *Preparo de amostras*

Todas as amostras contendo os fármacos estudados foram adquiridas no comércio local.

Para a determinação de NAC foram usadas quatro diferentes amostras, sendo duas delas adquiridas na forma sólida (sachês contendo 100 e 600 mg de NAC) e duas na forma líquida (ampolas contendo cerca de 300 mg de NAC). Nenhum tratamento especial para essas amostras foi requerido antes da análise. As soluções das amostras foram preparadas utilizando-se uma quantidade adequada (massa ou volume – dependendo do estado físico da

amostra) em um balão volumétrico (50 ou 250 mL), sendo o volume completado com solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Diluições subsequentes foram necessárias para que as concentrações finais estivessem no intervalo linear da curva analítica usada nas análises.

Para as amostras utilizadas na determinação de NMS e na determinação simultânea de trimetoprima e sulfametoxazol, 10 comprimidos dos medicamentos foram pesados, finamente pulverizados e homogeneizados. Em ambos os casos nenhum tratamento especial foi requerido durante o preparo das amostras.

Na determinação de NMS uma solução intermediária foi preparada pesando-se 10 mg da amostra que depois foi solubilizada em 25 mL de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}$  e filtrada quando necessário.

Na determinação simultânea de trimetoprima e sulfametoxazol uma massa de 25 mg da amostra foi pesada e dissolvida em 10 mL de metanol. Após a homogeneização, uma alíquota adequada foi transferida para outro balão volumétrico, diluída com água desionizada e analisada na sequência.

### ***3.3.3 Determinação de NAC***

A quantificação de NAC nas amostras farmacêuticas aplicando o sistema FIA proposto foi realizada mediante a construção de curvas analíticas com diferentes soluções padrão. Cada solução (amostra e padrões) foi injetada ao menos três vezes, e os resultados foram expressos como valor médio do sinal obtido. A dosagem de NAC em cada amostra foi determinada por interpolação na curva analítica.

Os resultados obtidos com o eletrodo modificado foram comparados com o método oficial descrito na farmacopéia (5). A determinação de NAC foi realizada por titulação direta

com uma solução de iodo  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , previamente padronizada com solução de tiosulfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . O ponto final da titulação foi determinado usando amido como indicador (titulação iodimétrica).

### ***3.3.4 Determinação de NMS***

Duas amostras de fabricantes distintos (contendo  $100 \text{ mg/comprimido}$ ) foram analisadas usando o método voltamétrico proposto a seguir.  $3 \text{ mL}$  da solução da amostra foram transferidos para uma célula eletroquímica contendo  $5 \text{ mL}$  de solução  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após a adição de cada alíquota de solução estoque de NMS. O método da adição de padrão foi usado para determinação da quantidade de NMS em cada amostra.

Medidas espectrofotométricas foram executadas de acordo com o procedimento descrito na farmacopéia brasileira com pequenas modificações. Ao invés da determinação direta mediante a comparação entre o sinal obtido para amostra com o do padrão, conforme descreve o método oficial, curvas analíticas foram construídas com soluções padrão de NMS. As medidas foram realizadas na região do ultravioleta, cujos sinais foram medidos no comprimento de onda de  $392 \text{ nm}$ , em solução de hidróxido de sódio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

### ***3.3.5 Determinação simultânea de TMP e SMX***

O método eletroforético proposto foi aplicado na análise de duas amostras farmacêuticas contendo a seguinte proporção de TMP:SMX  $80:400$  e  $160:800 \text{ mg}$  por comprimido. Essas amostras foram analisadas com tempo não superior a um dia do seu preparo. As soluções dos padrões e amostra foram injetadas no capilar no modo de injeção

hidrodinâmica aplicando-se uma pressão 25 kPa por 5 segundos. A voltagem aplicada para separação dos analitos foi de 30 kV. O eletrólito de corrida que conferiu a resolução de linha base para ambas as espécies foi composto por uma solução tampão  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de fosfato de lítio (pH 7,1 em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Para quantificação dos fármacos nas amostras reais foram construídas curvas de calibração com uma série de soluções padrões. Ao menos três eletroferogramas foram obtidos para cada solução. Os eletroferogramas foram tratados aplicando dois procedimentos de filtragem de sinal sendo o primeiro através de mediana móvel de três pontos seguido por uma filtragem de 0,75-s com base em gaussiana (145). A dupla filtragem foi selecionada para reduzir ambos o ruído de fundo e sinais esporádicos ("*spikes*") induzidos pela fonte de alta voltagem sobre o detector.

## 4. Resultados e Discussão

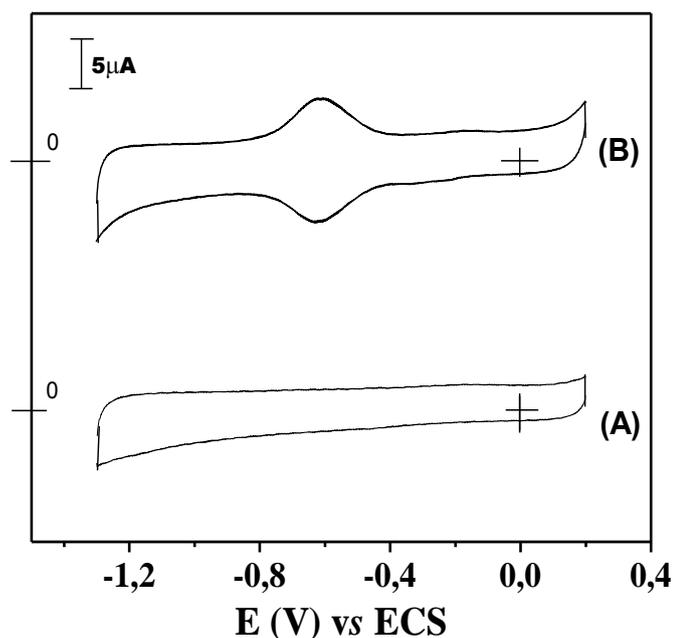
### 4.1. Determinação de *N*-acetil cisteína

#### 4.1.1 Comportamento eletroquímico da ftalocianina de cobalto (CoPc)

A CoPc é um composto já bem estudado e conhecido na literatura (49, 146-149) tendo o seu comportamento eletroquímico sido caracterizado em diversos substratos (59, 150-152).

A Figura 9 compara os voltamogramas cíclicos obtidos em solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH saturada com nitrogênio usando um eletrodo de grafite pirolítico plano basal não modificado (A) com aquele modificado com um filme de CoPc (B) no intervalo de potencial de -1,30 a 0,20 V. De acordo com a Figura 9 o eletrodo de grafite pirolítico não modificado (Figura 9A) apresenta uma baixa corrente de fundo em todo intervalo de potencial e nas condições experimentais avaliadas, além da ausência de picos voltamétricos que caracterizam a existência de processos faradáicos.

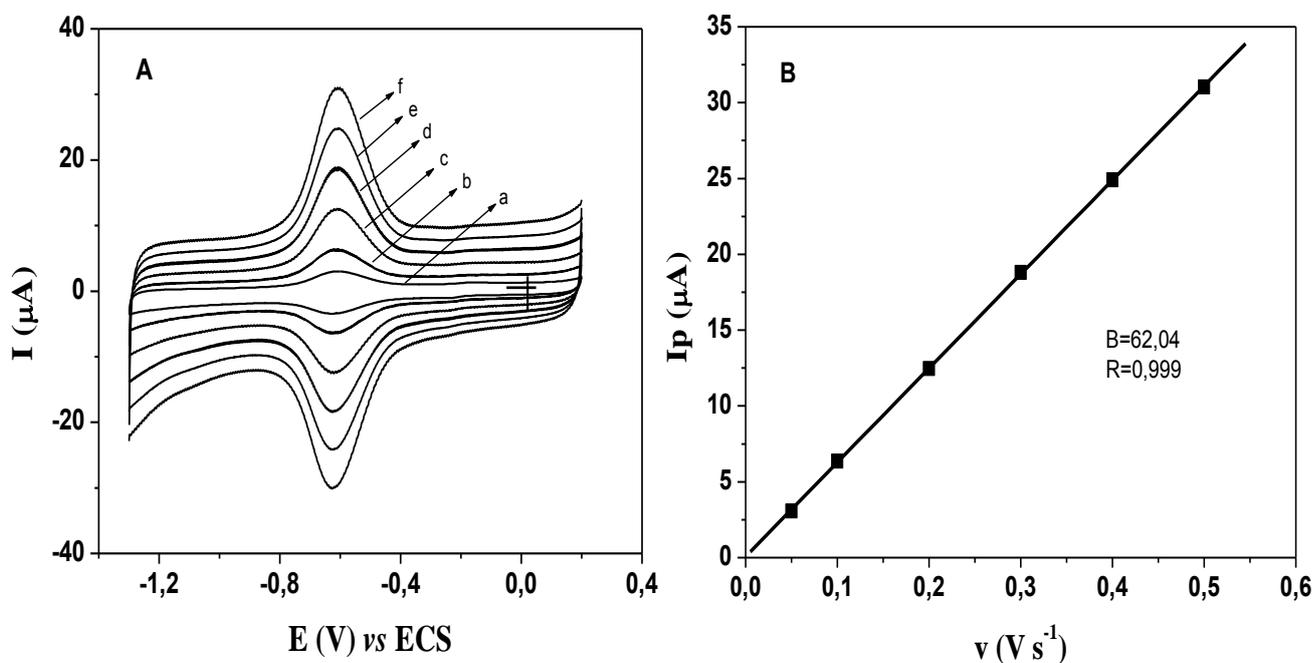
O voltamograma cíclico registrado para o eletrodo modificado com CoPc (Figura 9B), apresentou um par de picos redox bem definidos na região de potencias de -0,60 V ( $E_p = 0,62$  V), que durante a segunda e subsequentes varreduras ficam mais intensos até se alcançar um perfil constante. De acordo com a literatura esse par redox na região de -0,60 V está relacionado ao processo redox Co(II)Pc/Co(I)Pc (48, 153).



**Figura 9:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico não modificado (A) e com CoPc adsorvida (B) em solução de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH saturada com nitrogênio. Velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . *Adaptado referência (46)*

A Figura 10 mostra os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc obtidos em diferentes velocidades de varredura ( $0,05$ ;  $0,1$ ;  $0,2$ ;  $0,3$ ;  $0,4$  e  $0,5 \text{ V s}^{-1}$ ). Como pode ser observado na Figura 10A o aumento na velocidade de varredura produziu um aumento nas correntes do par redox, com uma separação entre os potenciais de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e pico catódico ( $E_{pc}$ ) de  $15 \text{ mV}$ , mesmo para as mais altas velocidades de varredura. A corrente de pico anódica (ver Figura 10B) foi diretamente proporcional a velocidade de varredura no intervalo de potencial de  $0,05$  a  $0,50 \text{ V s}^{-1}$ . Estes resultados indicam que o eletrodo modificado com CoPc apresenta um comportamento reversível do par redox na condição experimental avaliada, característico de um processo controlado por espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. Além disso, a razão entre as correntes de pico anódica e catódica ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) próximas a unidade e o potencial de pico (independente da

velocidade de varredura) sugerem que o processo envolve uma alta taxa de transferência de carga (154).



**Figura 10:** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH saturada com  $\text{N}_2$  usando diferentes velocidades de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ): (a) 0,05; (b) 0,10; (c) 0,20; (d) 0,30; (e) 0,40 e (f) 0,50. (B) Regressão linear entre a corrente de pico anódico ( $i_{pa}$ ) e a velocidade de varredura ( $v$ ). *Adaptado referência (46).*

Sistemas em que a etapa determinante da velocidade da reação é controlada pela adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo (155) apresentam uma relação linear entre a corrente de pico com a velocidade de varredura. Esta relação é dada pela equação:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $\Gamma$  representa a concentração total de espécies adsorvidas sobre a superfície do eletrodo ( $\text{mol cm}^{-2}$ ),  $A$  representa a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $v$  representa a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ) e os outros termos tem seus significados usuais. Além disso, a concentração total de espécies adsorvidas  $\Gamma$  está relacionada com a carga  $Q$  sob o pico voltamétrico e é descrito pela equação:

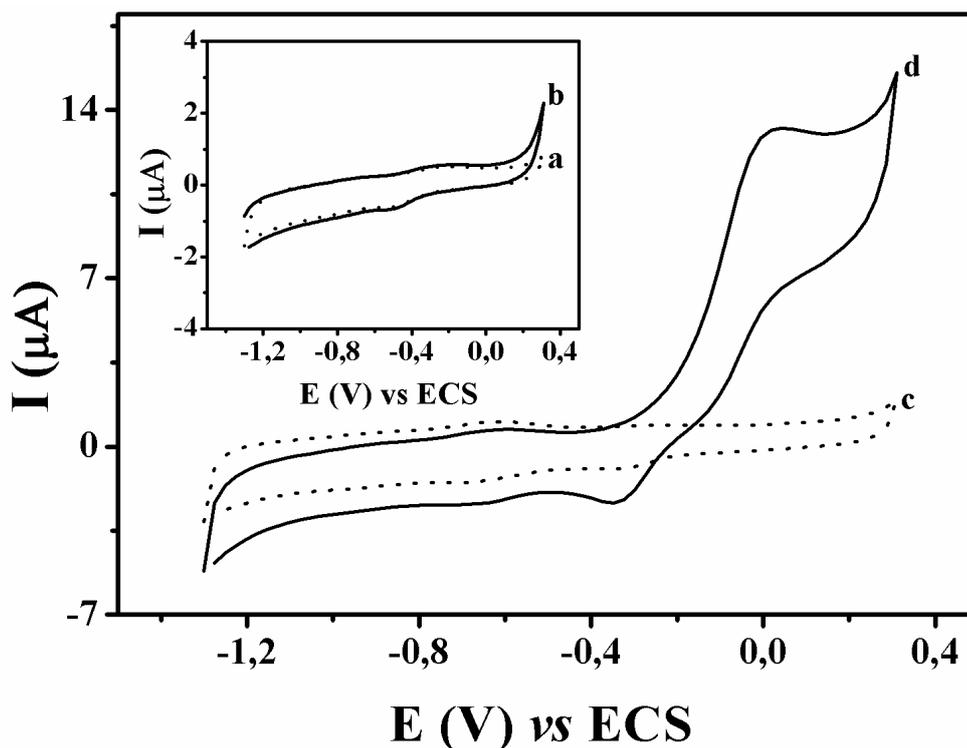
$$Q = n F A \Gamma \quad \text{Eq. 2}$$

Utilizando-se a equação 2 para o cálculo de espécies adsorvidas, com base na carga envolvida no processo redox (obtida com base na área sob os picos voltamétricos) e assumindo que o processo redox envolve a transferência de 1 elétron, foi possível estimar a cobertura da superfície em aproximadamente  $3,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . Estes resultados são similares àqueles descritos na literatura para modificação de eletrodo de grafite pirolítico usando CoPc (48, 156).

#### ***4.1.2 Oxidação eletrocatalítica do N-acetil-cisteína (NAC)***

A necessidade de impor potenciais elevados para oxidar compostos tiólicos, incluindo N-acetil-cisteína (NAC) e cisteína (CIS) sobre eletrodos convencionais tem sido reportada em diversos estudos (157, 158). A Figura 11 ilustra os experimentos que foram realizados para demonstrar a atividade catalítica da CoPc na oxidação de NAC. Os voltamogramas cíclicos feitos com o eletrodo não modificado (inserido na Figura 11) produziram perfis voltamétricos

semelhantes em todo intervalo de potencial avaliado ( $-1,3\text{V}$  a  $0,3\text{ V}$  *versus* ECS) que são característicos de processos puramente capacitivos, sendo que na presença de solução contendo  $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  de NAC (Figura 11b) um discreto processo de oxidação começa a aparecer por volta de  $0,2\text{ V}$ .



**Figura 11:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc na ausência (c) e na presença (d) de  $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  de NAC em solução  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  de NaOH saturada com  $\text{N}_2$ . Inserido no gráfico: voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo não modificado na ausência (a) e na presença (b) de  $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  de NAC. Velocidade de varredura:  $100\text{ mV s}^{-1}$ .

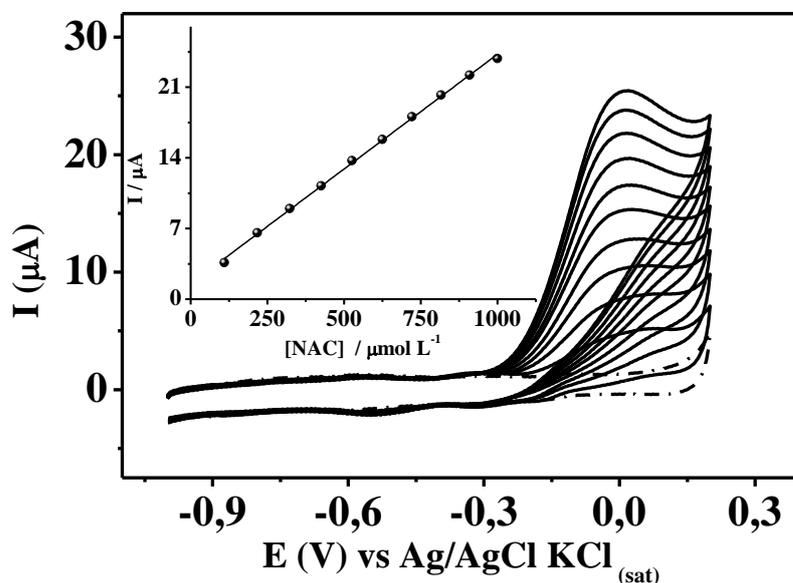
Um comportamento diferente foi observado nos experimentos usando eletrodos modificados com CoPc. Na ausência de NAC (Figura 11c), observa-se apenas o par de picos relacionados ao processo redox Co(II)Pc/Co(I)Pc, enquanto que na presença de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC (Figura 11d) um intenso pico anódico irreversível foi observado em 0,04 V (*vs* ECS), ilustrando dessa forma a forte natureza eletrocatalítica do filme para oxidação deste composto. Além disso, a elevada corrente registrada nesse experimento ( $130 \text{ mA mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) também demonstra a forte catálise induzida pelo filme da ftalocianina.

