Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Eletrodos quimicamente modificados com Poli (benzil viologênio): comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados".

Laila Aparecida Deliberto

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO-SP
2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Eletrodos quimicamente modificados com Poli (benzil viologênio): comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados".

LAILA APARECIDA DELIBERTO

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Prof. Dr. Zeki Naal
Orientador

RIBEIRÃO PRETO – SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Deliberto, Laila Aparecida
Eletrodos quimicamente modificados com Poli (benzil viologênio): comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados. Ribeirão Preto, 2013.
122 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.
Orientador: Naal, Zeki.

1. Poli (benzil viologênio). 2. Eletrodos quimicamente modificados. 3. Clonazepam. 4. Nitrazepam. 5. Nimesulida. 6. Análise de fármacos.

Dedicatória

À minha querida mãe, irmã e ao meu namorado

por todo carinho, paciência e amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela conclusão deste trabalho, por ter direcionado meu caminho e me fortalecido neste trajeto.

À minha família: minha Mãe por todo o apoio, compreensão, carinho, dedicação, amor, força, orações, por tudo mãe, muito obrigada. Minha Irmã, que além do carinho e da força, dedicou parte do seu tempo me ajudando e ao meu Pai, que mesmo ausente durante a realização deste trabalho, não poupou esforços durante sua vida para que eu tivesse uma boa educação.

Ao meu namorado por todo amor, compreensão e carinho nessa trajetória.

Aos amigos: dentro e fora da faculdade, pela amizade e por terem compreendido e me apoiado. À Rosana, pelas palavras confortantes, carinho e paz e à Perpétua, muito obrigada Per, pela ajuda, carinho, apoio e compreensão. Aos alunos que passaram pelo laboratório; à Marcela, que tanto me inspirou na Pós-graduação e pela amizade e ao David pelo apoio e amizade.

À prof[a]. Rose, pelo carinho, compreensão, ensinamentos e paciência.

Ao prof. Flávio da FCFRP pela ajuda na síntese do material e ao seu aluno Lucas Rezende pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN ^{1}H.

Aos profs. Paulo Olivi (FFCLRP), Adalgisa Rodrigues de Andrade (FFCLRP) e Roberto Santana (FCFRP) pelo empréstimo de equipamentos. À Franciane Cardoso (orientada da prof[a]. Adalgisa) pela ajuda com o potenciostado de seu laboratório e à Fabiana (Pós-doc. no laboratório do prof. Roberto Santana) pela ajuda na utilização do HPLC.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo aceite de minha matrícula na Pós-Graduação e respaldo financeiro. Ao departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela contribuição para minha formação e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica pelo apoio financeiro.

E, com muita gratidão ao Zeki, meu orientador e chefe. Agradeço pela orientação e por ter acreditado no meu trabalho. Pelos ensinamentos, dicas, por toda paciência, compreensão, apoio e pela confiança...

Obrigada por tudo!

Resumo

RESUMO

Deliberto, L. A. **"Eletrodos quimicamente modificados com Poli (benzil viologênio): comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados"**. 122 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Na área da saúde, destacam-se alguns fármacos amplamente administrados, os quais possuem grupamentos nitro em suas moléculas, como o Clonazepam (CNZ), Nitrazepam (NTZ) e Nimesulida (Nimes). O CNZ e o NTZ são utilizados ilicitamente em coquetéis entorpecentes, fragilizando vítimas. A Nimes é anti-inflamatório amplamente administrado e frequentemente usado sem prescrição médica. As metodologias de detecção e quantificação destes fármacos são, na sua maioria, dispendiosas, desenvolvidas por HPLC, GC, etc. Poucos trabalhos utilizam determinação eletroanalítica e dentre eles, menos ainda utilizam eletrodos quimicamente modificados (EQMs). Os EQMs melhoram a seletividade e sensibilidade das análises. Dentre as formas de modificação, a metodologia de filmes poliméricos é muito versátil e possibilita o desenvolvimento de eletrodos específicos. Uma classe importante de polímeros é a dos derivados de viologênio, como o Poli (benzil viologênio) (PBV). Este polímero é empregado com diferentes finalidades. Possui três estados de oxidação, um deles; o $PBV^{\cdot+}$ atua como mediador redox. E, a partir de experimentos prévios em nosso laboratório demonstrou ainda a possibilidade de atuar na redução de nitrocompostos. Neste sentido, este trabalho determinou as melhores condições experimentais para obtenção de um EQM com o PBV para seu emprego em análise e quantificação de fármacos nitroderivados (CNZ, NTZ e Nimes), bem como em amostras comerciais, utilizando a técnica de voltametria cíclica. Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de uma metodologia eficaz de modificação do eletrodo de carbono vítreo (CV) com o PBV sintetizado. Este método garantiu o controle da cobertura e a linearidade nas análises. Assim, o método foi padronizado com a aplicação de eletrólise por 30 s durante o terceiro ciclo em -0,4 V. A varredura adotada foi 50 mV s^{-1} de 0 a -0,8 V. Esse padrão forneceu de 2,0 a 3,0 nmol cm^{-2} de cobertura. O eletrodo CV-PBV não apresentou dificuldades na transferência de carga da superfície do eletrodo para o polímero, apesar do valor de k = 5,2 s^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. O valor do coeficiente difusional de cada fármaco foi determinado em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Os estudos de redução dos fármacos em diferentes pH_s estão de acordo com o mecanismo descrito na literatura. Além disso, os resultados indicam que o eletrodo modificado diminui a influência do pH sobre a redução dos fármacos. As quantificações dos fármacos foram feitas por curvas padrões com os eletrodos CV e Au, polidos e modificados. As correntes foram lineares até a concentração de 120 μmol L^{-1}. A modificação do eletrodo de CV com o PBV diminuiu, no mínimo, em aprox. 80 mV o potencial de redução dos fármacos em pH 7,0 em relação ao