Outros experimentos foram conduzidos em diferentes concentrações de NAC e confirmaram a boa resposta do eletrodo modificado para eletro-oxidação desse composto e os resultados obtidos são apresentados na Figura 12. A partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 12 foi possível estabelecer uma relação linear entre a corrente de pico de oxidação em função da concentração de NAC, no intervalo de 109 a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Estes resultados demonstram que a voltametria cíclica pode ser satisfatoriamente aplicada para quantificação de NAC em amostras que não demandem baixos níveis de concentração, como no caso dos produtos farmacêuticos. Além disso, esses experimentos também demonstraram que o eletrodo modificado não é afetado pelos produtos da oxidação da NAC, pois as áreas relativas aos picos redox Co(II)Pc/Co(I)Pc não sofreram quaisquer alterações após a execução de vários voltamogramas e durante a execução desses experimentos.

#### ***4.1.3 Análise por injeção em fluxo da NAC***

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores sugerem que o eletrodo modificado com CoPc pode ser usado em um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica para determinação de NAC. Para avaliar esta nova possibilidade, uma célula em fluxo do tipo “*wall-jet*” (Figura 8A) foi confeccionada e aplicada em um sistema de fluxo

de linha única. Uma solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi usada como solução transportadora nos estudos em FIA.



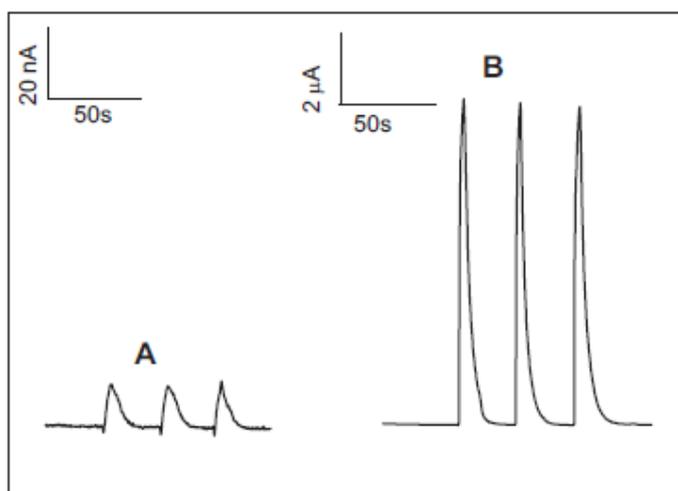
**Figura 12:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de grafite modificado com CoPc em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH saturada com  $\text{N}_2$ , contendo NAC na faixa de concentração de  $109$  a  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Equação da reta:  $I_p = 0,023 (\pm 2,73 \times 10^{-4}) C_{\text{NAC}} + 1,53 (\pm 0,173)$

A resposta do eletrodo modificado foi avaliada em condições hidrodinâmicas no sistema de análise por injeção em fluxo e os sinais transientes obtidos foram comparados com aqueles obtidos com o eletrodo não modificado.

A Figura 13 compara as respostas para três medidas de uma solução contendo  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NAC obtidas com eletrodo não modificado e um eletrodo modificado com CoPc. A primeira série de experimentos (Figura 13A) foi obtida com o eletrodo de grafite pirolítico não modificado. A linha base apresentou uma alta estabilidade e o ruído foi estimado como sendo da ordem de  $2 \text{ nA}$ . Picos reproduzíveis foram obtidos, e com base nos estudos de voltametria cíclica, estes sinais analíticos deveriam ser esperados neste potencial.

O aparecimento do pico de oxidação do NAC no eletrodo não modificado pode ser atribuído ao processo de oxidação da NAC, que se inicia em potenciais muito próximos a 0,0 V.

Uma série similar de experimentos foram realizados usando o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc (Figura 13B). Diferentemente do experimento anterior, essa nova série de injeções de uma solução contendo  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC produziram picos de intensidade elevada ( $\approx 10 \text{ } \mu\text{A}$ ). É importante destacar a diferença na escala para as duas series de experimentos da Figura 13 que foi ajustada para garantir uma visualização dos sinais menores. As correntes registradas com o eletrodo modificado foram da ordem de 700 vezes maiores quando comparadas com aquelas obtidas com o eletrodo limpo. Uma frequência analítica de 180 análises por hora pode ser estimada. Esta alta frequência analítica está diretamente associada com a geometria da célula de fluxo do tipo “*wall-jet*” que garante uma rápida lavagem do eletrodo fazendo com que o sinal de corrente retorne para linha base (background) em menos de 20 segundos.



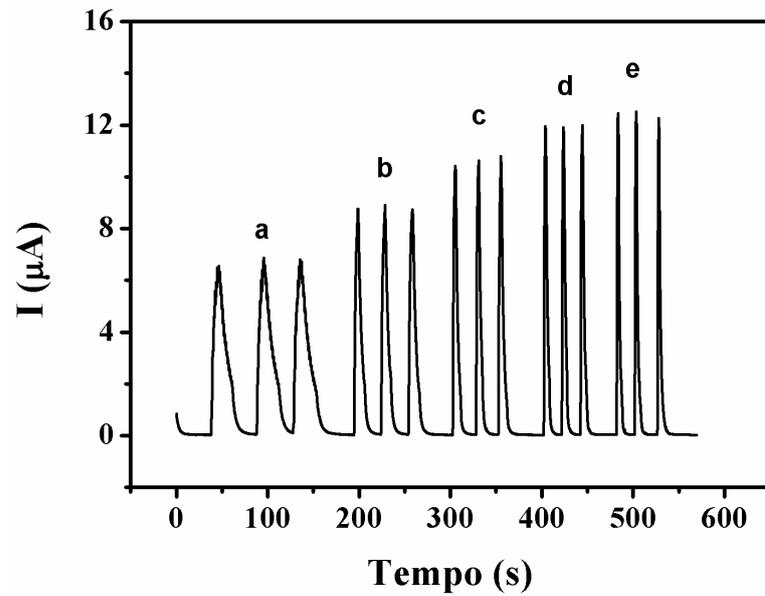
**Figura 13:** Sinais FIA para NAC usando um eletrodo de grafite pirolítico limpo (A) e modificado com CoPc (B). Cada pico corresponde à injeção de  $150 \text{ } \mu\text{L}$  de solução  $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NAC. Vazão:  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; potencial:  $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl KCl}_{(\text{Sat})}$

Alguns parâmetros como percurso analítico, vazão, volume de amostra injetada bem como a distância entre detector e a entrada do fluxo foram avaliados para se estabelecer as melhores condições de análise no sistema FIA. Para esses estudos foi utilizada uma solução de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH contendo  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC, com a corrente sendo monitorada no potencial de  $0,0 \text{ V}$  (*vs* Ag/AgCl KCl<sub>sat</sub>) que corresponde ao potencial de pico extraído dos experimentos voltamétricos.

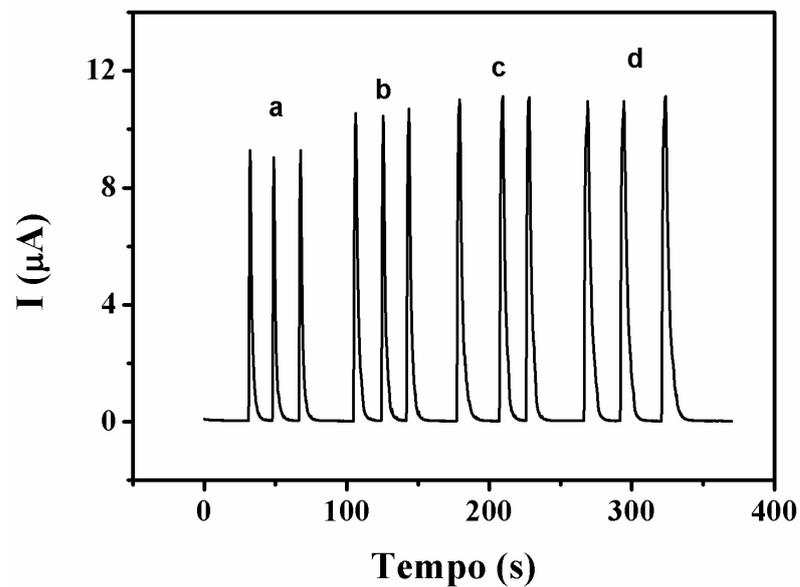
A distância entre o ponto de injeção e o ponto de detecção foi avaliada para três diferentes tamanhos de percurso analítico correspondendo a 15, 20 e 30 cm. Quanto menor o percurso, analítico menos pronunciado será o efeito de dispersão da amostra e, com isso, são obtidos melhores sinais analíticos. Apesar deste parâmetro não apresentar um efeito significativo no sinal analítico, optou-se por adotar o percurso analítico de 15 cm nos experimentos posteriores.

A influência da vazão foi avaliada no intervalo de  $0,5$  a  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Os resultados são apresentados na Figura 14. Para as vazões menores, picos de baixa intensidade e largos foram obtidos, resultando em maiores tempos para o sinal analítico retornar para a linha base. No entanto, vazões no intervalo de  $2,0$  a  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  resultaram em picos muito similares. Uma vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  foi selecionada para os testes seguintes devido ao bom tempo de resposta, consumo moderado da solução transportadora e alta frequência analítica.

O efeito do volume injetado na resposta analítica foi avaliado no intervalo de  $25$  a  $100 \mu\text{L}$ . Na Figura 15 são apresentados os resultados desse estudo. Verificou-se que o sinal analítico teve um aumento significativo até o valor de  $75 \mu\text{L}$ , permanecendo quase constante para volumes maiores. O volume de  $75 \mu\text{L}$  foi mantido para os experimentos posteriores desde que esses resultados representaram um bom compromisso entre a magnitude do sinal e a frequência analítica.



**Figura 14:** Influência da vazão da solução carregadora sobre a corrente de pico de NAC. Concentração de NAC –  $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Condições do FIA: vazão – (a) 0,5 (b) 1,0 (c) 1,5 (d) 2,0 e (e)  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume de amostra –  $75 \mu\text{L}$ ; percurso –  $15 \text{ cm}$ ; solução transportadora –  $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 15:** Influência do volume da alça de amostragem sobre a corrente de pico de NAC. Concentração de NAC –  $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; Condições do FIA: vazão –  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; Volumes de amostra – (a) 25 (b) 50 (c) 75 (d)  $100 \mu\text{L}$ ; percurso –  $15 \text{ cm}$ ; solução transportadora –  $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .

A Tabela 6 sumariza os parâmetros avaliados e selecionados para a determinação de NAC usando o sistema FIA com detecção eletroquímica usando o eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc.

<b>Tabela 6: Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Faixa estudada</b>	<b>Valor selecionado</b>
Percurso analítico (cm)	15 – 30	15
Volume alça ( $\mu\text{L}$ )	25 – 100	75
Vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,5 – 2,5	2,0

Nas condições descritas acima, uma solução contendo  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC foi injetada 13 vezes no sistema FIA resultando em desvio padrão relativo de 1,1%. O sinal analítico apresentou uma relação linear no intervalo de concentração de NAC compreendendo  $5,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação melhor que 0,999.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base na relação sinal-ruído ( $S_b/m$ ) usando respectivamente as expressões  $3 \times S_b/m$  e  $10 \times S_b/m$  (onde  $S_b$  é o desvio padrão para o sinal do branco e  $m$  corresponde a inclinação da curva analítica), sendo obtidos os valores de  $9,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de NAC, respectivamente.

Algumas características analíticas para determinação de NAC são descritas na Tabela 7 que também apresenta informações de métodos eletroanalíticos da literatura. Comparando o método usando voltametria cíclica (63) com o método proposto neste trabalho, este último apresentou limite de detecção 10 vezes menor. Apesar dos demais métodos da literatura (44-60-62) apresentarem melhores limites de detecção e sensibilidade, do que o método

amperométrico proposto, este último possui um nível de automatização que é compatível com as necessidades do controle de qualidade na indústria farmacêutica.

**Tabela 7: Comparação das características analíticas para determinação de NAC pelo método proposto com métodos eletroanalíticos da literatura.**

<i>Método</i>	<i>Eletrodo</i>	<i>Eletrólito</i>	<i>Faixa linear</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>Sensibilidade</i> ( $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>LD</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>Ref.</i>
VOQ.	PC/NCPM/EF	fosfato pH 7,0	0,2 – 35 35 – 400	1,33 0,22	0,08	<b>(60)</b>
VOQ	CV/NC/BFT	Fosfato pH 8,0	0,1 – 600	0,17	0,06	<b>(61)</b>
VOQ	PC/NCPM/VF	Fosfato pH 7,0	0,1 – 662	0,42	0,09	<b>(62)</b>
VPD	PC/NC/F	Fosfato pH 9,0	1,0 – 400	0,006	0,6	<b>(44)</b>
VC	PC/NPF(II)	0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl	920 – 20.000	0,027	190	<b>(63)</b>
VC	GP/CoPc	0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH	100 – 1000	0,023	20	<b>Este trabalho</b>
FIA-DA	GP/CoPc	0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH	50 – 1000	0,035	3,0	<b>Este trabalho</b>

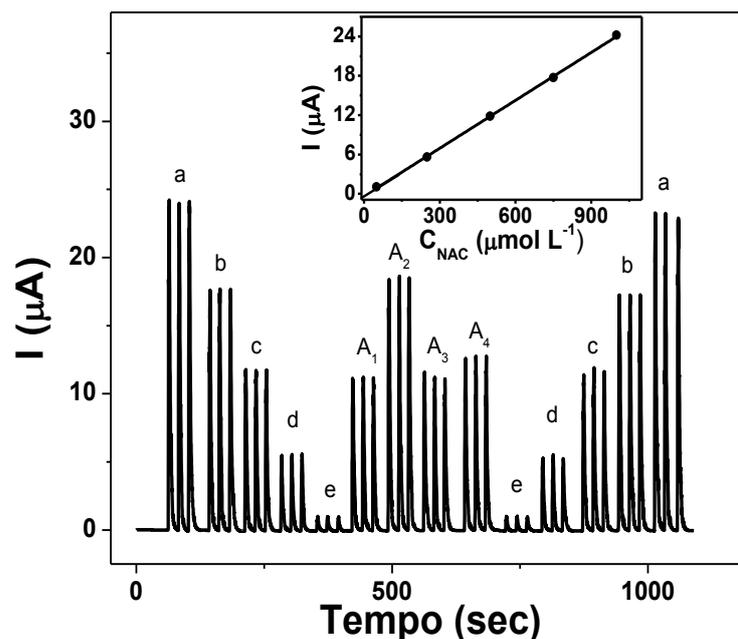
**LD:** Limite de Detecção; **VOQ.:** Voltametria de Onda Quadrada; **PC:** Pasta de carbono; **NCPM:** Nanotubos de Carbono de Parede Múltiplas; **EF:** Etenilferroceno; **CV:** Carbono vítreo; **NC:** Nanotubos de Carbono; **BFT:** 1-benzil-4-ferrocenil-1H-(1,2,3)-triazol; **VF:** Etenilferroceno; **VPD:** Voltametria de Pulso Diferencial; **VC:** Voltametria Cíclica; **NPF(II):** Nitroprussiato de Ferro(II); **F:** Ferroceno; **FIA-A:** Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica; **GP:** Grafite Pirofítico; **CoPc:** Ftalocianina de Cobalto.

#### 4.1.4 Aplicação analítica

Depois de selecionar as condições ótimas de análise, o desempenho do sensor foi avaliado para a determinação direta de NAC em formulações farmacêuticas comerciais líquidas e sólidas usando o método proposto, que combina a análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica.

Uma série de soluções padrão com diferentes concentrações (0,05; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mmol L<sup>-1</sup>) foram injetadas no sistema FIA. O sinal analítico apresentou uma dependência linear nesse intervalo de concentração sendo os resultados descritos pela seguinte equação:  $I(\mu\text{A}) = 0,035 (\pm 3,34 \times 10^{-4}) \times C_{\text{NAC}} - 0,171 (\pm 0,157)$  onde  $y$  é a altura de pico e  $C_{\text{NAC}}$  corresponde a concentração de NAC em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O coeficiente de correlação obtido foi sempre superior a 0,999.

A Figura 16 apresenta uma série de sinais amperométricos para injeção sequencial em triplicata, para as cinco soluções padrão (a-e) descritas anteriormente, e para quatro amostras farmacêuticas (A<sub>1</sub> a A<sub>4</sub>) seguidas por uma nova série de injeções para a mesma curva de calibração.



**Figura 16:** Sinais amperométricos obtidos no sistema FIA com detecção amperométrica para análise do conteúdo de NAC em formulações farmacêuticas. A análise das amostras (A<sub>1</sub> a A<sub>4</sub>) foram acompanhadas pela injeção de uma série de soluções padrão (antes e depois) contendo (a) 1,00, (b) 0,75, (c) 0,50, (d) 0,25, (e)  $0,05 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  NAC. Experimentos realizados em 0,0 V (*vs* Ag/AgCl KCl<sub>sat</sub>), com vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de amostra de  $75 \text{ µL}$ .

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos usando o método oficial (5), o método proposto e o valor de rótulo do medicamento. A avaliação estatística mostrou que os resultados obtidos tanto pelo método oficial descrito na farmacopéia que é baseado na titulação iodimétrica, são concordantes com os obtidos pelo método proposto em um nível de confiança de 95% (teste t-Student). Entre as vantagens do novo método podem ser destacados; a alta frequência de análise, baixo consumo de reagentes, pequena geração de resíduos químicos e simples operação.

**Tabela 8: Determinação do NAC em amostras farmacêuticas usando o método proposto e o método oficial, descrito na Farmacopéia Brasileira (5).**

NAC (mg)	Rotulado	FIA *	Padrão *	$Er_1$ (%)	$Er_2$ (%)
Fluimiucil <sup>a</sup>	300,0	293,9 ± 6,75	303,5 ± 4,9	-2,0	-3,2
Aires <sup>b</sup>	100,0	103,0 ± 3,3	102,37 ± 1,9	3,0	0,7
União Química <sup>a</sup>	300,0	290,6 ± 0,5	308,5 ± 2,5	-3,1	-5,8
Germed <sup>b</sup>	600,0	587,3 ± 5,8	603,0 ± 1,2	-2,1	-2,6

n = 3

$Er_1$  (Erro relativo - FIA vs valor rotulado)

$Er_2$  (erro relativo - FIA vs método oficial)

\*Média para três determinações ± SD.

<sup>a</sup> mg *N*-acetil cisteína por ampola.

<sup>b</sup> mg *N*-acetil cisteína por sachê.

#### 4.1.5 Estudos de interferentes e recuperação

Além da comparação com o método oficial, testes de adição e recuperação também foram realizados para avaliar a exatidão do novo procedimento. Nesses experimentos foram preparadas três diferentes amostras, e contaminadas com solução de NAC padrão, e a nova composição foi analisada. Em todos os casos, recuperações no intervalo de 96 a 101% foram obtidas, o que indica que o método proposto apresenta exatidão adequada para determinação de NAC em amostras farmacêuticas.

A influência de alguns compostos que estão presentes nos produtos farmacêuticos dentre eles EDTA, sacarose e ácido cítrico, foram investigados usando as condições previamente descritas. Estes testes consistiram no preparo de soluções contendo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$

de NAC nas quais foram adicionados os compostos interferentes até a concentração 50 vezes maior que a concentração do NAC. Os resultados destes experimentos são apresentados na Tabela 9.

Foi observado que o EDTA não produziu interferência significativa mesmo em concentrações de 50 vezes maiores que o NAC. Sacarose e ácido cítrico causaram uma interferência positiva menor que 5% no sinal analítico quando a proporção usada entre espécie interferente e NAC foi de 25:1. Vale ressaltar que as proporções das concentrações avaliadas nos estudos de interferentes são bem maiores que as encontradas nas formulações farmacêuticas contendo NAC.

**Tabela 9: Concentrações toleradas de alguns excipientes presentes nas formulações farmacêuticas na determinação de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NAC usando o método proposto.**

<b>INTERFERENTE</b>	<b>Concentração tolerada* (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Erro%</b>
EDTA	$2,50 \times 10^{-3}$	-0,8
Ácido cítrico	$1,25 \times 10^{-3}$	2,1
Sacarose	$1,25 \times 10^{-3}$	3,4

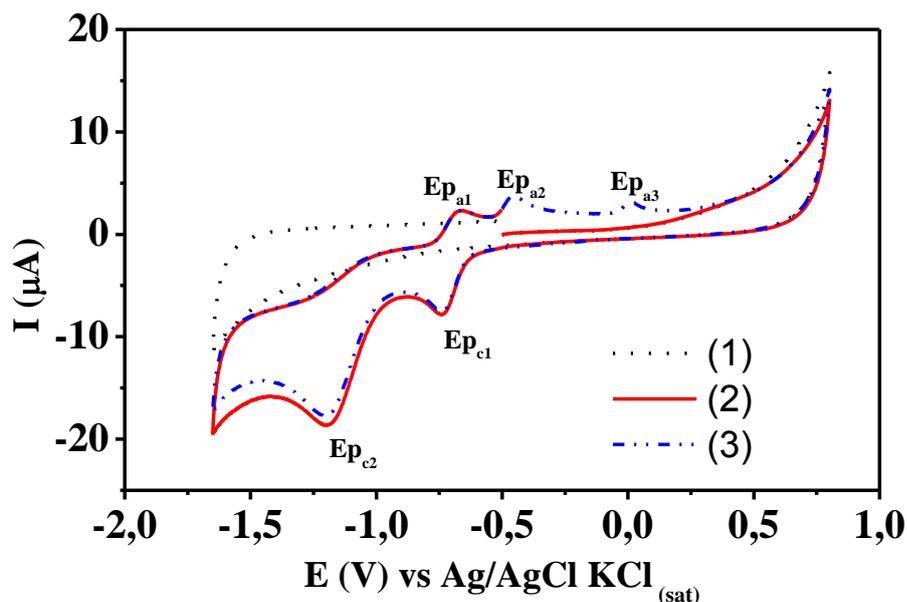
\*Concentração que causa um erro no sinal analítico de até 5%

## 4.2. Determinação voltamétrica de NMS

### 4.2.1 Comportamento eletroquímico da NMS

A voltametria cíclica foi inicialmente utilizada para investigar o comportamento eletroquímico da NMS em eletrodos de carbono vítreo. Estes estudos foram conduzidos em solução de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS, no intervalo de potencial de 0,80 a  $-1,65 \text{ V}$ . A varredura de potencial teve início em  $-0,50 \text{ V}$  e foi realizada no sentido positivo de potenciais até  $0,8 \text{ V}$ . Neste potencial, o sentido de varredura foi invertido seguindo até  $-1,65 \text{ V}$  e retornando para  $0,00 \text{ V}$ . O meio alcalino foi utilizado tendo em vista que a solubilidade do composto em água ultra-pura pH 5,95 é de apenas  $6,08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (89) apresentando um leve aumento de solubilidade quando utilizado um meio misto contendo água e álcool na proporção de 60:40 (159). Nesta última condição a solubilidade é de apenas  $101 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Na Figura 17 são mostrados os voltamogramas cíclicos para o eletrólito suporte (curva pontilhada) e para a primeira (curva vermelha) e segunda varredura (curva azul) obtidos na presença de NMS. Para a primeira varredura seguindo no sentido positivo, não foram observados processos anódicos no intervalo de  $-0,50$  a  $0,80 \text{ V}$ . No entanto, seguindo agora no sentido negativo de potenciais ( $0,80$  a  $-1,65 \text{ V}$ ) observou-se a presença de dois processos catódicos, denominados aqui por **Ep<sub>c1</sub>** e **Ep<sub>c2</sub>**. Retornando no sentido positivo ( $-1,65$  a  $0,80 \text{ V}$ ), constatou-se a presença de apenas 1 pico anódico localizado em **Ep<sub>a1</sub>**. Porém, na segunda varredura além dos picos antes mencionados foi possível identificar ainda mais dois picos anódicos, seguindo o sentido positivo de potenciais, localizados em **Ep<sub>a2</sub>** e **Ep<sub>a3</sub>**.



**Figura 17:** Sinais voltamétricos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (1) e contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS. As curvas (2) e (3) correspondem a primeira e segunda varreduras, respectivamente.  $E_i = -0,5 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 1} = 0,8 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 2} = -0,5 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .

Em linhas gerais, a redução da NMS pode ser compreendida seguindo o modelo já bem estabelecido na literatura que é descrito para os compostos nitroaromáticos (160). Esse processo de redução está relacionado ao grupo nitro presente na estrutura da molécula e possui uma forte dependência da natureza do meio, seguindo diferentes comportamentos de redução. Em meio fortemente alcalino a redução da NMS passa pela formação do nitro radical aniônico, que pode ser identificado pelo par reversível associado aos processos  $\text{Ep}_{c1}$  e  $\text{Ep}_{a1}$ . Seguindo para potenciais mais negativos o nitro radical aniônico é reduzido à correspondente hidroxilamina por um processo envolvendo 3 elétrons e 4 prótons (100). Esses processos podem ser representados pelas equações a seguir:



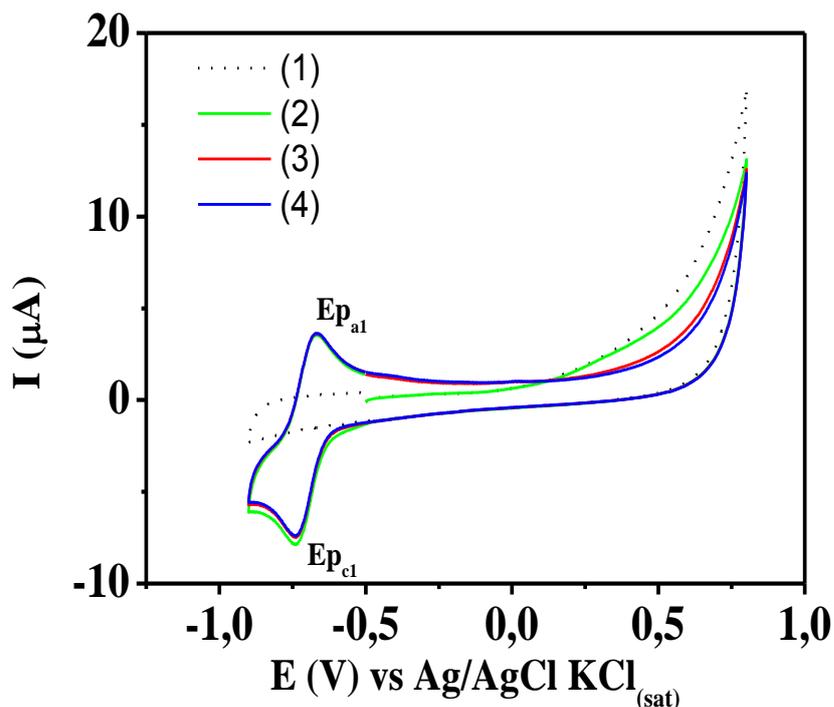
Resultados muito semelhantes foram obtidos por SQUELLA et al. (161) investigando a redução da NMS com auxílio do eletrodo de mercúrio de gota pendente, em tampão Britton-Robinson  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl/etanol (70%/30%) e pH 12. Estes autores identificaram um terceiro pico voltamétrico de redução no potencial de  $-1,04 \text{ V}$  que foi atribuído à formação de um dímero da NMS. No entanto, mesmo trabalhando em condições experimentais muito semelhantes, ou seja, em meio fortemente alcalino, a formação do par redox bem definido, relacionado à  $\mathbf{Ep}_{c1}$  e  $\mathbf{Ep}_{a1}$ , somente foi possível quando os autores utilizaram um meio misto, composto por  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl/DMF na proporção de 40:60, em tampão citrato.

Ainda avaliando a Figura 17 pode-se perceber que começando a varredura em  $-0,5 \text{ V}$  e seguindo no sentido positivo de potenciais, não foi registrado nenhum pico voltamétrico. Os picos anódicos  $\mathbf{Ep}_{a2}$  e  $\mathbf{Ep}_{a3}$  somente foram registrados a partir do segundo voltamograma, e após a inversão do sentido da varredura quando foram atingidos potenciais necessários para o aparecimento do segundo pico de redução em  $\mathbf{Ep}_{c2}$ .

Para avaliar se os picos anódicos localizados em  $\mathbf{Ep}_{a2}$  e  $\mathbf{Ep}_{a3}$  dependem do processo que ocorre em  $\mathbf{Ep}_{c2}$  um novo experimento foi conduzido em condições semelhantes que ao anterior, porém o potencial final no sentido negativo de potenciais foi limitado a  $-0,9 \text{ V}$ .

Analisando a Figura 18 verifica-se que estes processos anódicos não aparecem, evidenciando que os dois picos anódicos ( $\mathbf{Ep}_{a2}$  e  $\mathbf{Ep}_{a3}$ ) são dependentes do processo que está ocorrendo em  $\mathbf{Ep}_{c2}$ .

De acordo com a literatura esses processos estão associados à oxidação da hidroxilamina ao correspondente derivado nitroso ( $\mathbf{Ep}_{a2}$ ) (160, 162, 163) seguido pela oxidação do composto nitroso regenerando o grupo nitro ( $\mathbf{Ep}_{a3}$ ) (164).

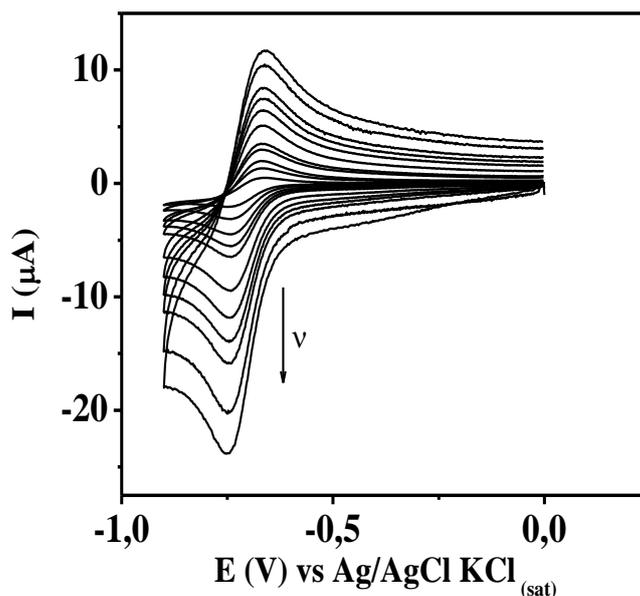


**Figura 18:** Sinais voltamétricos registrados em eletrodo de carbono vítreo em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (1) e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS (2, 3, 4). As curvas (2), (3) e (4) correspondem à primeira, segunda e terceira varreduras, respectivamente.  $E_i = -0,5 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 1} = 0,8 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda 2} = -0,5 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .

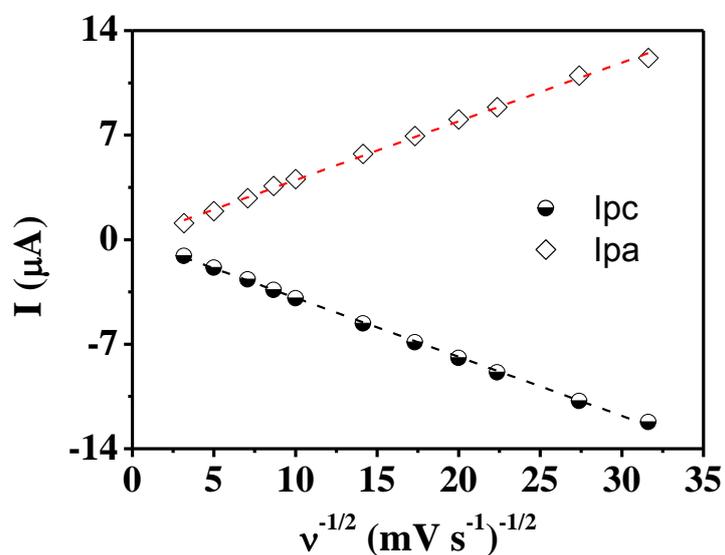
ALVARES-LUEJE et al. (100) realizaram um estudo eletroquímico da NMS em eletrodo de mercúrio e constataram que o processo de redução dessa molécula apresenta um comportamento dependente do pH no intervalo de 2 a 10. Estes autores também verificaram que em meio fortemente alcalino, ou seja, no intervalo de pH entre 10 e 12, o comportamento da redução da NMS torna-se independente do pH.

Os voltamogramas cíclicos da NMS, em meio alcalino, mostrados na Figura 18 apresentaram valores de  $E_{p_{c1}}-E_{p_{a1}}$  de aproximadamente 66 mV. Além disso, a razão entre as correntes anódica e catódica ( $I_{p_{c1}}/I_{p_{a1}}$ ) ficou muito próximo da unidade. De acordo com os critérios de reversibilidade para processos redox (165, 166), esses resultados demonstram que nas condições estudadas, em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e velocidade de varredura  $100 \text{ mV s}^{-1}$  o processo de redução da NMS em eletrodo de carbono vítreo apresenta um comportamento reversível que envolve a formação do nitro radical aniônico e fora anteriormente descrito conforme a Eq. 3.

O comportamento reversível do par redox  $E_{p_{c1}}/E_{p_{a1}}$  foi avaliado em diferentes velocidades de varredura no intervalo de 10 a  $1000 \text{ mV s}^{-1}$ , e os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 19. Nestas condições verificou-se que os potenciais de pico anódico e catódico não sofreram alterações e que para todas as velocidades de varredura a razão entre as correntes anódica e catódica ( $I_{p_{c1}}/I_{p_{a1}}$ ) foram próximas da unidade. Ainda, as correntes de pico para ambos os processos foram proporcionalmente lineares à raiz quadrada da velocidade de varredura demonstrando dessa forma que os processos são controlados por difusão, como fica evidenciado na Figura 20.



**Figura 19:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS em diferentes velocidades de varredura.  $E_i = 0,0 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda I} = -0,9 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $0,01$  a  $1,00 \text{ V s}^{-1}$ .

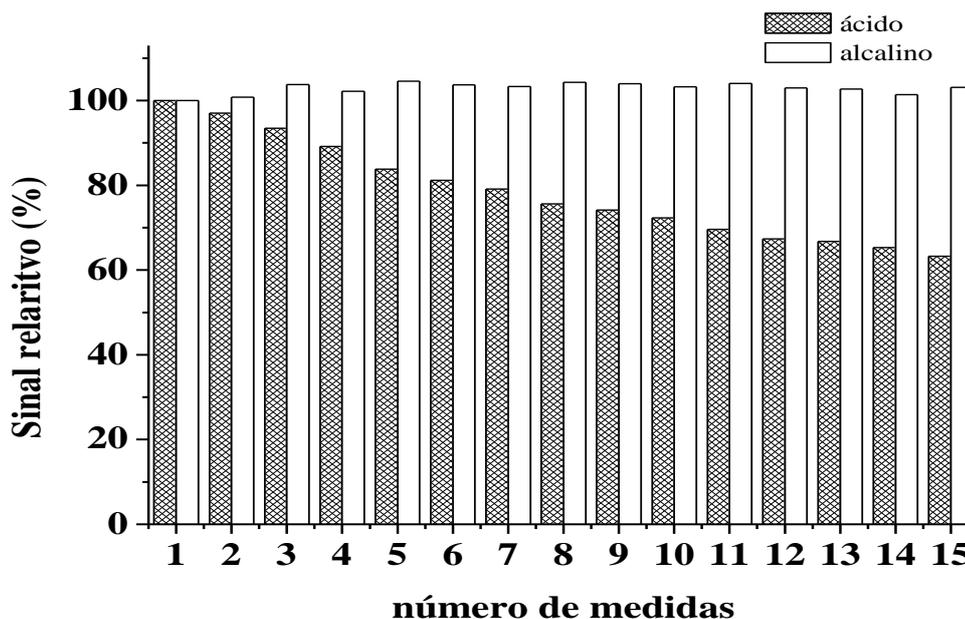


**Figura 20:** Relação entre a corrente pico catódica ( $I_{pc}$ ) e anódica ( $I_{pa}$ ) como função da velocidade de varredura em hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , extraídas da **Figura 19**.

$$I_{pa} = 0,3931 v^{1/2} + 0,0579 \quad (R^2 = 0,9982) \quad (10 \leq v \leq 1000 \text{ mV s}^{-1})$$