eletrodo de CV polido. A exceção foi o eletrodo de ouro modificado (Au-PBV) na análise de Nimes. Pode-se ainda, atribuir à modificação do eletrodo com o PBV o aumento da sensibilidade das análises em comparação aos respectivos eletrodos polidos. Somente a determinação do NTZ não apresentou o mesmo efeito. O eletrodo CV-PBV foi empregado com sucesso na quantificação dos fármacos (NTZ, CNZ e Nimes) em amostras comerciais de Rivotril®, Sonebon® e Nimesulida - medicamento genérico. As quantificações apresentaram aproximadamente 100% de recuperação. A normalização das diferentes análises pelos valores das coberturas dos eletrodos mostrou uma curva analítica com boa correlação linear. Finalmente, os resultados apresentados neste trabalho sugerem a possibilidade de desenvolver eletrodos descartáveis. Estes eletrodos podem ser empregados na análise de substâncias utilizadas de forma ilícitas, neste caso, o coquetel chamado "Boa noite Cinderela", para uso da perícia forense em análise amperométrica, no próprio local investigado. Estes eletrodos também podem ser aplicados nas indústrias farmacêuticas, nos setores de controle de qualidade de fármacos e medicamentos.

Palavras-chave: Poli (benzil viologênio), eletrodos quimicamente modificados, Clonazepam, Nitrazepam, Nimesulida, análise de fármacos.

Abstract

ABSTRACT

Deliberto, L. A. **"Chemically modified electrodes with Poly (benzyl viologen): electrochemical behavior of nitro derivative drugs"**. 122 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

In health care, broadly administered drugs can be highlighted, which possess nitro group moieties within their molecules, such as the Clonazepam (CNZ), Nitrazepam (NTZ), and Nimesulide (Nimes). CNZ and NTZ are illicitly administered as part of narcotics drinks, weakening their victims. Nimes is an anti-inflammatory drug widely administered and often used in self-medication. Detection and quantification methods of these drugs are in the majority of cases costly and involve techniques such as HPLC, gas chromatography, etc. Only few studies have made use of electroanalytical determination, and among them, even fewer have made use of chemically modified electrodes (CME). CMEs improve selectivity and sensitivity of analysis. Among of modification methods, polymeric films are very versatile and make possible the development of specific electrodes. An important type of polymers comprise Viologen derivatives, such as Poly (benzyl viologen) (PBV). This polymer is used serving different purposes. This polymer has three oxidation states; one of them, $PBV^{\cdot+}$, acts as a redox mediator. Also in addition, our group has provided evidence for the possibility of $PBV^{\cdot+}$ to act reducing nitro compounds. In this way, in the present work it was determined the best experimental conditions for developing CME with PBV for further application in analysis and quantification of nitro derivative drugs (CNZ, NTZ and Nimes), as well as commercial samples, through the use of cyclic voltammetry technique. This work has contributed to the development of an effective methodology for the modification of glassy carbon (GC) electrodes with synthesized PBV. This method guaranteed the control of coverage and the linearity of the analysis. In this way, this method was standardized with a potential hold during the third cycle of about -0.4V for 30 sec. Scan rate of potential was 50 mV s^{-1}, from 0 to -0.8 V. This method provided a coverage 2.0 to 3.0 nmol cm^{-2}. The electrode GC-PBV did not show difficulties to charge transfer from the electrode surface to polymer, although the value of *k* was 5.2 s^{-1} in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution, pH 7.0. The difusional coefficient value of each drug was determined in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution, pH 7.0. Reduction studies of drugs in different pH_s were in agreement with mechanisms described in the literature. Furthermore, results suggest that modified electrode decreased pH influence regarding drug reduction. Drug quantification was achieved from standard curves using GC and gold electrodes, polished and modified. Currents were linear up to 120 μmol L^{-1}. GC electrode modification with PBV decreased, at least, in approximately 80 mV, the drug potential reduction at pH 7.0 compared to respective polished electrode. The exception was found for gold modified electrode during Nimes analysis. It can be also

attributed to modification with PBV the increase of analysis sensitivity when compared to respective polished electrodes. Only NTZ determination did not show the same effect. The GC-PBV was successfully employed for drug quantification (NTZ, CNZ and Nimes) from commercial samples, such as Rivotril®, Sonebon® and Nimesulide – generic medicine. Drug quantification exhibited recovery close to 100%. Standardization of different analysis by electrode coverage value showed good linear correlation. Finally, results suggest the possibility to develop disposable electrodes. These electrodes can be employed to illicit substance analysis, in the present case, the narcotic drinks known in Brazil as "Boa noite Cinderela", in addition to use in forensics during amperometic analysis at the site of investigation. Also, such electrodes could be used in pharmaceutical industries, for drug and medicine quality control.

Keywords: Poly (benzyl viologen), chemically modified electrodes, Clonazepam, Nitrazepam, Nimesulide, drugs analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: **Fórmulas estruturais dos fármacos CNZ, NTZ e Nimes**. **A-** Representação da estrutura química do Clonazepam (CNZ)**, B-** Representação da estrutura química do Nitrazepam (NTZ) e **C-** Representação da estrutura química da Nimesulida (Nimes). ***5***

Figura 2: **Representação da estrutura química do PBV**. ***9***

Figura 3: **Espectroeletroquímica do polímero PBV (1 mg mL^{-1}) em KBr 0,1 mol L^{-1}**. Espectros de absorção do eletrodo de ITO em solução aquosa do polímero (previamente desoxigenada). Eixo em 0,0 V absorção do PBV^{2+} durante a aplicação de potencial em 0,0 V. Eixo -0,4 V absorção do cátion radical formado durante a eletrólise em -0,4 V. ***25***

Figura 4: **Perfil voltamétrico do eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 20 mV s^{-1} após a modificação**. **A-** Modificação por consecutivas varreduras de 0 a -0,8 V a 50 mV s^{-1} (6 ciclos). ΔEp = 55 mV. **B-** Modificação com metodologia proposta neste trabalho. ΔEp = 15 mV. ***28***