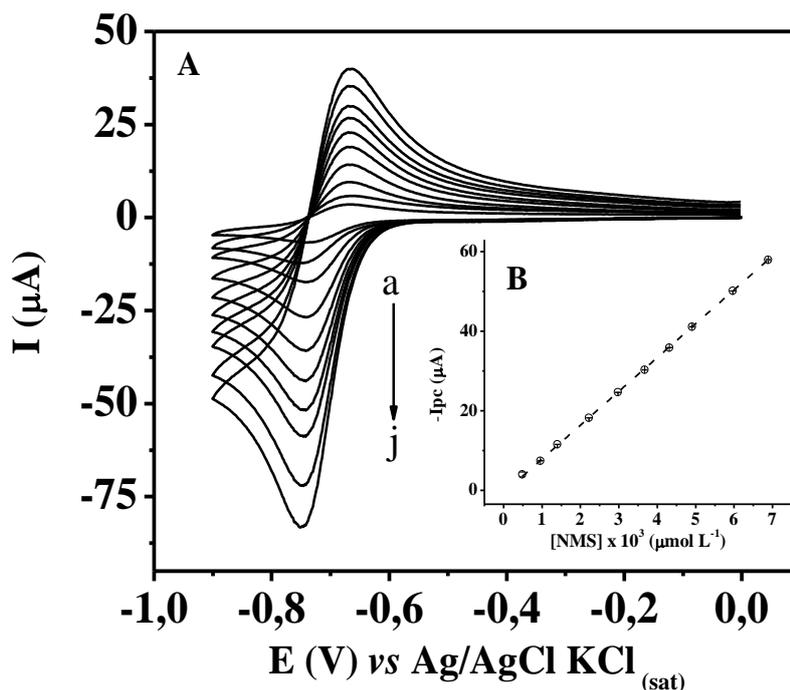
$$I_{pc} = -0,3953 v^{1/2} + 0,0616 \quad (R^2 = 0,9992) \quad (10 \leq v \leq 1000 \text{ mV s}^{-1})$$

Os processos redox em superfícies de carbono geralmente conduzem ao envenenamento da superfície do eletrodo devido à adsorção dos subprodutos gerados dos processos de oxidação ou redução. Com a finalidade de avaliar a estabilidade da resposta do eletrodo de carbono vítreo para a redução de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS, sem que esta provocasse envenenamento do eletrodo, foram realizadas 15 medidas usando voltametria cíclica no intervalo de 0,0 a  $-0,9 \text{ V}$ . Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 21. Considerando o valor de corrente obtido na primeira medida como 100%, os demais sinais foram calculados tendo por base o primeiro sinal. Deste experimento pode ser constatado que em meio ácido os subprodutos da redução da NMS são fortemente adsorvidos na superfície do eletrodo e provocam o rápido envenenamento do mesmo, pois o sinal analítico diminuiu ao longo das medidas devido ao bloqueio da transferência eletrônica provocada pela adsorção dos subprodutos gerados no processo de redução. A queda no sinal analítico para a redução de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS em meio ácido foi de aproximadamente 37%. Dessa forma para a realização de medidas sucessivas torna-se imperativo a renovação da superfície do eletrodo mediante polimento mecânico. Entretanto para as medidas conduzidas em meio alcalino verificou-se que o sinal se mantém estável demonstrando dessa forma que este meio é adequado para a análise de NMS sem a necessidade de ativação da superfície do eletrodo antes de cada medida. Para as 15 medidas o DPR obtido foi de 0,98%. Estes efeitos podem estar relacionados ao processo de redução que no caso do meio ácido segue uma redução direta e em única etapa à hidroxilamina na superfície do eletrodo e que no meio alcalino ocorre via formação do nitro radical aniônico que além de ser um processo reversível é estabilizado em meio alcalino. Esses resultados demonstram possibilidade de elaboração de um método eletroanalítico mais simples para determinação de NMS levando em consideração que não há necessidade de uso de eletrodos modificados.



**Figura 21:** Variação do sinal de redução obtidos por voltametria cíclica para uma solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS. Sinais preenchidos representam as respostas obtidas em tampão BR pH 4,0 – 30% de álcool etílico. Sinais sem preenchimento representam as respostas obtidas em NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura:  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .

A Figura 22A apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de carbono vítreo para adições crescentes de NMS ( $0,5$  a  $6,9 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Para cada concentração foram registrados 3 medidas sendo os sinais obtidos muito reprodutíveis com desvio padrão inferior a 1%. Convém salientar que durante toda a realização destes experimentos (construção da curva de calibração) não foi necessário o polimento da superfície do eletrodo. Com isso, nessas condições, demonstra-se que a superfície do eletrodo não sofre qualquer efeito de envenenamento decorrente dos produtos de redução/oxidação da NMS. A Figura 22B representa a variação da corrente de pico catódica em função da concentração. Uma relação linear foi conseguida para o intervalo de concentrações avaliado, sendo descrita pela seguinte equação:  $I_{pc} (\mu\text{A}) = - 0,633 + 0,00851 \cdot C_{\text{NIM}}$ , ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com coeficiente de correlação igual a 0,9997.



**Figura 22:** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo de  $0,5$  a  $6,9 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $a - j$ ) de NMS.  $E_i = 0,0 \text{ V}$ ;  $E_{\lambda l} = -0,9 \text{ V}$ ; Velocidade de varredura =  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .  $I_{pc} (\mu\text{A}) = -0,633 + 0,00851 \cdot C_{\text{NIM}}$ , ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

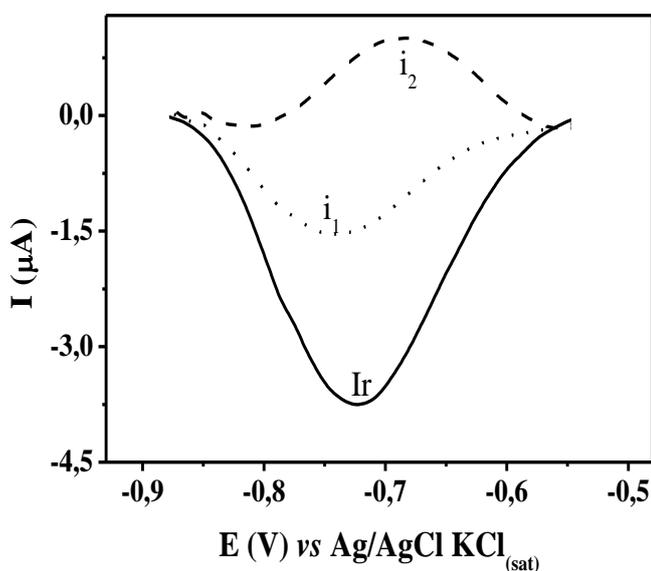
#### 4.2.2 Voltametria de onda quadrada

Outra forma de avaliar o comportamento redox para um determinado sistema pode ser mediante o emprego da voltametria de onda quadrada. Isto se deve às características inerentes da técnica visto que a corrente resultante obtida representa a diferença entre suas componentes de corrente na varredura direta e reversa que, em outras palavras, correspondem aos processos de oxidação e redução para o sistema em investigação.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos em eletrodo de carbono vítreo confirmaram o comportamento reversível da NMS (Figura 23), verificado previamente pela voltametria cíclica, observando-se o primeiro pico de redução em  $-0,70 \text{ V}$  em  $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como observado na Figura 23, dois picos bem definidos foram obtidos, um durante a aplicação do pulso no sentido direto (pico catódico,  $i_1$ ), sendo o outro correspondente ao pulso no sentido inverso (pico anódico,  $i_2$ ). A corrente resultante, que corresponde à somatória dos dois processos está representada na Figura 23.

Explorando o comportamento reversível para o processo de redução da NMS associado com a formação do nitro radical aniônico foi proposto a elaboração de um método analítico para quantificação deste fármaco em amostras de interesse farmacêutico.



**Figura 23:** Voltamograma de onda quadrada obtido em eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo de  $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS; Parâmetros da VOQ:  $f = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

#### 4.2.1.1 Otimização dos parâmetros

O pico catódico obtido por voltametria de onda quadrada depende de diversos parâmetros instrumentais da técnica eletroanalítica, tais como: frequência da onda quadrada ( $f$ ), incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) e amplitude da onda quadrada ( $a$ ). Esses parâmetros são

interconectados apresentando um efeito combinado sobre a resposta do pico. A influência desses parâmetros sobre a resposta de corrente de pico foi avaliada para uma solução  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de NMS em NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

A corrente de pico apresentou um aumento na linha base com o aumento da frequência aplicada. O valor de frequência de  $50 \text{ Hz}$  foi selecionado por fornecer uma melhor estabilidade da linha base e definição do pico de corrente.

A amplitude ( $a$ ) é outro parâmetro que influencia fortemente a corrente de pico na voltametria de onda quadrada. Os resultados obtidos mostraram que a corrente de pico varia linearmente com a amplitude até  $60 \text{ mV}$ , e atinge um patamar constante para valores de amplitude superiores. Dessa forma, esse valor foi selecionado como parâmetro ótimo e usado nos experimentos posteriores e, conseqüentemente, para a aplicação analítica que será descrita mais adiante.

Na voltametria de onda quadrada, a variação efetiva da velocidade de varredura é o produto entre a frequência ( $f$ ) e o incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ). Este parâmetro também favorece um aumento no sinal analítico e na sensibilidade da técnica (167, 168). Entretanto, incrementos de pulso ( $\Delta E_s$ ) maiores podem favorecer o alargamento do pico, o que diminui a resolução da análise, necessitando a otimização deste parâmetro.

Neste estudo o incremento foi avaliado no intervalo de  $1$  a  $10 \text{ mV}$ , apresentando apenas um leve aumento na corrente. Por essa razão, e para atender aos propósitos analíticos, o valor de incremento de  $2 \text{ mV}$  foi selecionado como parâmetro ótimo.

Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros estudados e os valores que produziram as melhores respostas para a determinação de NMS em meio alcalino.

Tabela 10: Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada para obtenção da melhor resposta na determinação de NMS

Parâmetro	Intervalo estudado	Valor selecionado
Frequência ( $f$ )	10 – 140 Hz	50 Hz
Amplitude ( $a$ )	10 – 100 mV	60 mV
Incremento ( $\Delta E_s$ )	1 – 10 mV	2 mV

#### 4.2.3 Estudo de interferentes e recuperação

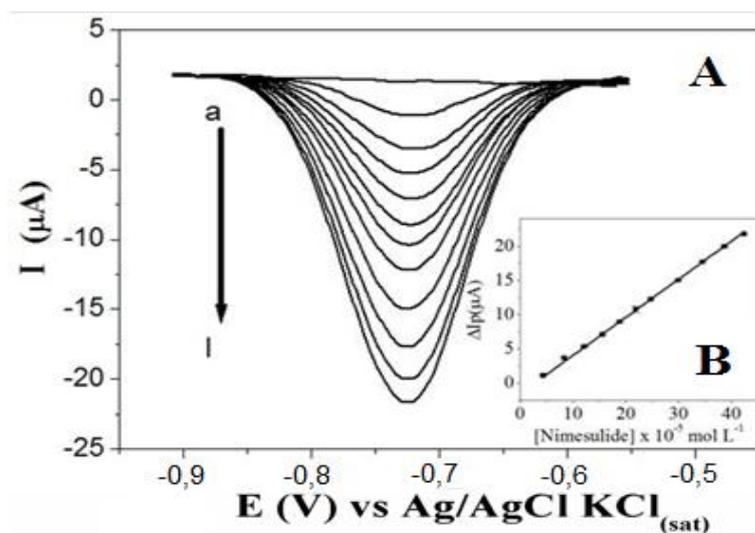
O efeito de algumas espécies, como estearato de magnésio, lactose e amido (excipientes da amostra) foi investigado na determinação da NMS. Os testes demonstraram que essas espécies não são eletroativas nas condições analisadas e, portanto, não interferem na quantificação de NMS. Testes de adição e recuperação também foram realizados nos produtos farmacêuticos e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11. Conforme observado nesta tabela, os valores de recuperação variaram entre 96 a 102% para o método proposto, demonstrando assim exatidão adequada para o novo procedimento. É importante observar que as espécies concomitantes contidas na amostra não causaram qualquer interferência de matriz para as amostras analisadas através do método proposto.

**Tabela 11: Resultados de recuperação para adições de solução padrão de NMS em duas amostras farmacêuticas.**

Amostra	NMS (mg/comprimido)		Recuperação%
	Adicionado	Encontrado	
A	6,50	6,56 ± 0,07	101
	15,50	15,65 ± 0,08	101
	25,50	26,10 ± 0,08	102
B	6,50	6,27 ± 0,06	96,5
	15,50	15,17 ± 0,06	97,9
	25,50	25,21 ± 0,04	98,9

#### **4.2.4 Curva analítica e precisão**

Voltamogramas para diferentes concentrações de NMS foram obtidos nas condições ótimas de análise conforme Tabela 10. A Figura 24 apresenta a curva analítica obtida nas condições ótimas para o procedimento proposto, onde a corrente de pico catódica no eletrodo de carbono vítreo não modificado foi proporcional à concentração de NMS no intervalo de  $4,3 \times 10^{-5}$  a  $4,2 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção (considerando a relação  $3 \times S_b/m$ ) de  $3,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida nessas condições foi:  $(\Delta I_{pa}/A) = -1,53 \times 10^{-6} (\pm 5,04 \times 10^{-8}) + 0,055 (\pm 1,52 \times 10^{-4}) \times C_{NIM}$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,9999$  ( $n = 11$ ). A curva de calibração foi feita em triplicata.



**Figura 24:** Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (a) e na presença de NMS: (b)  $4,35 \times 10^{-5}$ ; (c)  $8,37 \times 10^{-5}$ ; (d)  $1,21 \times 10^{-4}$ ; (e)  $1,56 \times 10^{-4}$ ; (f)  $1,88 \times 10^{-4}$ ; (g)  $2,19 \times 10^{-4}$ ; (h)  $2,47 \times 10^{-4}$ ; (i)  $2,99 \times 10^{-4}$ ; (j)  $3,45 \times 10^{-4}$ ; (k)  $3,86 \times 10^{-4}$ ; (l)  $4,24 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; parâmetros da onda quadrada:  $f = 50 \text{ Hz}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ; (B) curva analítica correspondente:  $\Delta I_{pa} (\text{A}) = -1,53 \times 10^{-6} (\pm 5,04 \times 10^{-8}) + 0,055 (\pm 1,52 \times 10^{-4}) \times C_{\text{NIM}} (\mu\text{mol L}^{-1})$ .

A precisão do método foi avaliada em um mesmo dia de análise por sucessivas medidas voltamétricas ( $n = 10$ ) em solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NMS, sem a necessidade de renovação da superfície do eletrodo. Os resultados para esta série de medidas foram avaliados e o desvio padrão calculado foi somente 1,24%, sugerindo que, nessas condições, o eletrodo apresentou uma resposta estável, além de não sofrer qualquer efeito de envenenamento.

A Tabela 12 ilustra algumas características analíticas para determinação de NMS comparando o método proposto com alguns métodos eletroanalíticos da literatura. Analisando os dados da referida tabela, os métodos que apresentam os menores limites de detecção possuem intervalo linear estreito, e requerem procedimento prévio de modificação do eletrodo. Os métodos propostos, usando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada apresentam características

muito similares aos demais, porém a metodologia analítica aqui desenvolvida é mais simples, o eletrodo de carbono vítreo não necessita de modificação e nem de polimento entre as medidas.

**Tabela 12: Comparação das características analíticas para determinação de NMS pelo método proposto com métodos eletroanalíticos da literatura.**

<i>Método</i>	<i>Eletrodo</i>	<i>Eletrólito</i>	<i>Faixa linear</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>Sensib.</i> ( $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>LD</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>Ref.</i>
VPD	EGM	Etanol:TP-BR (30:70) pH 8,0	50 – 500	0,115	2,5	<b>(100)</b>
FIA-DA	CV	Etanol:TP-BR (30:70) pH 6,1	5,0 – 300	0,003	3,1	<b>(101)</b>
VRAAd	EGPM	0,012 mol L <sup>-1</sup> acetato de amônio	0,003 – 0,385	0,678	0,003	<b>(102)</b>
Potencio.	PVC/NMS/AMF	-	1,0 – 10000	-	0,32	<b>(103)</b>
VPD	CV/NC/AC	0,05 mol L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 – 10	1,712	0,05	<b>(104)</b>
VVL	CV/NCPM	Fosfato pH 6,6	0,32 – 65	-	0,16	<b>(105)</b>
VPD	CV/NpCSi	Fosfato pH 2,0	0,09 – 8,7	0,512	0,003	<b>(107)</b>
VVLAd	CV	Etanol:TP-BR (10:90) pH 5,3	0,4 – 50	0,308	0,032	<b>(108)</b>
VPD	PC	Fosfato pH 7,0	0,5 – 10	1,64	0,008	<b>(109)</b>
VC	CV	1,0 mol L <sup>-1</sup> NaOH	500 – 6900	0,0085	26,5	<b>Este trabalho</b>
VOQ	CV	1,0 mol L <sup>-1</sup> NaOH	43 - 420	0,055	3,2	<b>Este trabalho</b>

**LD:** Limite de Detecção; **VPD:** Voltametria de Pulso Diferencial; **FIA-DA:** Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica; **VRAAd:** Voltametria de Redissolução Anódica Adsortiva; **Potencio.:** Potenciométrico; **VVL:** Voltametria de Varredura Linear; **VVLAd:** Voltametria de Varredura Linear Adsortiva; **VC:** Voltametria Cíclica; **VOQ.:** Voltametria de Onda Quadrada; **EGM:** Eletrodo Gotejante de Mercúrio; **CV:** Carbono Vítreo; **EGPM:** Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio; **NC:** Nanotubos de Carbono; **AC:** Ácido Cisteico; **NCPM:** Nanotubos de Carbono de Parede Múltiplas; **NpCSi:** Nanopartículas de Carbetto de Silício; **PC:** Pasta de carbono; **TP-BR:** – Tampão Britton-Robinson.

#### 4.2.5 Aplicação analítica

O método proposto foi aplicado para a determinação de NMS em amostras comerciais de medicamentos e os resultados obtidos foram comparados com o valor tabelado bem como com os resultados obtidos usando método oficial (espectrofotométrico) descrito na Farmacopéia (5). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13. A avaliação estatística dos resultados demonstrou exatidão elevada para o método proposto.

De acordo com o teste-t de Student ( $t_{\text{exp}} = 1,786 < t_{\text{tab}} = 2,571$ ), não existe diferença significativa entre os resultados obtidos por ambos os procedimentos em um nível de confiança de 95%, indicando que o método voltamétrico pode ser aplicado para determinação de NMS em amostras farmacêuticas.