Figura 5: **Perfil da formação da cobertura com o PBV sobre o eletrodo de CV em relação apenas a diferentes intervalos de eletrólise**. Gráfico dos valores de cobertura do eletrodo CV-PBV em função do tempo de eletrólise, de 30 a 300 s. O potencial aplicado foi -0,4 V. A cobertura foi determinada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. ***31***

Figura 6: **Comportamento eletroquímico do polímero [PBV]Br_2 em solução aquosa**. Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do PBV (1 mg mL^{-1}) em solução aquosa de KBr 0,1 mol L^{-1} previamente desoxigenada com argônio por 10 minutos. Eletrodo de trabalho CV, eletrodo auxiliar Pt, velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}. Início da varredura de potencial em 0,0 V. ***36***

Figura 7: **Comportamento eletroquímico do eletrodo CV-PBV em solução aquosa em diferentes velocidades de varredura**. Voltamogramas cíclicos referentes ao processo redox do eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1}. ***38***

Figura 8: **Variação dos valores de corrente de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura para o eletrodo CV-PBV em solução aquosa**. Os valores de corrente de pico foram obtidos por voltametria cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura, sendo: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1}. ***40***

Figura 9: **Gráfico de Laviron**. Valores de potencial de pico (anódico e catódico) correspondentes a diferentes velocidades de varredura (0,01 a 10 V s^{-1}) em função do logaritmo da velocidade de varredura. Valores obtidos para o eletrodo CV-PBV por voltametria cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. ***43***

Figura 10: **Determinação do teor de CNZ**. Gráfico dos valores das áreas dos picos em relação à concentração de CNZ (μg mL^{-1}). ***44***

Figura 11: **Representação da estrutura química do CNZ e seus respectivos pK_{as}**. Estrutura química do CNZ e os valores de seus pK_{as}: pK_{a1} = 1,95; pK_{a2} = 10,5. 315,72 g mol^{-1} [104]. ***45***

Figura 12: **Espectro de absorção de CNZ 50 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0; tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0; tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0. ***46***

Figura 13: **Representação da conjugação de elétrons da molécula de CNZ em pH 12,0**. Esquematização da molécula do CNZ totalmente desprotonada. ***46***

Figura 14 A: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **A-**Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ. ***48***

Figura 14 B: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **B-** Tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ. ***49***

Figura 14 C: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **C-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ. ***50***

Figura 14 D: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. D-** Tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ. *51*

Figura 14 E: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. E-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ. *52*

Figura 15: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em pH 12 em diferentes inícios de varredura de potencial a 10 mV s^{-1} com o eletrodo CV-PBV**. Voltamograma na cor preta: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em 0 V. Voltamograma na cor azul: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em + 0,2 V . Voltamograma na cor vermelha: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em +0,4 V. *55*

Figura 16: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CV-PBV em pH 12 em diferentes inícios de varredura de potencial a 10 mV s^{-1}**. Voltamograma na cor preta: CV-PBV em pH 12,0, varredura iniciada em 0 V. Voltamograma na cor azul: CV-PBV em pH 12,0, varredura iniciada em + 0,2 V . Voltamograma na cor vermelha: CV-PBV em pH 12,0, varredura iniciada em +0,4 V. *56*

Figura 17: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de CNZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. *58*

Figura 18: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de CNZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. *59*

Figura 19 A: **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. A-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) nos respectivos potenciais de redução do CNZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 140 μmol L^{-1}. Dados: CV = Ep_c ~ -0,590 V, CV-PBV = Ep_c -0,420 V, Au = Ep_c ~ -0,560 V e Au-PBV = Ep_c -0,430 V. *61*

Figura 19 B: **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. B-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução do CNZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 100 μmol L^{-1}. Dados: cobertura calculada para CV-PBV 3,0 x 10^{-9} mol cm^{-2}, para Au-PBV 1,5 x 10^{-9} mol cm^{-2}, valores das áreas geométricas para os eletrodos polidos: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2. CV = Ep_c ~ -0,590 V, CV-PBV = Ep_c -0,420 V, Au = Ep_c ~ -0,560 V e Au-PBV = Ep_c -0,430 V. *62*

Figura 19 C: **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) obtidos em -0,420 V para todos os eletrodos de trabalho em função das mesmas concentrações de CNZ analisadas. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 140 μmol L^{-1}. *64*

Figura 20: **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de CNZ adicionada, inclusive para o fármaco Rivotril®. Os pontos apresentados são as médias de três determinações feitas em dias diferentes com diferentes eletrodos CV-PBV. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. *66*

Figura 21: **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de CNZ adicionada, inclusive para o fármaco Rivotril®, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Três análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. *68*

Figura 22: **Representação da estrutura química do NTZ e seus respectivos pK_{as}.** Estrutura química do NTZ e os valores de seus pK_{as}: pK_{a1} = 2,98; pK_{a2} = 10,55. 281,27 g mol^{-1} [107]. *69*

Figura 23: **Espectro de absorção de NTZ 50 μmol L^{-1} em diferentes pH_s.** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0; tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0; tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0. *71*

Figura 24 A: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. A-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ. *73*

Figura 24 B: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. B-**Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ. *74*

Figura 24 C: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s.** C-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ. *75*

Figura 25: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de NTZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 *77*

Figura 26: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de NTZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. *78*

Figura 27 A: **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. A-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) nos respectivos potenciais de redução do NTZ obtidos para as análises utilizando cada um dos eletrodos de trabalho. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. Dados: CV = E_{pc} ~ -0,560 V, CV-PBV = Ep_c -0,470 V, Au = Ep_c ~ -0,590 V e Au-PBV = Ep_c -0,470 V. *81*

Figura 27 B: **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. B-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução do NTZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. Os valores de cobertura calculados foram 2,7 x 10^{-9} mol cm^{-2} para CV-PBV e 1,6 x 10^{-9} mol cm^{-2} para Au-PBV e os valores das áreas geométricas para os eletrodos polidos foram: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2. CV = E_{pc} ~ -0,560 V, CV-PBV = Ep_c -0,470 V, Au = Ep_c ~ -0,590 V e Au-PBV = Ep_c -0,470 V. *82*

Figura 27 C: **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) obtidos em -0,470 V (para todos os eletrodos de trabalho) em função das mesmas concentração de NTZ analisadas com todos os eletrodos. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. ***83***

Figura 28: **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de NTZ adicionada, inclusive para o fármaco Sonebon®. Os pontos apresentados são as médias de três determinações feitas em dias diferentes com eletrodos CV-PBV diferentes. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. ***85***

Figura 29: **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de NTZ adicionada, inclusive para o fármaco, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Três análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. ***87***

Figura 30: **Representação da estrutura química da Nimes e seu pK_a.** Estrutura química da Nimes. Valor de pK_a: 6,5. 308,311 g mol^{-1} [109]. ***88***

Figura 31: **Espectro de absorção da Nimes 50 μmol L^{-1} em diferentes pH_s.** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 [108]. ***90***

Figura 32: **Estabilização da carga negativa da Nimes após desprotonação**. Estruturas ressonantes referentes à estabilização da molécula após desprotonação em solução aquosa com valores de pH superiores ao pK_a [108]. ***90***

Figura 33 A: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico da Nimes 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. A-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de Nimes. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de Nimes. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de Nimes. ***92***

Figura 33 B: **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico da Nimes 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. B-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor preta: eletrodo CV-PBV na ausência de Nimes. Voltamograma na cor azul: eletrodo CV na presença de Nimes. Voltamograma na cor vermelha: eletrodo CV-PBV na presença de Nimes. ***93***

Figura 34: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de Nimes 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. ***95***

Figura 35: **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de Nimes 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. ***96***

Figura 36 A: **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. A-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) nos respectivos potenciais de redução da Nimes obtidos para as análises utilizando cada um dos eletrodos de trabalho. Concentrações de Nimes totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. ***99***

Figura 36 B: **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. B-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) obtidos em -0,590 V para os eletrodos CV e CV-PBV em função das mesmas concentrações de Nimes analisadas. Concentrações totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. ***100***

Figura 36 C: **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução da Nimes obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de Nimes totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. Os valores de cobertura calculados foram: 2,9 x 10^{-9} mol cm^{-2} para CV-PBV e 6,9 x 10^{-10} mol cm^{-2} para Au-PBV e os valores das áreas geométricas para os eletrodos de CV e Au polidos foram: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2. ***101***

Figura 37: **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de Nimes adicionada, inclusive para o medicamento genérico. Os pontos apresentados são as médias de duas determinações feitas em dias diferentes com eletrodos CV-PBV diferentes. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. ***103***

Figura 38: **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de Nimes adicionada, inclusive para o medicamento genérico, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Duas análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. ***105***

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área do eletrodo
Ag	Prata
$Ag/AgCl_{(s)}/KCl_{(sat)}$.	Prata/Cloreto de prata, solução de saturada de KCl
Aprox.	Aproximadamente
Au	Ouro
Au-PBV	Ouro modificado com o polímero PBV
C	Carbono
℃	Grau Celsius
CNZ	Clonazepam
CV	Carbono vítreo
CV-PBV	Carbono vítreo modificado com o polímero PBV
COX-1	Enzima Ciclo-Oxigenase - Tipo 1
COX-2	Enzima Ciclo-Oxigenase - Tipo 2
D	Dupleto
D	Coeficiente difusional das espécies redox
DMSO	Dimetilsulfóxido
D_2O	Água deuterada
Ep_a	Potencial de pico anódico
Ep_c	Potencial de pico catódico
Ej	Potencial médio (Ep_a+Ep_c/2)
ΔEp	Diferença de potencial de pico
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
F	Constante de Faraday (96485,3399 C mol^{-1})

GC	(Gas Chromatography) - Cromatografia a gás
H	Hidrogênio
Hg	Mercúrio
HPLC	(High Performance Liquid Chromatography) - Cromatografia líquida de alta eficiência
I	Corrente
Ip_a	Corrente de pico anódico
Ip_c	Corrente de pico catódico
ITO	Filme de óxido de Estanho dopado com Índio
ITO-PBV	ITO modificado com PBV
j	Densidade de corrente
J	Constante de acoplamento
k	Constante de transferência de carga
KBr	Brometo de Potássio
m	Multipleto
MHz	Mega-hertz
min	Minutos
n	Número de mols envolvidos na reação
$NaPF_6$	Hexafluorfosfato de Sódio
Nimes	Nimesulida
NTZ	Nitrazepam
PbO_2	Óxido de Chumbo
PBV	Poli (benzil viologênio)
$PBV^{\bullet+}$	PBV espécie cátion radical

PBV^0	PBV espécie neutra
PBS	Phosphate buffer solution
PF_6^-	Contraíon Hexafluorfosfato
pH	-log da concentração do íon hidrogênio
pK_a	-log da constante de ionização do ácido
Pt	Platina
R	Constante universal dos gases perfeitos (8,3 J K^{-1} mol^{-1})
R^2	Coeficiente de correlação dos pontos
rad	Radianos
RMN ^{1}H	Espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
s	Singleto
t	Tripleto
T	Temperatura (298 K)
UV-Vis	Comprimentos de onda ultravioleta-visível
V	Volts
α	Coeficiente de transferência de eletrons
Γ	Cobertura do eletrodo de trabalho
δ	Deslocamento químico
ν	Velocidade de varredura de potencial
υ	Viscosidade cinemática do meio
ϖ	Velocidade angular