**Tabela 13: Resultados obtidos para determinação de NMS em amostras farmacêuticas pelo método oficial (5) e usando o método voltamétrico proposto.**

Amostra	NMS (mg/comprimido)			Erro relativo %	
	rotulado	Oficial*	VOQ	$E_{r1}\%$	$E_{r2}\%$
A	100,0	103,5 ± 1,7	102,2 ± 1,8	2,19	1,30
B	100,0	99,7 ± 1,6	96,7 ± 1,7	-3,29	3,05

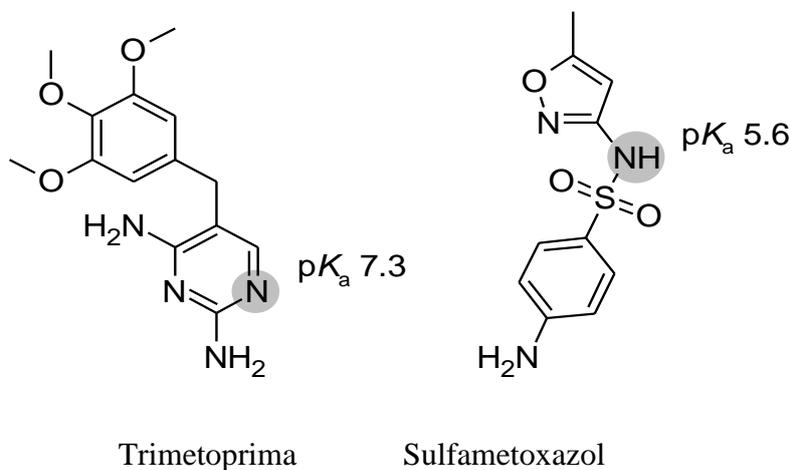
$n = 3$ ; média ± SD; \*Método oficial: espectrofotometria UV-VIS, recomendado pela farmacopéia brasileira (5);

$E_{r1}$  = diferença entre o método VOQ e o valor rotulado;

$E_{r2}$  = diferença entre o método VOQ e o método oficial

### 4.3. Determinação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) por eletroforese capilar

A Figura 25 apresenta as fórmulas estruturais planas para a TMP e para o SMX, indicando ainda seus respectivos valores de  $pK_a$ . O nitrogênio na posição 3 do grupo pirimidínico permite que a TMP esteja na sua forma protonada em meio neutro tendendo a ácido, tornando-se dessa forma uma espécie catiônica. Entretanto, em valores baixos de pH a dissociação do hidrogênio no grupo sulfonamida do SMX é favorecida apresentando, desta forma, uma mobilidade eletroforética como ânion. Assim, existe um intervalo de pH em que ambas as espécies migram e podem ser separadas por eletroforese.



**Figura 25:** Estruturas químicas para a TMP e o SMX, com os valores de  $pK_a$  de equilíbrio correspondendo a  $\equiv\text{NH}^+ \rightleftharpoons \equiv\text{N} + \text{H}^+$  e  $=\text{NH} \rightleftharpoons =\text{N}^- + \text{H}^+$ , respectivamente. Valores de  $pK_a$  extraídos da referência (117)

Levando em consideração a formação de uma espécie aniônica e outra catiônica em uma determinada condição, a migração desses analitos irá ocorrer em diferentes direções.

Entretanto, o efeito observado é que ambas as espécies movem-se para a mesma direção do detector devido à existência do fluxo eletro-osmótico (EOF, do inglês, “*Electroosmotic Flow*”).

Por essa razão, a escolha do eletrólito de corrida em eletroforese capilar é um parâmetro muito importante e deve estar diretamente associado ao sistema de detecção utilizado. A sensibilidade do detector de condutividade para íons monocarregados em eletroforese pode ser predito pela expressão abaixo (169, 170):

$$\frac{d\kappa}{dc_a} = \frac{(\mu_a - \mu_s)(\mu_a + \mu_o)}{\mu_a} F \quad \text{Eq. 5}$$

Onde  $\mu_a$ ,  $\mu_s$ , e  $\mu_o$  são, respectivamente, as mobilidades do analito, dos seus co-íon e contra-íon no eletrólito de corrida, e F é a constante de Faraday. Uma avaliação mais próxima desta equação revela duas tendências importantes: (1) quanto maior a diferença de mobilidade entre o analito e seu co-íon, maior será a sensibilidade; (2) o pico pode ser positivo ou negativo dependendo da magnitude das mobilidades desses íons. Além desses efeitos decorrentes da equação, outra regra importante que advém dos preceitos da teoria é que quanto menor a condutividade do eletrólito de corrida, menor será o ruído instrumental.

Com base nos argumentos anteriores, para os nossos propósitos analíticos e objetivando o desenvolvimento de uma metodologia que combinasse características como velocidade analítica e alta sensibilidade, o eletrólito de corrida utilizado nesse trabalho consistiu de uma solução tampão fosfato de lítio 10 mmol L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 7,1.

Dessa forma foi possível garantir o bom compromisso entre a mobilidade do EOF e a elevada sensibilidade.

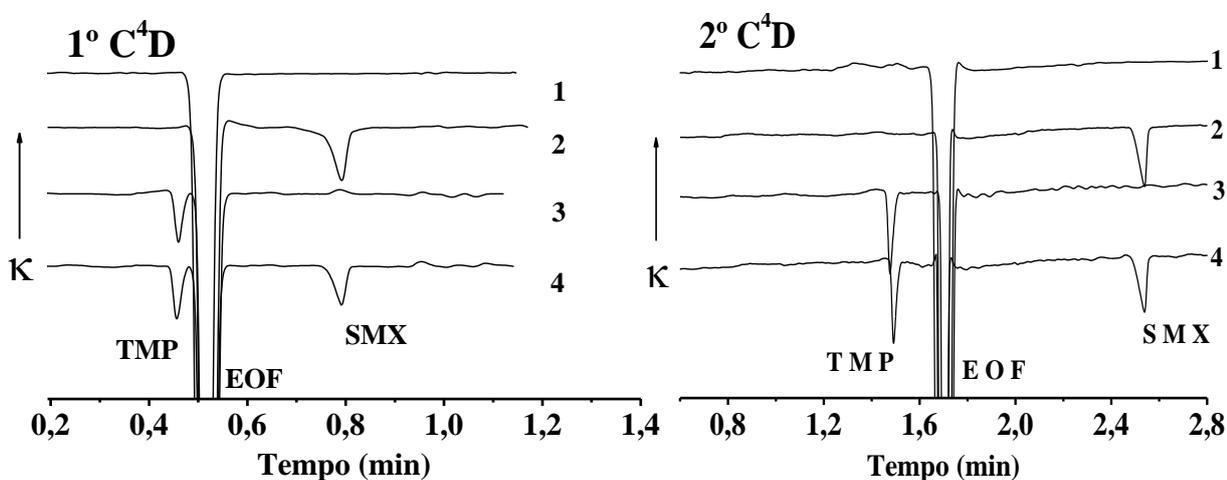
Utilizando o programa CurTiPot (171) para elaboração de curvas de distribuição das espécies em função do pH, e usando os valores de  $pK_a$  do SMX e da TMP (extraídos das Tabela 3 e Tabela 4) obteve-se distribuições maiores que 95% para o SMX na sua forma aniônica e superiores a 57% para a TMP na sua forma catiônica no valor de pH de 7,1. Esses resultados demonstram que ambos os analitos estão majoritariamente nas suas formas iônicas o que torna esse pH adequado para a separação e análise dessas espécies. Além disso, deve-se assegurar que a mobilidade do EOF é alta o suficiente para mover o SMX em direção ao detector. Caso não houvesse este efeito, este analito só poderia ser analisado quando usado um inversor de fluxo. Simultaneamente,  $Li^+$  e  $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$  apresentam altas mobilidades que são suficientes para produzir intensos picos negativos para ambos os analitos sem, contudo, prejudicar o sinal de fundo.

A Figura 26 apresenta os eletroferogramas para a TMP e o SMX usando o tampão fosfato de lítio (pH 7,1) como eletrólito de corrida. Conforme previsto pelos valores de  $pK_a$ , em pH 7,1, a TMP encontra-se predominantemente na forma catiônica, enquanto o SMX na forma aniônica, o que torna a separação entre eles muito mais favorável.

Usando esta condição, soluções padrão sintéticas com concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  das duas espécies isoladas, bem como uma terceira consistindo de uma mistura equimolar de ambos os analitos preparadas apenas em água desionizada foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar.

Os eletroferogramas apresentados na Figura 26 demonstraram que a separação completa entre as espécies foi possível mesmo considerando os resultados obtidos no primeiro detector, onde o comprimento efetivo do capilar de separação é de apenas 10 centímetros.

Esses resultados ilustram que a separação completa de ambas as espécies foi realizada em menos de um minuto de análise. Embora nessas condições operacionais, uma rápida separação seja obtida, uma baixa resolução entre a TMP e o pico de sistema do EOF foi obtida para o primeiro detector. No entanto, os resultados obtidos para o segundo detector apresentaram melhor resolução e, por essa razão, o segundo detector foi escolhido e utilizado em todos os experimentos posteriores.



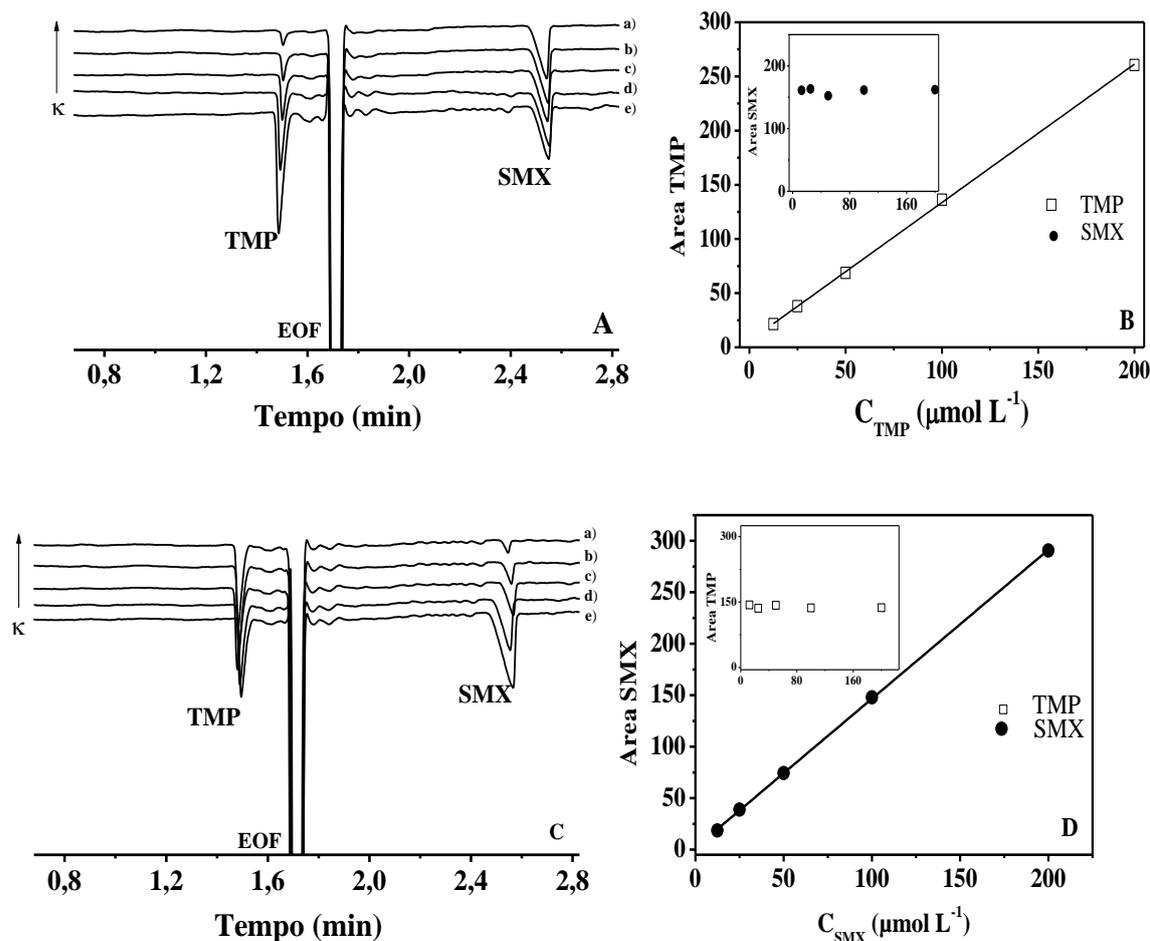
**Figura 26:** Eletroferogramas obtidos no primeiro e segundo detectores para injeções de H<sub>2</sub>O (1), 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de SMX (2), 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de TMP (3), e de uma solução contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de SMX (2) mais 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de TMP (4). Condições – Eletrólito de corrida: 10 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de lítio ( pH 7,1); potencial de corrida: 30 kV; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 5 s; coluna capilar: 50 µm d.i, 48 cm de comprimento total, 10 e 39 cm referentes ao comprimento efetivo para o primeiro e para o segundo detectores, respectivamente, a partir do ponto de injeção.

### 4.3.1 Características analíticas

Conforme observado nas figuras anteriores, o intervalo de tempo na detecção para as duas espécies favorece a determinação de ambos analitos de forma simultânea em uma mesma amostra. Contudo, para avaliar se a relação de concentração entre eles poderia resultar em alguma interferência, alguns experimentos foram conduzidos variando-se a concentração de uma espécie enquanto a outra foi mantida constante.

A linearidade para cada espécie foi avaliada por uma série de experimentos, conduzidos em triplicata usando soluções padrão em um intervalo de concentração variando de 12,5 a 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto a concentração da outra espécie foi mantida constante em 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados são apresentados na Figura 27. De acordo com a mesma, o incremento na concentração de TMP não alterou de forma significativa os sinais obtidos para o SMX, sendo o mesmo comportamento observado para o sinal de TMP em função do incremento de concentração de SMX. Os coeficientes de correlação obtidos em ambos os casos foram melhores que 0,999 ( $N = 5$ ).

As inclinações das curvas analíticas para a TMP e para o SMX foram, respectivamente,  $(1,28 \pm 0,10) \text{ min } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$  e  $(1,45 \pm 0,11) \text{ min } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ , demonstrando que as sensibilidades de ambas as espécies são similares. Além disso, os interceptos obtidos foram  $5,9 \pm 1,2 \text{ min}$  e  $1,9 \pm 0,9 \text{ min}$ . Nessas condições os limites de detecção e quantificação calculados para TMP foram iguais a, 1,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 3,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (considerando a relação sinal/ruído –  $3 \times S/B$ ). Para o SMX esses limites foram respectivamente, 2,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 7,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 27:** A – Eletroferogramas para diferentes concentrações de TMP mantendo a concentração de SMX fixa ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); B – Relação entre o sinal analítico das espécies e a concentração; C – Eletroferogramas para diferentes concentrações de SMX mantendo a concentração de TMP fixa ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); D – Relação entre o sinal analítico das espécies e a concentração.

A Tabela 14 apresenta a comparação entre métodos de eletroforese capilar usando diferentes sistemas de detecção, com o método desenvolvido nesta tese. Como pode ser observado o método proposto apresenta limite de detecção e faixa linear de trabalho muito similares na comparação com os demais métodos. Contudo, uma das principais vantagens do método proposto é o tempo de análise de 3 minutos para determinação simultânea de TMP e

SMX, o que permite uma frequência de análises adequada às necessidades da indústria farmacêutica.

**Tabela 14: Comparação entre métodos de eletroforese capilar usados para determinação simultânea de TMP e SMX.**

<i>Método</i>	<i>Meio</i>	<i>Tempo de análise (min)</i>	<i>Faixa linear</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>LD</i> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>Ref.</i>
CE-AD	13 mmol L <sup>-1</sup> bórax- 18 mmol L <sup>-1</sup> fosfato pH 5,8	14	1,72-172 (TMP) 1,97-197 (SMX)	0,19 (TMP) 0,20 (SMX)	<b>(140)</b>
CE-UV-VIS	15 mmol L <sup>-1</sup> fosfato pH 6,2	6	4,27-82,7 (TMP) 5,13-102 (SMX)	0,34 (TMP) 0,79 (SMX)	<b>(133)</b>
CE-UV-VIS	15 mmol L <sup>-1</sup> fosfato pH 6,2	8	6,89-110 (TMP) 39,4-631 (SMX)	6,85 (TMP) 39,5 (SMX)	<b>(137)</b>
CE-C <sup>4</sup> D	10 mmol L <sup>-1</sup> Fosfato * pH 7,1	3	12,5-250 (TMP) 12,5-250 (SMX)	1,1 (TMP) 2,4 (SMX)	<b>Este trabalho</b>

\* tampão fosfato de lítio

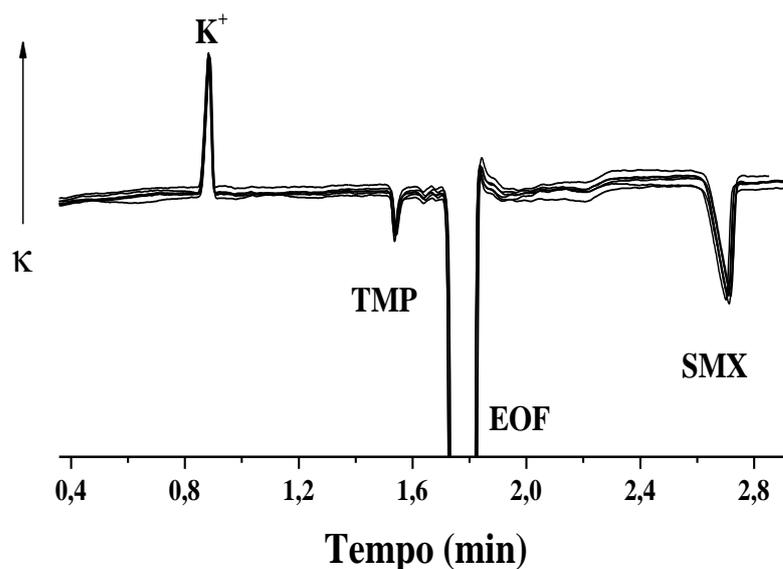
**LD:** Limite de Detecção; **CE-AD:** Eletroforese Capilar com detecção Amperométrica; **CE-UV-VIS:** Eletroforese Capilar com detecção espectrofotométrica; **CE-C<sup>4</sup>D:** Detector condutométrico sem contato.