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **iv**
LISTA DE FIGURAS ..... **vii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **xiv**
INTRODUÇÃO 1
1. INTRODUÇÃO 2
1.1 Fármacos nitroderivados 2
1.2 Reações do grupo NO_2 5
1.3 Eletrodos quimicamente modificados (EQM) 6
OBJETIVOS **12**
2. OBJETIVOS 13
2.1 Objetivos específicos 13
MATERIAIS E MÉTODOS **14**
3. MATERIAIS E MÉTODOS 15
3.1 Materiais 15
3.1.1 Reagentes 15
3.1.2 Instrumentação 16
3.2 Métodos 17
3.2.1 Síntese do polímero Poli (benzil viologênio) – $[PBV]Br_2$ 17
3.2.2 Experimentos 17
3.2.2.1 UV-Vis 17
3.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência 18
3.2.2.3 Espectroeletroquímica 18
3.2.2.4 Voltametria cíclica 18
3.2.2.4.1 Preparo do eletrodo modificado 19
3.2.2.4.2 Comportamento eletroquímico dos fármacos CNZ, NTZ e Nimes 20
3.2.2.4.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo 20
3.2.2.4.4 Detecção de CNZ, NTZ e Nimes 20
3.2.2.4.5 Análise de amostras comerciais 21
RESULTADOS e DISCUSSÃO **23**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
4.1 Caracterização do polímero PBV 24
4.1.1 Espectroeletroquímica 24
4.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^{1}H) 26
4.2 Modificação do eletrodo de CV com PBV 27
4.3 Parâmetros cinéticos 37
4.4 Clonazepam 44
4.4.1 Determinação do teor de CNZ 44
4.4.2 Espectros de absorção em diferentes pH_s 45
4.4.3 Comportamento eletroquímico do CNZ em diferentes pH_s 47
4.4.4 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo 57
4.4.5 Detecção de CNZ 60
4.4.6 Análise de amostras comerciais 65
4.5 Nitrazepam 69
4.5.1 Espectros de absorção em diferentes pH_s 69
4.5.2 Comportamento eletroquímico do NTZ em diferentes pH_s 71
4.5.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo 76
4.5.4 Detecção de NTZ 79
4.5.5 Análise de amostras comerciais 84
4.6 Nimesulida 88
4.6.1 Espectros de absorção em diferentes pH_s 88
4.6.2 Comportamento eletroquímico da Nimes em diferentes pH_s 91
4.6.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo 94
4.6.4 Detecção de Nimes 97
4.6.5 Análise de amostras comerciais 102
CONCLUSÃO 106
5. CONCLUSÃO 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 110
ANEXOS 121
A. Espectro de RMN ^{1}H do $[PBV]Br_2$, solubilizado em D_2O, 500 MHz 122

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos nitroderivados

As reações de redução de compostos nitroaromáticos vêm sendo estudadas detalhadamente devido às diversas possibilidades de emprego desses compostos. Dentre elas, podem ser citadas: a utilização em agroquímicos e explosivos que geram efeitos poluentes no meio ambiente [1-3]; o emprego em grande parte dos produtos farmacêuticos os quais, consequentemente, são introduzidos em organismos vivos. Uma vez no organismo, estes compostos se envolvem em processos de oxidação-redução durante seu metabolismo. Ressaltando a importância destes compostos, acrescenta-se o emprego destas moléculas no desenvolvimento de novos fármacos. Assim, têm-se necessidade de conhecer o mecanismo de ação destes grupos presentes em moléculas naturais ou sintéticas.

Uma importante classe de fármacos, que possui o grupo nitro em determinadas moléculas, é a dos benzodiazepínicos, dos quais podem ser citados o CNZ (**fig**. **1 A**) e o NTZ (**fig**. **1 B**) dentre outros. A importância destacada nesta classe de fármacos está relacionada ao seu efeito sedativo.

Devido à ação inibitória das funções do sistema nervoso central, estes fármacos têm sido utilizados ilícitamente como drogas facilitadoras de roubos [4,5]. A ingestão de elevados níveis de benzodiazepínicos (aproximadamente 4 mg) é capaz de produzir forte sedação, sonolência e amnésia. Sob estes efeitos, as vítimas assumem um estado de incapacidade de defesa e inconsciência, tornando-se facilmente manipuláveis [6]. Os benzodiazepínicos são utilizados separadamente ou ainda fazendo parte de um coquetel com outras drogas ilícitas; por exemplo, Extasy. Este coquetel é conhecido no Brasil como: “Boa noite Cinderela”. Para potencializar o efeito hipnótico/sedativo destes fármacos, os mesmos ainda são misturados em bebidas alcoólicas [7].

Os benzodiazepínicos estão entre os fármacos mais amplamente prescritos (licitamente) no tratamento de stress, ansiedade, sindrome do pânico, depressão e distúrbios do sono, espasmos musculares e crises convulvivas, entre outros. Infelizmente estão frequentemente envolvidos em casos de overdose [8].

Os fármacos benzodiazepínicos e seus metabólitos são rotineiramente detectados e quantificados na área de toxicologia forense em amostras de sangue, urina e bebidas. Normalmente, como já foi dito, estas amostras são provenientes de vítimas dopadas e envolvidas em roubos e acidentes [9]. Os testes utilizados são, em alguns casos, apenas colorimétricos. Ensaios deste tipo podem oferecer resultados falso positivos, além de não possuírem boa sensibilidade. Outros testes utilizados são os imunológicos e cromatográficos. Estes ensaios são utilizados conjuntamente [10], ou seja, os propensos fármacos existentes nas amostras são pré-selecionados através do método imunológico e, posteriormente quantificados pelo método cromatográfico [11-13].

Os imunoensaios utilizados na pré-seleção não são específicos, ou seja, podem oferecer uma resposta errônea para determinados fármacos [14]. E os métodos cromatográficos instrumentais (HPLC e GC) são relativamente dispendiosos, requerem mão de obra especializada, reagente de alta pureza e as amostras, geralmente, passam por um processo de extração antes de serem injetadas no cromatógrafo. Estas exigências das técnicas geram maior custo operacional e requerem maior tempo para obetenção dos resultados.

Outra classe de fármacos que merece destaque devido a sua ampla administração é a dos anti-inflamatórios. Pertencente a esta classe de fármacos, a Nimes (**fig**. **1 C**) é um anti-inflamatório não esteroidal e também é um composto nitroderivado. Clinicamente, estudos têm estabelecido sua efetividade na analgesia, nos processos inflamatórios e no combate a hipertermia [15]. A Nimes é um anti-inflamatório seletivo da Ciclo-Oxigenase-2 (COX-2). Este tipo específico de anti-inflamatórios é relativamente novo no mercado (em média 12 anos), quando comparados aos anti-inflamatórios gerais que possuem quase um século de existência.