### 4.3.2 Precisão e efeito de matriz

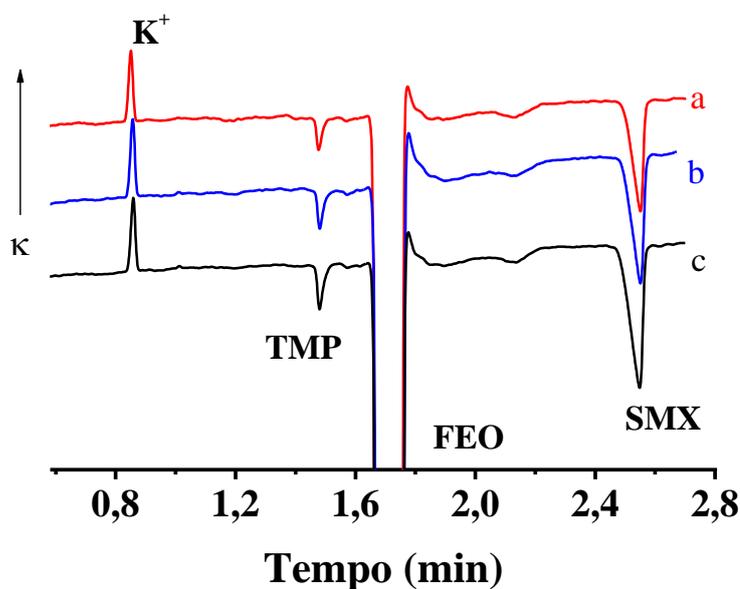
A precisão dos resultados também foi avaliada através da execução de seis injeções de uma solução contendo ambas as espécies. A repetibilidade do procedimento analítico foi então avaliada empregando solução padrão sintética contendo 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TMP e 690  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SMX. Para compensar flutuações decorrentes do processo de injeção, e dessa

forma, aumentar ainda mais a precisão do método, a adição de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cloreto de potássio foi requerida, servindo este como padrão interno. A Figura 28 ilustra os resultados obtidos neste experimento. Nessas condições, os desvios padrão obtido para as áreas dos picos das espécies com relação ao padrão interno foram 4,5% e 2,0% para TMP e SMX, respectivamente. A presença do pico positivo para o íon potássio é devido a sua maior mobilidade eletroforética em comparação com a mobilidade do seu co-íon ( $\text{Li}^+$ ) presente no eletrólito de corrida.

Para avaliar a influência devido à presença de outros constituintes na amostra, testes de adição de padrão foram realizados. Estes testes consistiram na adição de duas alíquotas de uma solução padrão para produzir uma concentração final de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de TMP e  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de SMX na mesma amostra. Os eletroferogramas obtidos para a amostra farmacêutica e para as duas adições de solução padrão contendo TMP e SMX são ilustrados na Figura 29. Apenas os picos correspondentes a TMP ( $\sim 1,4 \text{ min}$ ) e ao SMX ( $\sim 2,5 \text{ min}$ ) aparecem, e nenhum pico de alguma espécie interferente dentro desse intervalo de tempo ou próximo aos picos das espécies foram observados. Os eletroferogramas foram obtidos em aproximadamente 2,6 minutos, tempo este consideravelmente menor do que o tempo gasto no método oficial que é de 11 minutos (5). Além do menor tempo necessário para a separação, apenas uma etapa é necessária para o preparo de amostra, isto confere frequência analítica elevada ao método proposto (cerca de 20 amostras por hora) e o torna competitivo para aplicações em controle de qualidade.



**Figura 28:** Superposição de seis eletroferogramas obtidos no segundo detector para soluções padrão contendo  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TMP e  $690 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $175 \text{ mg L}^{-1}$ ) de SMX. Medidas realizadas na presença de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de potássio usado como padrão interno. Para melhor visualização dos sinais, a linha base foi deslocada verticalmente.



**Figura 29:** Eletroferogramas de uma amostra farmacêutica e duas subsequentes adições de  $17,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TMP e  $98,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) de SMX na mesma amostra. As demais condições são as mesmas da Figura 26.

### ***4.3.3. Aplicação analítica***

O método proposto foi testado para análise de amostras farmacêuticas que usualmente não necessitam da sensibilidade alcançada no método desenvolvido neste estudo. As mesmas condições estabelecidas anteriormente foram aplicadas para a determinação de TMP e SMX em amostras farmacêuticas sólidas, que foram adequadamente diluídas para ficarem dentro do intervalo linear do método proposto.

A composição das amostras analisadas neste trabalho contém, além de TMP e SMX, os seguintes excipientes: dioctilssulfosuccinato de sódio, estearato de magnésio, povidona e amido carboximetilsódico. Dos compostos mencionados anteriormente, a povidona é uma molécula neutra, não migra e, portanto é arrastada pelo EOF. Entretanto, todas as outras espécies são sais, e contribuem com cátions e ânions que possivelmente poderiam co-migrar com um dos analitos causando interferência no método analítico.

A Tabela 15 apresenta a comparação entre os resultados obtidos usando o método proposto e o método oficial (HPLC) (5). A análise estatística dos resultados confirmou que os dois métodos analíticos não apresentam diferenças significativas em um intervalo de 95 % de confiança. Estes resultados também demonstram a boa exatidão alcançada por ambos os métodos.

**Tabela 15: Resultados obtidos para determinação de trimetoprima e sulfametoxazol em amostras farmacêuticas pelo método proposto (CE-C<sup>4</sup>D) e pelo método de HPLC.**

Amostra	Quantidade (mg/tablet)		
	Valor rotulado	CE-C <sup>4</sup> D <sup>a</sup>	HPLC <sup>a</sup>
A	(TMP) 80	73 ± 4	76 ± 1
	(SMX) 400	416 ± 12	404 ± 5
B	(TMP) 160	145 ± 8	152 ± 4
	(SMX) 800	784 ± 13	765 ± 21

<sup>a</sup> **média** ± intervalo de confiança de 95% (N = 3).

Além da boa concordância entre os resultados apresentados na Tabela 15, estes indicam a ausência de interferências significativas nas medidas feitas por ambos os métodos. As diferenças verificadas entre cada par de resultados encontrados (obtidos por CE-C<sup>4</sup>D e HPLC) foram menores que a somatória das incertezas de ambas as medidas.

Testes de adição e recuperação também foram usados para avaliar a exatidão do método proposto. Para este propósito, foram feitas adições de solução padrão em duas amostras farmacêuticas. Nessas amostras, concentrações de TMP e SMX foram adicionadas em três níveis e a análise da nova composição foi realizada. Os resultados são apresentados na Tabela 16 e vem reforçar a boa exatidão para o método proposto. Os testes de recuperação produziram resultados situados entre 96 e 103 % para TMP e 101 e 107 % para SMX. Os resultados apresentados na Tabela 16 sugerem que a amostra A contém a quantidade exata de TMP enquanto a amostra B contém menos TMP e um pequeno excesso de SMX. De qualquer

maneira, os valores encontrados são satisfatórios, uma vez que estão situados no intervalo de confiança de 95 %.

**Tabela 16: Resultados do estudo de adição e recuperação de TMP/SMX em diferentes amostras farmacêuticas.**

Amostra	TMP / SMX (mg·L <sup>-1</sup> )		Recuperação %	
	Adicionado	Encontrado*	TMP	SMX
<b>A</b>	10 / 50	10 ± 1 / 50 ± 3	103 ± 11	101 ± 6,4
	15 / 75	15 ± 1 / 76 ± 6	101 ± 6,7	101 ± 8,0
	20 / 100	20 ± 2 / 101 ± 3	100 ± 10	101 ± 3,0
<b>B</b>	10 / 50	10 ± 1 / 52 ± 3	96 ± 10	103 ± 6,4
	15 / 75	14 ± 1 / 79 ± 2	96 ± 6,7	105 ± 2,7
	20 / 100	20 ± 2 / 107 ± 3	98 ± 8,0	107 ± 3,0

\*Média de três medidas ± SD.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram apresentados e discutidos métodos analíticos simples e rápidos para determinação de *N*-acetilcisteína, nimesulida, trimetoprima e sulfametoxazol em produtos farmacêuticos.

O sensor aqui proposto, partindo da modificação do eletrodo de grafite pirolítico com a ftalocianina de cobalto, apresentou propriedades catalíticas adequadas para oxidação de NAC, com antecipação no potencial de oxidação de aproximadamente 200 mV, além de apresentar sinais analíticos cerca de 700 vezes maiores quando comparado com o eletrodo limpo. A associação de métodos voltamétricos com análise por injeção em fluxo possibilitou a elaboração de um método analítico simples e rápida para determinação de NAC. O método desenvolvido apresentou boa repetibilidade, ampla faixa linear, baixos limites de detecção e quantificação, além de frequência analítica elevada.

A determinação voltamétrica de NMS foi realizada usando eletrodo de carbono vítreo não modificado e verificou-se que, comparando as respostas de corrente obtidas em meio ácido e alcalino, em meio ácido a determinação de NMS usando um eletrodo não modificado é fortemente influenciada por problemas associados ao envenenamento da superfície do eletrodo. Dessa forma, trabalhando-se em meio alcalino e explorando as características de reversibilidade da formação do nitro radical aniônico decorrente da redução eletroquímica da NMS foi estabelecido um método eletroanalítico empregando voltametria de onda quadrada. Este método apresentou ampla faixa linear de trabalho e baixo LD.

Também foi demonstrada neste trabalho a vantagem na utilização do CE-C<sup>4</sup>D para a determinação simultânea de trimetoprima e sulfametoxazol em formulações farmacêuticas. O método proposto foi adequado para análise direta de produtos farmacêuticos, requerendo

pequenos volumes de amostra, ausência de solventes tóxicos, além de um tempo total de análise extremamente curto. A disponibilidade de dois detectores confere flexibilidade ao procedimento permitindo uma frequência de aproximadamente 75 amostras por hora, caso o primeiro detector fosse utilizado. Mesmo assim, usando o segundo detector, uma frequência de analítica de 23 amostras por hora demonstrou ser muito satisfatória quando comparada com o método oficial (HPLC). A possibilidade de dissolução direta da amostra, seguida da sua análise é outra vantagem que pode ser ressaltada, uma vez que se consegue eliminar algumas etapas do processo de preparo da amostra.

Os aspectos supracitados acima fazem dos métodos elaborados e aqui apresentados muito atrativos para o controle de qualidade dos fármacos estudados em produtos farmacêuticos comerciais.

Os trabalhos desenvolvidos na presente tese abriram diversas perspectivas de trabalhos futuros, dentre os quais:

- Eletrodos de grafite pirolítico modificados com CoPC mostraram catálise para o NAC e deverão catalisar a oxidação de outros compostos similares (tióis), que poderão ser determinados voltametricamente. Adicionalmente, a construção de eletrodos miniaturizados e seu acoplamento a sistema de eletroforese capilar poderá ser promissor para análises de misturas de tais compostos ou para a sua detecção em matrizes complexas tais como fluídos biológicos e amostras ambientais.
- O desenvolvimento de estudos com trimetoprima e sulfametoxazol teve foco na aplicação em amostras farmacêuticas, entretanto abre perspectivas para a quantificação destas espécies em meio aquoso, uma vez que se tratam de contaminantes emergentes, tendo sido encontrados com frequência em sistemas de tratamento de águas e efluentes.

## 6 REFERÊNCIAS

1. BRETT CMA. Uma ciência virada para o futuro na resolução de problemas químicos. Química [Internet]. 2006 02 de março de 2013; 100(0870 – 1180):[31-3 pp.]. Available from: [http://www.spq.ubiktek.pt/revistas/Boletim/BSPQ\\_N100/BSPQ\\_N100.pdf](http://www.spq.ubiktek.pt/revistas/Boletim/BSPQ_N100/BSPQ_N100.pdf).
2. Sartori EJR. Determinação voltamétrica de analitos de interesse farmacêutico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2009.
3. \_\_\_\_\_. O que devemos saber sobre os medicamentos: ANVISA; 2010 [cited 2013 05/06]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1ebd3804745871090afd43fbc4c6735/Carthia+o+que+devemos+saber+sobre+medicamentos.pdf?MOD=AJPERES>.
4. Pio dos Santos WT, Gimenes DT, Richter EM, Angnes L. Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications. Química Nova. 2011;34(10):1753-61.
5. Brasil. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. ed. São Paulo, Brasil: ANVISA e Fundação Oswaldo Cruz; 2010. 904 p.
6. TREATMENT OF ACUTE PARACETAMOL POISONING. British Medical Journal. 1977;2(6085):481-2.
7. Fishbane S. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008;3(1):281-7.
8. de Paula AS, do Nascimento PD, Calvano DC, Vieira ADD, Dutra dMFJ, Franco Neto EdA, et al. Efeito protetor da n-acetilcisteína em pacientes com função renal normal expostos a contraste radiológico hiperosmolar. Jornal Brasileiro de Nefrologia. 2006;28(1):15-9.
9. Deflora S, Astengo M, Serra D, Bennicelli C. Inhibition of urethane-induced lung-tumors in mice by dietary n-acetylcysteine. Cancer Letters. 1986;32(3):235-41.
10. Wilpart M, Speder A, Roberfroid M. Anti-initiation activity of n-acetylcysteine in experimental colonic carcinogenesis. Cancer Letters. 1986;31(3):319-24.
11. Pereira MA, Khoury MD. Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon. Cancer Letters. 1991;61(1):27-33.
12. Kelloff GJ, Boone CW, Malone WF, Steele VE, Doody LA. Development of chemopreventive agents for bladder-cancer. Journal of Cellular Biochemistry. 1992:1-12.
13. Estensen RD, Levy M, Klopp SJ, Galbraith AR, Mandel JS, Blomquist JA, et al. N-Acetylcysteine suppression of the proliferative index in the colon of patients with previous adenomatous colonic polyps. Cancer Letters. 1999;147(1-2):109-14.
14. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. Journal of Cellular Biochemistry. 2013;114(7):1685-94.

15. Sigma-Aldrich. Sigma Prod. No. A7250. Available from: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product\\_Information\\_Sheet/a7250pis.Par.0001.File.tmp/a7250pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/a7250pis.Par.0001.File.tmp/a7250pis.pdf).
16. PubChem. Acetylcysteine - Compound Summary (CID 12035) [07 de junho de 2013]. Available from: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=12035#a\\_tocid\\_27\\_43](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=12035#a_tocid_27_43).
17. Vinas P, Cordoba MH, Sanchezpedreno C. Catalytic titration of n-penicillamine, n-acetylcysteine, cysteine and 2-mercaptopropionylglycine. *Analyst*. 1990;115(6):757-60.
18. Verma KK. Titrimetric determination of thiols - tetrathionate, iron(iii), cystine and hexacyanoferrate(iii) as thiol reagents. *Talanta*. 1979;26(4):277-82.
19. Janegitz BC, Suarez WT, Fatibello-Filho O, Marcolino-Junior LH. Conductometric Determination of N-acetylcysteine in Pharmaceutical Formulations Using Copper(II) Sulphate as Titrant. *Analytical Letters*. 2008;41(18):3264-71.
20. Kusmierk K, Chwatko G, Glowacki R, Bald E. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009;877(28):3300-8.
21. Huang K-J, Han C-H, Li J, Wu Z-W, Liu Y-M, Wu Y-Y. LC Determination of Thiols Derivatized with 4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole after SPE. *Chromatographia*. 2011;74(1-2):145-50.
22. Gatti R, Andreatta P, Boschetti S. Study of 1,4-naphthoquinone as a new useful derivatization reagent for LC analysis of aliphatic thiols in dietary supplements and pharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013;405(2-3):817-25.
23. Abu Eid M. Spectrophotometric determination of cysteine and N-acetylcysteine in pharmaceutical preparations. *Mikrochimica Acta*. 1998;129(1-2):91-5.
24. Alvarezcoque MCG, Hernandez MJM, Camanas RMV, Fernandez CM. Spectrophotometric determination of n-acetylcysteine in drug formulations with o-phthalaldehyde and isoleucine. *Analyst*. 1989;114(8):975-7.
25. Hernandez MJM, Alvarezcoque MCG, Domingo EB, Camanas RMV. FIA-Spectrophotometric assay of n-acetylcysteine by ortho-phthalaldehyde derivatization. *Pharmazie*. 1990;45(10):745-7.
26. Sanchezpedreno C, Albero MI, Garcia MS, Rodenas V. Determination of n-acetylcysteine in pharmaceutical samples by flow-injection. *Analyst*. 1992;117(5):925-8.
27. Suarez WT, Madi AA, Vicentini FC, Fatibello-Filho O. Flow-injection spectrophotometric determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing Zn(II) phosphate immobilized in a polyester resin. *Analytical Letters*. 2007;40(16-18):3417-29.
28. Suarez WT, Pessoa-Neto OD, Janegitz BC, Vieira HJ, Faria RC, Fatibello-Filho O. Flow injection spectrophotometric determination of n-acetylcysteine and captopril employing prussian blue generation reaction. *Analytical Letters*. 2011;44(14):2394-405.

29. Tzanavaras PD, Zacharis CK, Themelis DG. On-Line Derivatization of N-acetylcysteine Using Ethyl-Propiolate as a Novel Advantageous Reagent and Sequential Injection Analysis. *Analytical Letters*. 2010;43(12):1889-901.
30. Al-Ghannam SM, El-Brashy AM, Al-Farhan BS. Fluorimetric determination of some thiol compounds in their dosage forms. *Farmaco*. 2002;57(8):625-9.
31. Dong W, Wen H, Yang X-F, Li H. Highly selective and sensitive fluorescent sensing of N-acetylcysteine: Effective discrimination of N-acetylcysteine from cysteine. *Dyes and Pigments*. 2013;96(3):653-8.
32. dos Santos VB, Guerreiro TB, Suarez WT, Faria RC, Fatibello-Filho O. Evaluation of Turbidimetric and Nephelometric Techniques for Analytical Determination of N-Acetylcysteine and Thiamine in Pharmaceutical Formulations Employing a Lab-Made Portable Microcontrolled Turbidimeter and Nephelometer. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011;22(10):1968-78.
33. Suarez WT, Vieira HJ, Fatibello-Filho O. Flow injection turbidimetric determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using silver nitrate as precipitant reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2007;18(5):1028-33.
34. Raoof JB, Chekin F, Ojani R, Barari S. Carbon paste electrode incorporating multi-walled carbon nanotube/ferrocene as a sensor for the electroanalytical determination of N-acetyl-L-cysteine in the presence of tryptophan. *Journal of Chemical Sciences*. 2013;125(2):283-9.
35. Beitollahi H, Taher MA, Mirrahimi F, Hosseinzadeh R. Electrochemical sensor for selective determination of N-acetylcysteine in the presence of folic acid using a modified carbon nanotube paste electrode. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2013;33(3):1078-84.
36. Beitollahi H, Sheikhsheoae I. Electrochemical Behavior of Carbon Nanotube/Mn(III) Salen Doped Carbon Paste Electrode and Its Application for Sensitive Determination of N-acetylcysteine in the Presence of Folic Acid. *International Journal of Electrochemical Science*. 2012;7(8):7684-98.
37. Beitollahi H, Mohadesi A, Mohammadi S, Pahlavan A, Karimi-Maleh H, Akbari A. New voltammetric strategy for determination of dopamine in the presence of high concentrations of acetaminophen, folic acid and N-acetylcysteine. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;169:130-5.
38. Nezamzadeh-Ejehieh A, Hashemi H-S. Voltammetric determination of cysteine using carbon paste electrode modified with Co(II)-Y zeolite. *Talanta*. 2012;88:201-8.
39. Banica FG, Moreira JC, Fogg AG. Application of catalytic stripping voltammetry for the determination of organic sulfur-compounds at a hanging mercury drop electrode - behavior of cysteine, cystine and n-acetylcysteine in the presence of nickel ion. *Analyst*. 1994;119(2):309-18.
40. Ion A, Banica FG, Fogg AG, Kozlowski H. Cathodic stripping voltammetry of D-Penicillamine and N-acetylcysteine in the presence of nickel ion. *Electroanalysis*. 1996;8(1):40-3.