Tanto a COX-1 (Ciclo-Oxigenase-1) quanto a COX-2 são de extrema importância na cascata do ácido araquidônico, especificamente na síntese de prostaglandina. Altos níveis de prostaglandina elevam a temperatura corpórea, além de sensibilizar a as terminações nervosas no local acometido, causando a dor [16]. As Ciclo-Oxigenases são atuantes no processo inflamatório e também na regulação normal do organismo. Especificamente, a COX-1 é responsável pela síntese de substâncias relacionadas ao processo regulatório normal do organismo, já a COX-2 tem suas funções condicionadas aos estímulos inflamatórios locais.

Desta forma, o emprego de fármacos seletivos apenas para a inibição da COX-2 diminui as reações adversas causadas pelos anti-inflamatórios não específicos, como por exemplo, a dor causada no estômago devido à falta de proteção da mucosa desta região. A proteção da mucosa é função da COX-1, uma vez inibida pela ação dos anti-inflamatórios não específicos, deixa de desempenhar esta e outras funções.

A determinação quantitativa da Nimes é muito importante tanto no controle de qualidade em formulações farmacêuticas, quanto em diagnósticos clínicos de matrizes biológicas. Existem na literatura alguns métodos analíticos empregados na determinação da Nimesulida, como a fluorimetria, espectrofotometria e vários métodos cromatográficos (HPLC, GC entre outros) [17]. A maioria dos métodos cromatográficos instrumentais, como já foi dito, determinam um custo elevado com mão-de-obra especializada, reagentes, muitas etapas de manipulação, etc., os outros métodos de determinação, fluorimetria e espectrofotometria, possuem baixa sensibilidade e podem acusar resultado falso positivo. Portanto, o desenvolvimento de uma nova ferramenta analítica, que seja de fácil manipulação, baixo custo operacional e sensível é muito pertinente para a análise dos fármacos citados.

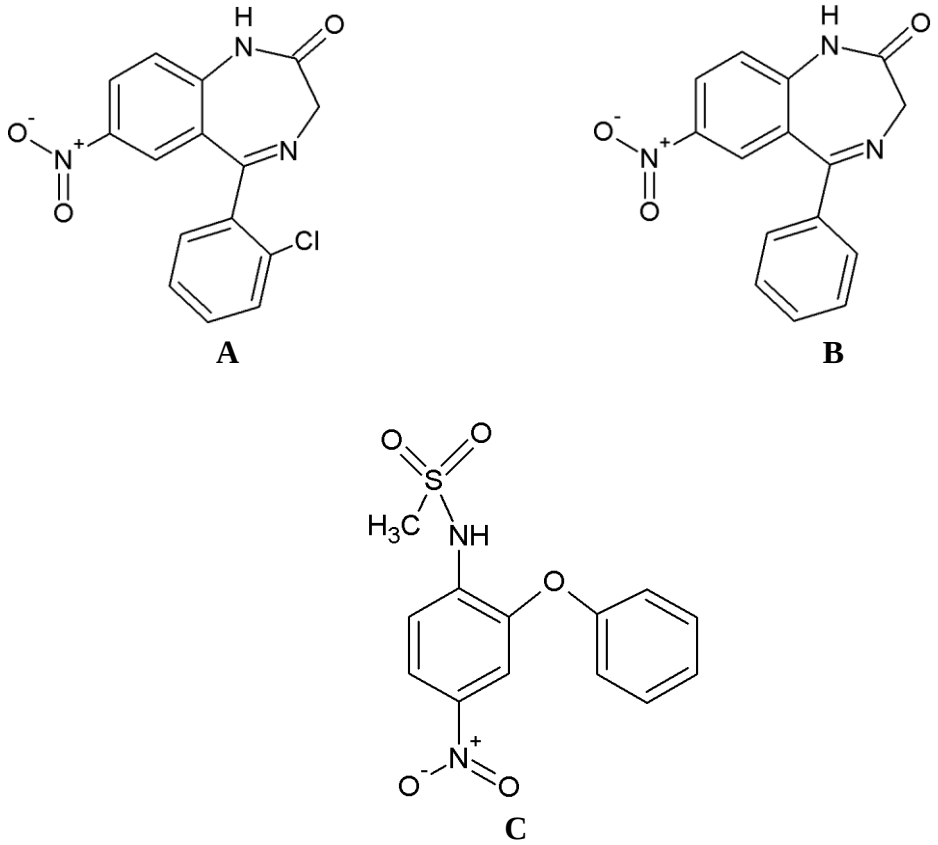


Figura 1. **Fórmulas estruturais dos fármacos CNZ, NTZ e Nimes**. **A**- Representação da estrutura química do Clonazepam (CNZ)**, B**- Representação da estrutura química do Nitrazepam (NTZ) e **C**- Representação da estrutura química da Nimesulida (Nimes).

1.2 Redução do grupo NO_2

Todos os fármacos citados possuem grupamento nitro em suas moléculas, os quais podem sofrer reações de redução durante o processo de metabolização no organismo. Desta forma, o grupo nitro pode ser detectado tanto no sangue (plasma), quanto na urina. No plasma, grupo nitro é detectado na estrutura do fármaco que está em sua forma íntegra, já na urina, em grande proporção, o grupo nitro está presente na estrutura do metabólito ou, em menor quantidade, na forma não metabolizada do fármaco.

No processo de redução dos grupos NO_2, espécies tóxicas podem ser geradas como foi apontado, por exemplo, no estudo desenvolvido para a Flutamida, (4-nitro-3-trifluorometil-isobutilanilida) [18]. A Flutamida é um medicamento nitroaromático usado no tratamento de câncer de prostata avançada. O estudo apontou a formação de radicais-livres a partir da redução eletroquímica via 1 elétron da Flutamida.