41. Barus C, Gros P, Comtat M, Daunes-Marion S, Tarroux R. Electrochemical behaviour of N-acetyl-L-cysteine on gold electrode - A tentative reaction mechanism. *Electrochimica Acta*. 2007;52(28):7978-85.
42. Moore RR, Banks CE, Compton RG. Electrocatalytic detection of thiols using an edge plane pyrolytic graphite electrode. *Analyst*. 2004;129(8):755-8.
43. Zare HR, Chatraei F. Preparation and electrochemical characteristics of electrodeposited acetaminophen on ruthenium oxide nanoparticles and its role as a sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and N-acetyl-L-cysteine. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2011;160(1):1450-7.
44. Karimi-Maleh H, Keyvanfard M, Alizad K, Fouladgar M, Beitollahi H, Mokhtari A, et al. Voltammetric Determination of N-Acetylcysteine Using Modified Multiwall Carbon Nanotubes Paste Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*. 2011;6(12):6141-50.
45. Heli H, Majdi S, Sattarahmady N. Ultrasensitive sensing of N-acetyl-L-cysteine using an electrocatalytic transducer of nanoparticles of iron(III) oxide core-cobalt hexacyanoferrate shell. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2010;145(1):185-93.
46. Ferreira HAR. Eletrooxidação de cisteína sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina de cobalto. São Luís-MA: Universidade Federal do Maranhão; 2004.
47. Pereira-Rodrigues N, Cofre R, Zagal JH, Bedioui F. Electrocatalytic activity of cobalt phthalocyanine CoPc adsorbed on a graphite electrode for the oxidation of reduced (L)-glutathione (GSH) and the reduction of its disulfide (GSSG) at physiological pH. *Bioelectrochemistry*. 2007;70(1):147-54.
48. Zagal J, Paez M, Tanaka AA, Dossantos JR, Linkous CA. Electrocatalytic activity of metal phthalocyanines for oxygen reduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1992;339(1-2):13-30.
49. Pal M, Ganesan V. Effect of gold nanoparticles on the electrocatalytic reduction of oxygen by silica encapsulated cobalt phthalocyanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2012;672:7-11.
50. Gilmartin MAT, Ewen RJ, Hart JP, Honeybourne CL. Voltammetric and photoelectron spectral elucidation of the electrocatalytic oxidation of hydrogen-peroxide at screen-printed carbon electrodes chemically-modified with cobalt phthalocyanine. *Electroanalysis*. 1995;7(6):547-55.
51. Canevari TC, Luz RCS, Gushikem Y. Electrocatalytic determination of nitrite on a rigid disk electrode having cobalt phthalocyanine prepared in situ. *Electroanalysis*. 2008;20(7):765-70.
52. Erbahar DD, Harbeck M, Gurol I, Gumus G, Musluoglu E, Ozturk ZZ, et al. Zinc phthalocyanines with fluorinated substituents for direct sensing of carbamate and organophosphate pesticides in water. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2013;17(10):989-95.
53. Ardiles P, Trollund E, Isaacs M, Armijo F, Canales JC, Aguirre MJ, et al. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at polymeric iron-tetraaminophthalocyanine modified electrodes. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*. 2001;165(1-2):169-75.

54. Perez EF, Neto GD, Tanaka AA, Kubota LT. Electrochemical sensor for hydrazine based on silica modified with nickel tetrasulfonated phthalocyanine. *Electroanalysis*. 1998;10(2):111-5.
55. Yang J, Mu D, Gao Y, Tan J, Lu A, Ma D. Cobalt phthalocyanine-graphene complex for electro-catalytic oxidation of dopamine. *Journal of Natural Gas Chemistry*. 2012;21(3):265-9.
56. Moraes FC, Cabral MF, Machado SAS, Mascaro LH. Electrocatalytic behavior of glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes and cobalt phthalocyanine for selective analysis of dopamine in presence of ascorbic acid. *Electroanalysis*. 2008;20(8):851-7.
57. Silva JF, Griveau S, Richard C, Zagal JH, Bedioui F. Glassy carbon electrodes modified with single walled carbon nanotubes and cobalt phthalocyanine and nickel tetrasulfonated phthalocyanine: Highly stable new hybrids with enhanced electrocatalytic performances. *Electrochemistry Communications*. 2007;9(7):1629-34.
58. Qi XH, Baldwin RP. Selective oxidation of thiols to disulfides at polymeric cobalt phthalocyanine chemically modified electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*. 1996;143(4):1283-7.
59. Zagal JH. Metallophthalocyanines as catalysts in electrochemical reactions. *Coordination Chemistry Reviews*. 1992;119:89-136.
60. Fouladgar M, Karimi-Maleh H, Hosseinzadeh R. Novel nanostructured electrochemical sensor for voltammetric determination of N-acetylcysteine in the presence of high concentrations of tryptophan. *Ionics*. 2013;19(4):665-72.
61. Salmanipour A, Taher MA, Beitollahi H, Hosseinzadeh R. New voltammetric strategy for simultaneous determination of N-acetylcysteine and folic acid using a carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2013;102:385-90.
62. Keyvanfard M, Ensafi AA, Karimi-Maleh H, Alizad K. Modified multiwalled carbon nanotubes paste electrode as a sensor for the electrocatalytic determination of N-acetylcysteine in the presence of high concentrations of folic acid. *Analytical Methods*. 2012;4(10):3268-74.
63. do Carmo DR, da Silva RM, Stradiotto NR. Electrocatalytic and voltammetric determination of sulfhydryl compounds through iron nitroprusside modified graphite paste electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2003;14(4):616-20.
64. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(45):5651-61.
65. Fallavena PRB, Schapoval EES. pK(a) determination of nimesulide in methanol-water mixtures by potentiometric titrations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997;158(1):109-12.
66. Rang H, Dale M, Ritter J. *Agentes antiinflamatórios e imunossupressores*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
67. Nimesulide [cited 2013 07 de julho]. Available from: [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0138084\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0138084_EN.htm).

68. Rainsford KD, Consensus Report Grp N. Nimesulide - a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. *Current Medical Research and Opinion*. 2006;22(6):1161-70.
69. Suleyman H, Cadirci E, Albayrak A, Halici Z. Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal antiinflammatory drug. *Current Medicinal Chemistry*. 2008;15(3):278-83.
70. Davis R, Brogden RN. Nimesulide - an update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1994;48(3):431-54.
71. Nimesulide. Miriam Onoda Fujisawa. Campinas: Medley Indústria Farmacêutica Ltda; 2013. Bula.
72. Chang SF, Miller AM, Ober RE. Determination of an anti-inflammatory methanesulfonanilide in plasma by high-speed liquid-chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1977;66(12):1700-3.
73. Castoldi D, Monzani V, Tofanetti O. Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in human-plasma and urine by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*. 1988;425(2):413-8.
74. Otero GCF, Carducci CN. Silanophilic interaction in the retention mechanism of pharmaceutical drugs on a cyanopropyl bonded silica column. *Journal of Liquid Chromatography*. 1991;14(8):1561-73.
75. Pandya KK, Satia MC, Modi IA, Modi RI, Chakravarthy BK, Gandhi TP. High-performance thin-layer chromatography for the determination of nimesulide in human plasma, and its use in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1997;49(8):773-6.
76. Giachetti C, Tenconi A. Determination of nimesulide and hydroxynimesulide in human plasma by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 1998;12(2):50-6.
77. Jaworowicz DJ, Filipowski MT, Boje KMK. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide. *Journal of Chromatography B*. 1999;723(1-2):293-9.
78. Khaksa G, Udupa N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1999;727(1-2):241-4.
79. Maltese A, Maugeri F, Bucolo C. Rapid determination of nimesulide in rabbit aqueous humor by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004;804(2):441-3.
80. Malliou ET, Markopoulou CK, Koundourellis JE. Simultaneous determination of clobutinol together with some anti-inflammatory drugs in urine by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2004;27(10):1565-77.
81. Patravale VB, D'Souza S, Narkar Y. HPTLC determination of nimesulide from pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;25(3-4):685-8.

82. Ptacek P, Macek J, Klima J. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2001;758(2):183-8.
83. Nagoji KEV, Panda J, Rao SS, Patro SS. Determination of nimesulide in dosage formulations by reverse phase high performance liquid chromatography. *Asian Journal of Chemistry*. 2002;14(1):339-43.
84. Carrasco-Portugal MC, Granados-Soto V, Camacho-Vieyra GA, Perez-Urizar J, Flores-Murrieta FJ. A simple method for determination of nimesulide in rat blood samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2000;23(14):2237-44.
85. Carini M, Aldini G, Stefani R, Marinello C, Facino RM. Mass spectrometric characterization and HPLC determination of the main urinary metabolites of nimesulide in man. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998;18(1-2):201-11.
86. Barrientos-Astigarraga RE, Vannuchi YB, Sucupira M, Moreno RA, Muscara MN, De Nucci G. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies. *Journal of Mass Spectrometry*. 2001;36(12):1281-6.
87. Alvarez-Lueje A, Vasquez P, Nunez-Vergara LJ, Squella JA. HPLC determination of nimesulide in tablets by electrochemical detection. *Analytical Letters*. 1998;31(7):1173-84.
88. Ferrario P, Bianchi M. Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in rat plasma, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2003;785(2):227-36.
89. Morais Ruela AL, Araujo MB, Pereira GR. Development and validation of a rapid analytical method by hplc for determination of nimesulide in release studies. *Quimica Nova*. 2009;32(1):165-8.
90. Bhatti MK, Hayat MM, Nasir R, Nasim F-U-H, Ashraf M, Hussain B, et al. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Determination of Nimesulide in Bulk and Tablet Dosage Forms by Biuret Reagent Method. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 2012;34(3):713-6.
91. Saber AL, El-Sayed GO. Extractive Spectrophotometric Determination of Anti-Inflammatory Drug Nimesulide in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2011;19(4):429-36.
92. Nagaraja P, Kumar HRA, Vasantha RA, Yathirajan HS. Spectrophotometric determination of nimesulide by oxidative coupling with N-bromosuccinimide and promethazine hydrochloride. *Oxidation Communications*. 2003;26(1):116-20.
93. Nagaraja P, Yathirajan HS, Arunkumar HR, Vasantha RA. Novel coupling reagents for the sensitive spectrophotometric determination of nimesulide in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;29(1-2):277-82.
94. Murthy TK, Reddy MN, Reddy MD, Sankar DG. Spectrophotometric determination of flutamide, nimesulide and meloxicam. *Asian Journal of Chemistry*. 2001;13(3):915-8.

95. Lakshmi CSR, Reddy MN. Spectrophotometric estimation of nimesulide and its formulations. *Mikrochimica Acta*. 1999;132(1):1-6.
96. Chandran S, Saggar S, Priya KP, Saha RN. New ultraviolet spectrophotometric method for the estimation of nimesulide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2000;26(2):229-34.
97. Chandratrey A, Sharma R. Simultaneous spectrophotometric estimation and validation of three component tablet formulation containing paracetamol, nimesulide and tizanidine. *Indian Journal of Chemical Technology*. 2010;17(3):229-32.
98. Altinoz S, Dursun OO. Determination of nimesulide in pharmaceutical dosage forms by second order derivative UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000;22(1):175-82.
99. Starek M, Krzek J. A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone. *Talanta*. 2009;77(3):925-42.
100. AlvarezLueje A, Vasquez P, NunezVergara LJ, Squella JA. Voltammetric study of nimesulide and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals. *Electroanalysis*. 1997;9(15):1209-13.
101. Catarino RIL, Conceicao ACL, Garcia MBQ, Goncalves MLS, Lima J, dos Santos MMC. Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;33(4):571-80.
102. Furlanetto S, Orlandini S, Aldini G, Gotti R, Dreassi E, Pinzauti S. Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Analytica Chimica Acta*. 2000;413(1-2):229-39.
103. Kumar KG, Augustine P, John S. A Novel Potentiometric Sensor for the Determination of Nimesulide *Portugaliae Electrochimica Acta*. 2007;25(3):375-81.
104. Wang C, Shao X, Liu Q, Qu Q, Yang G, Hu X. Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of L-cysteine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;42(2):237-44.
105. Zhang J, Tan X, Zhao D, Tan S, Huang Z, Mi Y, et al. Study of nimesulide and its determination using multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. *Electrochimica Acta*. 2010;55(7):2522-6.
106. Zhang J-l, Tan X-c, Zhao D-d, Tan S-w, Liu L, Wang L, et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles Modified Electrode as a Sensor for Determination of Nimesulide. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2011;27(4):566-9.
107. Ghavami R, Navaee A. Determination of nimesulide in human serum using a glassy carbon electrode modified with SiC nanoparticles. *Mikrochimica Acta*. 2012;176(3-4):493-9.
108. El-Sayed GO, Yasin SA, El Ries MA, El-Badawy AA. Adsorptive Voltammetric Determination of Nimesulide at Glassy Carbon Electrode. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009;28(5):741-6.
109. Malode SJ, Nandibewoor ST. Electrochemical Oxidation and Determination of Nimesulide Using a Carbon Paste Electrode. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-*

International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics. 2013;227(1):73-87.

110. Guimaraes DO, Momesso LdS, Pupo MT. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Quimica Nova*. 2010;33(3):667-79.

111. Watson ID, Shenkin A, McIntosh SJ, Cohen HN. Assay for trimethoprim in serum and urine by means of ion-pair chromatography. *Clinical Chemistry*. 1980;26(13):1791-5.

112. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The Combination of Sulfamethoxazole, Trimethoprim, and Isoniazid or Rifampin Is Bactericidal and Prevents the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(10):5142-8.

113. Macingwana L, Baker B, Ngwane AH, Harper C, Cotton MF, Hesselning A, et al. Sulfamethoxazole enhances the antimycobacterial activity of rifampicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(12):2908-11.

114. Sulfamethoxazole - Compound Summary 2013 [cited 2013 10 de julho de 2013]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5329#x27>.

115. Sulfamethoxazole [cited 2013 10 de julho de 2013]. Available from: <http://www.guidechem.com/dictionary/en/723-46-6.html>.

116. Boreen AL, Arnold WA, McNeill K. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: Sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. *Environmental Science & Technology*. 2004;38(14):3933-40.

117. Wormser GP. Trimethoprim-sulfametoxazole .1. description. *New York State Journal of Medicine*. 1978;78(12):1915-21.

118. Trimethoprim - Compound Summary [cited 2013 10 de julho]. Available from: [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0138084\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB0138084_EN.htm).

119. Lichtenwalner DM, Suh B, Lorber B, Sugar AM. RAPID ASSAY FOR DETERMINATION OF TRIMETHOPRIM AND SULFAMETHOXAZOLE LEVELS IN SERUM BY SPECTROFLUOROMETRY. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1979;16(5):579-83.

120. Givianrad MH, Saber-Tehrani M, Aberoomand-Azar P, Mohagheghian M. H-point standard additions method for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations and biological fluids with simultaneous addition of two analytes. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;78(3):1196-200.

121. Ghoreishi SM, Behpour M, Khoobi A, Moghadam Z. Determination of Trace Amounts of Sulfamethizole Using a Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Electrode: Application of Experimental Design in Voltammetric Studies. *Analytical Letters*. 2013;46(2):323-39.

122. Cai M, Zhu L, Ding Y, Wang J, Li J, Du X. Determination of sulfamethoxazole in foods based on CeO<sub>2</sub>/chitosan nanocomposite-modified electrodes. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2012;32(8):2623-7.

123. Arvand M, Ansari R, Heydari L. Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2011;31(8):1819-25.
124. Blahova E, Bovanova L, Brandsteterova E. Direct HPLC analysis of trimethoprim in milk. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2001;24(19):3027-35.
125. Huang J, Liu J, Zhang C, Wei J, Mei L, Yu S, et al. Determination of sulfonamides in food samples by membrane-protected micro-solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2012;1219:66-74.
126. Fernandez-Torres R, Olias Consentino M, Bello Lopez MA, Callejon Mochon M. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography diode array fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples. *Talanta*. 2010;81(3):871-80.
127. de Paula FCCR, de Pietro AC, Cass QB. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. *Journal of Chromatography A*. 2008;1189(1-2):221-6.
128. Sayar E, Sahin S, Cevheroglu S, Hincal AA. Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in human plasma. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2010;35(1-2):41-6.
129. Bedor DCG, Goncalves TM, Ferreira MLL, de Sousa CEM, Menezes AL, Oliveira EJ, et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2008;863(1):46-54.
130. Andrade LS, Rocha-Filho RC, Cass QB, Fatibello-Filho O. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*. 2009;21(13):1475-80.
131. Andrade LS, Rocha-Filho RC, Cass QB, Fatibello-Filho O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. *Analytical Methods*. 2010;2(4):402-7.
132. Jager AV, Tavares MFM. Simultaneous determination of cations by capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *Quimica Nova*. 2001;24(3):363-73.
133. Berzas Nevado JJ, Castañeda Peñalvo G, Guzmán Bernardo FJ. Determination of sulfamethoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2001;918(1):205-10.
134. Fan LY, Chen HL, Chen XG, De Hu Z. Separation and determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations by a microfluidic capillary electrophoresis system with a continuous sample introduction interface. *Journal of Separation Science*. 2003;26(15-16):1376-82.