O comportamento eletroquímico de nitroaromáticos em solução aquosa foi estudado [19-23] e segue as etapas do mecanismo proposto no **esquema 1**. No qual, a redução de um nitroaromático a hidroxilamina, ocorre via formação de dihidroxilamina (Reação 1) com subsequente desidratação (Reação 2) formando o derivado nitrosil (RNO). A redução do RNO ocorre em potenciais mais positivos que o RNO_2, o que resulta aparentemente num processo direto de 4 elétrons.

$$RNO_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons RN(OH)_2 \qquad (1)$$

$$RN(OH)_2 \longrightarrow RNO + H_2O \qquad (2)$$

$$RNO + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons RNHOH \qquad (3)$$

Esquema 1. **Redução do grupo NO_2 em meio aquoso**. Mecanismo geral da redução de nitrocompostos em meio aquoso.

O mecanismo de redução de nitrocompostos também foi estudado em diferentes meios, pH_s e eletrodos (Hg, C, Pt, Ag, Amálgama, PbO_2 e nanotubos de carbono) [24-37]. Alguns trabalhos abordaram a metodologia de pré-concentração e redissolução voltamétrica [38-42], os quais fornecem uma melhora no limite de detecção do método.

1.3 Eletrodos quimicamente modificados (EQM)

O emprego de EQMs na eletroanalítica, como amplamente divulgado, aumenta a especificidade da análise, seletividade e sensibilidade. Também contribui para uma maior linearidade na determinação dos analitos.

A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi utilizada pela primeira vez na eletroquímica por Murray e colaboradores, na década de 70. Designaram por este nome, eletrodos que possuíam espécies ativas imobilizadas em suas superfícies [43]. O principal objetivo da imobilização de substâncias ativas na superfície do eletrodo é estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução. Este procedimento determina uma forma de alterar a reatividade e seletividade do material original, formador da superfície do eletrodo de trabalho.

A modificação dos eletrodos propiciou o desenvolvimento de eletrodos específicos para vários fins e aplicações de interesse. O avanço tecnológico contribuiu para o desenvolvimento de uma ampla aplicação dos EQMs. Uma vez modificada a superfície do eletrodo, a detecção da substância que se deseja, agora ocorre via intermédio do modificador, ou seja, há uma reação específica entre as moléculas do modificador e da substância de interesse, gerando um sinal amplificado.

Em linhas gerais do desenvolvimento dos EQMs, há um trabalho na literatura que organiza em uma escala cronológica alguns estudos que marcaram o desenvolvimento dos EQMs [43]. Sendo eles: o estudo da imobilização de grupos funcionais com Cheek e Nelson em 1964, em 1965 a incorporação de catalisadores inorgânicos com Jasinski, em 1967 a incorporação de catalizadores biológicos com Updike e Hicks, em 1970 a utilização de filmes poliméricos com Diaz, proporcionando aos EQM estabilidade e seletividade, em 1975 com Murray e colaboradores o aparecimento da denominação EQM, na década de 80 destacou-se o estudo de Fleischmann com a introdução de microeletrodos modificados possibilitando a aplicação em vivo e, na mesma década, a modificação de matrizes inorgânicas e a aplicação de membranas biológicas com Miller e Millazo, respectivamente.

Ainda que não citado neste estudo cronológico, na mesma década dos estudos de Murray, Bockris e colaboradores [44] citam a contribuição de Lane e Hubbard em 1973. Lane e Hubbard desenvolveram o primeiro trabalho que apontou novas vantagens obtidas com a utilização de camadas orgânicas sobre o eletrodo de trabalho. Os autores utilizaram a modificação com o intuito de que este material modificador serviria como plataforma para a imobilização de outras substâncias redox, diminuindo assim, a perda da atividade redox causada pela adsorção direta da molécula biológica na superfície do eletrodo de trabalho. Este

estudo abriu novas frentes para os biossensores, uma vez que a imobilização de materiais biológicos pode ser feita de maneira a reduzir a perda da atividade deste material. Para exemplificar essa plataforma de imobilização de moléculas biológicas, podemos citar um trabalho que utilizou um polímero redox, um derivado de viologênio, na regeneração da enzima após sua atuação no substrato de interesse. Desta forma, a enzima permaneceu no eletrodo de trabalho atuando sobre substrato sem perda significativa de sua atividade [45].

Dependendo do material modificador, há um procedimento que melhor imobiliza-o na superfície do eletrodo. Os principais métodos de modificação são por adsorção, ligação covalente, filmes poliméricos e materiais compósitos. A adsorção é a incorporação do material por contato do eletrodo com a dissolução do material no solvente apropriado. Fornece no máximo uma monocamada e sofre o processo de dessorção por tendência natural do equilíbrio. O método de ligação covalente consiste em ligar covalentemente grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo com o material modificador. Fornece estabilidade, porém, requer maior tempo no procedimento e gera apenas uma monocamada. Um número muito pequeno de monocamadas desvia a análise da linearidade. No procedimento com materiais compósitos, são misturados dois compostos com características diferentes. Essa mistura resulta em um compósito com características físicas e eletroquímicas específicas. Pode gerar resistividade à análise e lixiviação do material redox na mistura. O material deixa a superfície do eletrodo após algumas repetições da análise. A utilização de filmes poliméricos na modificação dos eletrodos amplia enormemente a aplicação destes eletrodos para fins específicos, são mais versáteis e estáveis.

Na área da química de polímeros, encontram-se materiais com diversas características, possibilitando inúmeras criações e aplicações. Os filmes poliméricos possibilitam o desenvolvimento de diferentes eletrodos modificados, aumentando a reatividade e sensibilidade do eletrodo [46]. Os polímeros podem ser utilizados como catalisadores de reações redox [47], plataforma para a imobilização orientada de enzimas proporcionando a regeneração das mesmas sem perda da eficiência catalítica [48,49], materiais capazes de incorporar outras moléculas [50] ou ainda possibilitando a montagem de diferentes camadas na superfície do eletrodo controlando sua reatividade [51]. Além do mais, esse tipo de

modificação permite o controle sobre o crescimento das monocamadas formadas, as quais são fundamenteis para a amplificação do sinal obtido.