135. Marini RD, Rozet E, Montes MLA, Rohrbasser C, Roht S, Rheme D, et al. Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;53(5):1278-87.
136. Nevado JJB, Penalvo GC, Bernardo FJG. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of sulfamethoxazole, trimethoprim and their main metabolites in human serum. *Journal of Separation Science*. 2005;28(6):543-8.
137. Teshima D, Otsubo K, Makino K, Itoh Y, Oishi R. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(1):51-4.
138. Garcia-Campana AM, Gamiz-Gracia L, Lara FJ, del Olmo Iruela M, Cruces-Blanco C. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;395(4):967-86.
139. Wang AB, Gong FY, Li HF, Fang YZ. Separation and determination of the active ingredients in tablets of composite sulphonamides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 1999;386(3):265-9.
140. Chu Q-C, Tian X-H, Jiang L-M, Zhou W-J, Ye J-N. Determination of effective ingredients in compound sulfamethoxazole tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2008;36(3):292-6.
141. Fan LY, Liu LH, Chen HL, Chen XG, Hu ZD. Continuous on-line concentration based on dynamic pH junction for trimethoprim and sulfamethoxazole by microfluidic capillary electrophoresis combined with flow injection analysis system. *Journal of Chromatography A*. 2005;1062(1):133-7.
142. Pedrotti JJ, Angnes L, Gutz IGR. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. *Electroanalysis*. 1996;8(7):673-5.
143. Rajh Vidal DT, Nogueira T, Saito RM, do Lago CL. Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. 2011;32(8):850-6.
144. Mendonca Francisco KJ, do Lago CL. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. *Electrophoresis*. 2009;30(19):3458-64.
145. Dolago CL, Juliano VF, Kascheres C. Applying moving median digital-filter to mass-spectrometry and potentiometric titration. *Analytica Chimica Acta*. 1995;310(2):281-8.
146. Cui L, Chen L, Xu M, Su H, Ai S. Nonenzymatic amperometric organic peroxide sensor based on nano-cobalt phthalocyanine loaded functionalized graphene film. *Analytica Chimica Acta*. 2012;712:64-71.
147. Cui L, Pu T, Liu Y, He X. Layer-by-layer construction of graphene/cobalt phthalocyanine composite film on activated GCE for application as a nitrite sensor. *Electrochimica Acta*. 2013;88:559-64.
148. Schmitt RE, Molitor HR, Wu T. Voltammetric Method for the Determination of Lactic Acid Using a Carbon Paste Electrode Modified with Cobalt Phthalocyanine. *International Journal of Electrochemical Science*. 2012;7(11):10835-41.

149. Kikuchi T, Sasaki H, Toshima S. Oxygen reduction on glassy-carbon electrode modified by polymer and cobalt phthalocyanine. *Chemistry Letters*. 1980(1):5-6.
150. Zuo X, Zhang H, Li N. An electrochemical biosensor for determination of ascorbic acid by cobalt (II) phthalocyanine-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2012;161(1):1074-9.
151. Wang BC, Cao XQ. Anodic-oxidation of hydrazine on glassy-carbon modified by macrocyclic transition-metal complexes .1. cobalt protoporphyrin dimethyl ester modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1991;309(1-2):147-58.
152. Limson J, Nyokong T. Voltammetric behavior of cysteine and metallothionein on cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. *Electroanalysis*. 1997;9(3):255-60.
153. Zagal JH, Gulppi M, Isaacs M, Cardenas-Jiron G, Aguirre MJ. Linear versus volcano correlations between electrocatalytic activity and redox and electronic properties of metallophthalocyanines. *Electrochimica Acta*. 1998;44(8-9):1349-57.
154. Oliveira AX, Silva SM, Figueiredo Leite FR, Kubota LT, Damos FS, Silva Luz RdC. Highly Sensitive and Selective Basal Plane Pyrolytic Graphite Electrode Modified with 1,4-Naphthoquinone/MWCNT for Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbate and Urate. *Electroanalysis*. 2013;25(3):723-31.
155. Prodromidis MI, Florou AB, Tzouwara-Karayanni SM, Karayannis MI. The importance of surface coverage in the electrochemical study of chemically modified electrodes. *Electroanalysis*. 2000;12(18):1498-501.
156. Vanderputten A, Elzing A, Visscher W, Barendrecht E. Oxygen reduction on vacuum-deposited and adsorbed transition-metal phthalocyanine films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1986;214(1-2):523-33.
157. Maree S, Nyokong T. Electrocatalytic behavior of substituted cobalt phthalocyanines towards the oxidation of cysteine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2000;492(2):120-7.
158. Suarez WT, Marcolino LH, Fatibello O. Voltammetric determination of N-acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with copper(II) hexacyanoferrate(III). *Microchemical Journal*. 2006;82(2):163-7.
159. Piel G, Pirotte B, Delneuve I, Neven P, Llabres G, Delarge J, et al. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; Isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(4):475-80.
160. Squella JA, Bollo S, Nunez-Vergara LJ. Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance. *Current Organic Chemistry*. 2005;9(6):565-81.
161. Squella JA, Gonzalez P, Bollo S, Nunez-Vergara LJ. Electrochemical generation and interaction study of the nitro radical anion from nimesulide. *Pharmaceutical Research*. 1999;16(1):161-4.

162. Bollo S, Nunez-Vergara LJ, Bonta M, Chauviere G, Perie J, Squella JA. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megalol and some related nitroimidazole derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2001;511(1-2):46-54.
163. Nunez-Vergara LJ, Bonta M, Sturm JC, Navarrette PA, Bollo S, Squella JA. Electrochemical reduction of nitroso compounds: voltammetric, UV-vis and EPR characterization of ortho- and meta-nitrosotoluene derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2001;506(1):48-60.
164. Alemu H, Hlalele L. Voltammetric determination of chloramphenicol at electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2007;21(1):1-12.
165. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2 edition ed. New York: John Wiley and Sons; 2000.
166. Brett AMO, Brett CMA. *Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*. New York: Oxford University Press; 1993.
167. de Souza D, Machado SAS, Avaca LA. Square wave voltammetry. Part 1: Theoretical aspects. *Quimica Nova*. 2003;26(1):81-9.
168. Mirceski V, Komorsky-Lovric S, Lovric M. *Square-Wave Voltammetry - Theory and Application*. Macedonia: Springer; 2007. 201 p.
169. Katzmayr MU, Klampfl CW, Buchberger W. Optimization of conductivity detection of low-molecular-mass anions in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999;850(1-2):355-62.
170. Brito-Neto JGA, da Silva JAF, Blanes L, do Lago CL. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. *Electroanalysis*. 2005;17(13):1198-206.
171. Gutz IGR. [cited 2013 18 de outubro]. Available from: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html>.

# APÊNDICE 1

## Trabalhos em paralelo

Ao longo do presente doutorado foram realizados outros estudos em paralelo, fruto de interações com outros grupos de pesquisa. A seguir será apresentada uma breve descrição dos aspectos relevantes de três diferentes estudos que resultaram em publicações. Em ordem cronológica, o primeiro estudo foi fruto da interação com o grupo do professor Eric de Sousa Gil e que resultou no desenvolvimento de um sistema para tratamento eletroquímico de água e remoção de 17- $\alpha$ -etinil-estradiol (17EE). O segundo estudo foi realizado durante o estágio de seis meses nos laboratórios do Prof. Kagan Kerman, na Universidade de Toronto (campus Scarborough) em Toronto, Canadá. Neste estudo avaliou-se a capacidade complexante de um flavonoide (epigalo-catequina-3 galato) frente a cobre. Os resultados mostraram-se bastante interessantes, como descritos mais abaixo. Finalmente, o terceiro estudo foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Thiago R. L. C. Paixão onde se desenvolveu uma forma muito simples de construção de arranjos de microeletrodos de cobre, utilizando cabos flexíveis de computadores. Estes arranjos de eletrodos apresentaram excelentes respostas para nitrato, sendo demonstrado neste estudo o efeito benéfico da presença de cloreto na formação do filme durante o processo de ativação do eletrodo bem como a necessidade de pequenas quantidades deste íon na solução de medida, que estabilizaram os filmes formados e permitiram a realização de várias medidas com uma mesma modificação além da diminuição dos limites de detecção.

**1 - LINO, F. M. A. ; DIAS, D. C. ; BATISTA, R. C. ; Da SILVA, I. S. GIL, E. S.; ANGNES, L.;** *Electrochemical Remediation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2013, v. 7, p. 344-350.*

O desenvolvimento tecnológico tem levado ao surgimento de novas substâncias com diversas finalidades produzindo um novo perfil de poluentes nos cursos de água. Entre estes, uma classe de compostos conhecidos como desreguladores endócrinos são de grande importância devido à sua ampla aplicação e consequências danosas para o meio ambiente, a saúde humana e dos animais. A baixa eficiência da maioria dos processos de tratamento de água para a remoção das referidas substâncias representa uma preocupação mundial para o desenvolvimento de métodos eficazes e ambientalmente limpos. Os processos de remediação eletroquímicos surgem como uma alternativa poderosa e "verde" para a remoção de resíduos de poluentes orgânicos ou inorgânicos de ambientes complexos, como a geosfera e hidrosfera. O foco das pesquisas nesta área do conhecimento está principalmente relacionado com a melhoria nos processos de desenvolvimento de dispositivos eletrônicos com maior eficiência fotocatalítica, enquanto que o material de partida continua a ser baseado em eletrodos convencionais de metal e carbono. No presente estudo, o processo de remoção eletroquímica de 17EE usando folhas de papel de carbono como material eletrodico foi investigado em condições estacionárias e hidrodinâmico. Foram avaliadas a influência do pH e do potencial aplicado, sempre levando em conta a transposição de aspectos de escala e ambiental. Dessa forma, o princípio da remoção do composto mostrou-se estritamente relacionada com esses parâmetros. Observou-se que o meio levemente alcalino favorece a oxidação, enquanto que o meio levemente ácido ou neutro pode levar a uma maior adsorção dos subprodutos da oxidação na superfície do carbono. Além disso, quando o potencial aplicado foi superior a 1,25 V, o aumento da taxa de oxidação eletroquímica, e a adsorção foi diminuída. Além disso, a eficiência de remoção de 17EE mostrou ser inferior, em velocidade de fluxo mais elevadas.

**2 - ZHANG, B.; CHENG, X. R.; Da SILVA, I. S.; HUNG, V. W. S.; VELOSO, A. J.; ANGNES, L.; KERMAN, K. *Electroanalysis of the interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and amyloid- $\beta$  in the presence of copper. *Metallomics*, 2013, v. 5, p. 259-264.***

O enrolamento incorreto do peptídeo beta-amilóide ( $A\beta$ ) é uma das principais características patológicas da doença de Alzheimer (AD). Os polifenóis são poderosos antioxidantes e quelantes de metais, com características que são de valores terapêuticos benéficos para o seu desenvolvimento como candidatos visando combater as doenças neurodegenerativas e induzidas por metal. Neste trabalho, foram demonstradas as propriedades eletroquímicas de um componente do chá verde, (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), e sua atividade potente frente a peptídeos ( $A\beta$ ). A interação entre EGCG com  $A\beta(1-40)$  e Cu (II) foi examinada usando voltametria de onda quadrada (SWV). A detecção foi baseada na oxidação do resíduo de tirosina (Tyr-10) da  $A\beta(1-40)$ . A agregação do peptídeo afetava em alguma extensão a exposição do resíduo de tirosina, e este efeito tornava-se evidente nas mudanças no sinal de corrente de oxidação. Este método foi extremamente útil no controle, não somente do estado de agregação de  $A\beta(1-40)$ , mas também na progressão das suas alterações estruturais e conformacionais, juntamente com outras espécies nos primeiros estágios de agregação. Estudos comparativos sobre as interações flavonóide-metal entre EGCG e Cu (II), foram realizados em várias concentrações, períodos de incubação e condições da solução. Espectrofotometria de UV-vis também foi utilizada para estudar a quelação de Cu (II) com EGCG. A interação do Cu (II) íons com o resíduo de Tyr-10 da ( $A\beta$ ) foi afetada pelos resíduos vizinhos de histidina. As alterações morfológicas resultantes da ligação de EGCG e Cu (II) também foram elucidadas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados obtidos por estudos ópticos e eletroquímicos neste trabalho podem acelerar os esforços na descoberta de fármacos, com propriedades anti-agregação e antioxidantes quelantes de metais bem estabelecida da EGCG sendo facilmente aplicado em futuros estudos

de desenho racional de fármacos para tratamento AD. Nesse contexto as técnicas eletroanalíticas demonstraram serem promissoras para facilitar a investigação de metais e flavonóides em estudos de triagem de drogas.

**3 - Da SILVA, I. S.; ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C.; ANGNES, L. *Direct nitrate sensing in water using an array of copper-microelectrodes from flat flexible cables. Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2013, v. 188, p. 94-98**

A determinação de nitrato apresenta grande importância para o monitoramento de análises ambientais. Neste trabalho foi explorado um novo procedimento para ativação de eletrodo de cobre na presença de baixas quantidades de cloreto e aplicado para a determinação de nitrato empregando um arranjo de microeletrodos de cobre feitos a partir de cabos flexíveis de computador. O método proposto apresentou melhorias no comportamento electrocatalítico para redução de nitrato comparado com o eletrodo de cobre limpo. Nas condições de trabalho o método apresentou faixa linear de trabalho no intervalo de concentrações compreendendo 10 a 1070 mol L<sup>-1</sup>, com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,999$  (n = 12) e limite de detecção de 1,8 mol L<sup>-1</sup>. Mediante o emprego da técnica de adição de padrão, testes de recuperação apresentaram valores entre 93–103%, mostrando exatidão satisfatória para o método proposto. Além disso, o novo sensor foi aplicado para determinação de nitrato em amostras de água mineral e os resultados obtidos foram concordantes com aqueles obtidos pela técnica de eletroforese capilar de acordo com o teste T-Student a um nível de confiança de 95%.

## APÊNDICE 2

### Atividades realizadas durante o doutorado

#### *Artigos publicados em periódicos indexados*

1. Da SILVA, I. S.; CAPOVILLA, B.; FREITAS, K. H. G.; ANGNES, L.. *Strategies to avoid electrode fouling for nimesulide detection using unmodified electrodes. Analytical Methods*, **2013**, v. 5, p. 3546-3551.
2. Da SILVA, I. S.; ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C.; ANGNES, L. *Direct nitrate sensing in water using an array of copper-microelectrodes from flat flexible cables. Sensors & Actuators: B. Chemical*, **2013**, v. 188, p. 94-98
3. Da SILVA, I. S.; VIDAL, D. T. R.; Do LAGO, C. L.; ANGNES, L. *Fast simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. Journal of Separation Science*, **2013**, v. 36, p. 1405-1409.
4. ZHANG, B.; CHENG, X. R.; Da SILVA, I. S.; HUNG, V. W. S.; VELOSO, A. J.; ANGNES, L.; KERMAN, K. *Electroanalysis of the interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and amyloid- $\beta$  in the presence of copper. Metallomics*, **2013**, v. 5, p. 259-264.
5. LINO, F. M. A. ; DIAS, D. C. ; BATISTA, R. C. ; Da SILVA, I. S. GIL, E. S.; ANGNES, L.;. *Electrochemical Remediation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **2013**, v. 7, p. 344-350.
6. Da SILVA, I. S.; ARAÚJO, M. F. A.; FERREIRA, H. A.; VARELA Jr., J. J. G.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A.; ANGNES, L. *Quantification of N-acetylcysteine in pharmaceuticals using cobalt phthalocyanine modified graphite electrodes. Talanta*, **2011**, v. 83, p. 1701-1706.

## **Trabalhos apresentados**

### **Congressos nacionais**

1. Da SILVA, I. S.; PEDROTTI, J. J.; AUGELLI, M. A.; ANGNES, L.. *Análise de cobre em águas utilizando arranjo de microeletrodos de ouro obtidos de chips eletrônicos*, Livro de resumos do XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Bento Gonçalves, **2011**.
2. BATISTA, R. C.; CORDEIRO, D. D.; SOUZA, M.; Da SILVA, I. S.; ANGNES, L.; GIL, E. S. *Remediação Eletroquímica do 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol Sob Diferentes Regimes de Agitação e Força Eletromotriz*. Abstract in 3rd International Workshop Advances in Cleaner Production, Sao Paulo, **2011**.
3. SHIMADA, R. T.; FELIX, F. S.; Da SILVA, I. S.; ANGNES, L.. *Sistema amperométrico robusto para o monitoramento contínuo de H<sub>2</sub>S em águas*. Livro de resumos da 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, **2011**.
4. Da SILVA, I. S. ; VARELA Jr., J. de J. G.; TANAKA, A. A. ; ANGNES, L.. *Quantificação amperométrica de N-acetil-cisteína em produtos farmacêuticos utilizando eletrodos modificados*. Livro de resumos da 33<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, **2010**.
5. CAPOVILLA, B.; ANGNES, L.; Da SILVA, I. S.; FREITAS, K. H. G.. *Determinação voltamétrica por onda quadrada (SWV) de Nimesulida em fármacos utilizando eletrodo de carbono vítreo*. Livro de resumos da 33<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, **2010**.

### **Congressos Internacionais**

1. Da SILVA, I. S.; VIDAL, D. T. R.; Do LAGO, C. L.; ANGNES, L.. *Fast Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim by Capillary Zone Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity (C4D) Detection*. Abstract, In: *Pittsburgh Conference*. Orlando, 2012.
2. CAPOVILLA, B.; FREITAS, K. H. G.; SILVA, I. S.; ANGNES, L.. *Determination of nimesulide in pharmaceutical products using square wave voltammetry and flow injection analysis*. Abstract In: *ISE Spring Meeting*. Turku, 2011.

### ***Estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Toronto***

Estágio realizado na Universidade de Toronto campus Scarborough sob a supervisão do prof. Dr. Kagan Kerman durante o período de junho de 2012 a dezembro de 2012.

### ***Estágio Supervisionado em Docência***

Ao longo deste doutorado foram realizadas atividades de ensino na condição de monitor no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) do IQ-USP.

Durante o primeiro semestre de 2010, o aluno participou do estágio supervisionado de docência como monitor da disciplina QFL3203 (Química Analítica Instrumental) oferecida ao curso de química noturno.

Durante o segundo semestre e 2010, o aluno participou do estágio supervisionado de docência como monitor da disciplina Química Analítica (QFL0230) oferecida ao curso de farmácia noturno.

Durante o segundo semestre e 2012, o aluno participou do estágio supervisionado de docência como monitor da disciplina, Química Analítica II (QFL0230) oferecida ao curso de química noturno.