Dentre os polímeros utilizados na eletroquímica, uma ampla classe que pode ser citada devido a sua importância na eletroquímica é a dos polímeros derivados de viologênio [52]. São chamados de derivados de viologênio devido ao fato de serem originados da quaternização dos dois nitrogênios da 4,4'- bipidina. O poli (benzil viologênio) [PBV]Br_2 (**fig. 2**) (chamado de PBV) pertence a esta classe de polímeros, é um derivado de viologênio. Assim como estes derivados, o PBV é eletroativo e possui três estados de oxidação PBV^{2+}, $PBV^{\bullet+}$ e PBV^{0} [53,54] e sua principal característica é a fácil redução via um-elétron, a qual origina cátions radicais estáveis [55].

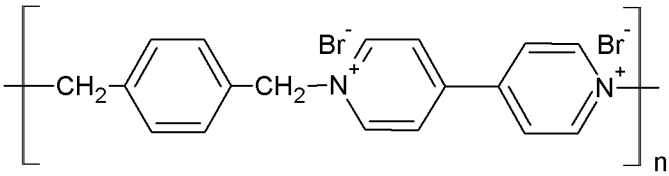


Figura 2. **Representação da estrutura química do PBV**.

Dentre as aplicações desses polímeros, podemos citar o emprego como mediadores de enzimas em biossensores (como já foi citado) ou ainda em sensores eletroquímicos atuando como mediadores na redução de outras moléculas de interesse [56-61]. Também são utilizados como intercaladores de ânions devido às cargas positivas [62] e ainda empregados na confecção de dispositivos fotocrômicos, devido à propriedade de mudança de cor quando o derivado passa a cátion radical [63].

Outra aplicação possível para os derivados de viologênio foi obtida a partir de estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório. O polímero N,N'-di (3-pirrol-1-il-propil) - 4,4'-bipiridina (DPPB) o qual, também é um derivado de viologênio, foi eletropolimerizado na superfície do eletrodo de carbono vítreo e apresentou atividade catalítica na redução de 4-nitrotolueno (NT). Este resultado possibilitou o emprego destes derivados no estudo da redução eletroquímica de nitrocompostos, em potenciais significativamente menores e com maior sensibilidade. Uma vez que as características são semelhantes para os polímeros dessa

classe, a possibilidade de aplicar o PBV na redução de outros compostos nitroderivados passou a ser considerada.

Buscando na literatura o emprego de EQMs na área da eletroanalítica, especificamente na detecção de nitrocompostos, que é foco deste trabalho, encontramos o emprego dos EQMs como metodologia mais sensível e seletiva para a análise de nitrocompostos. Abordando a modificação com algumas moléculas orgânicas, com metais, ou ainda em materiais compósitos como pasta de carbono [64-69]. Ainda a respeito da modificação de eletrodos e o emprego na análise de nitroderivados, pode-se citar o emprego de moléculas biológicas como modificadores, conferindo maior especificidade ao método. Estes modificadores são imobilizados na superfície do eletrodo por métodos de adsorção ou materiais compósitos [70-74]. Recentemente, a detecção de nitrocompostos vem sendo desenvolvida também com eletrodos modificados com nanomateriais, sejam eles nanopartículas ou nanoestruturas [75-77].

Na literatura existem pouquíssimos trabalhos que abordam o emprego de EQMs na detecção eletroquímica de fármacos nitroderivados como o CNZ, NTZ e Nimes. Apenas um trabalho, até o momento, que emprega o uso eletrodo modificado na quantificação de CNZ por detecção eletroquimiluminescente [78]. Já para o NTZ, são encontradas na literatura apenas abordagens de detecção eletroquímica direta feita com eletrodos sem modificações, as quais também não são encontradas em grande número [79-84]. Para a detecção eletroquímica da Nimes, até o momento, poucos trabalhos utilizam os EQMs como eletrodos de trabalho em análises eletroanalíticas [85-87].

Assim, mesmo com tantas vantagens, como as que foram aqui citadas, obtidas com o emprego de EQMs na determinação eletroanalítica, não há muitos trabalhos que fazem uso desta metodologia na detecção de fármacos nitroderivados. E nenhum, até o momento, utilizando o polímero PBV na modificação de eletrodos de trabalhos para análises diretas de CNZ, NTZ ou Nimes. O emprego de EQM com PBV na análise de fármacos nitroderivados traria inúmeros benefícios para as análises. Tornaria estas análises mais seletivas e sensíveis, diminuiria os custos de suas realizações, pois não necessitariam de equipamentos sofisticados, solventes e outros materiais. Também, o tempo gasto para finalizar as análises seria diminuído, uma vez que não seria necessário um pré-tratamento das amostras antes de

suas determinações. E por fim, a análise poderia ser desenvolvida no local, com o uso de dispositivos portáteis e microeletrodos impressos e descartáveis. Por exemplo, em indústrias, para controle de qualidade e na área de toxicologia forense, para a confirmação da existência de benzodiazepínicos nitroderivados em bebidas ou amostras biológicas.

Neste trabalho, está descrita a melhor condição para a modificação do eletrodo de carbono vítreo com o polímero PBV. É apresentado o estudo cinético, as características eletroquímicas dos eletrodos modificados, bem como o desenvolvimento das análises dos fármacos CNZ, NTZ e Nimes em meio aquoso e em diferentes pHs, além da determinação de suas curvas analíticas. Também é apresentada a aplicação do eletrodo CV-PBVem amostras comerciais, ou seja, dos respectivos medicamentos Rivrotril®, Sonebon® e Nimesulida - medicamento genérico, todos em solução aquosa.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados como o Clonazepam, Nitrazepam, e Nimesulida com eletrodos quimicamente modificados com o polímero Poli (benzil viologênio) - PBV.

2.1 Objetivos específicos

Para avaliar a influência da PBV sobre a redução de fármacos nitroderivados foi necessário:

- Sintetizar e caracterizar o polímero;
- Determinar o melhor procedimento para a modificação da superfície do eletrodo de trabalho;
- Desenvolver o estudo eletroquímico dos fármacos utilizando os eletrodos modificados e polidos pela técnica de voltametria cíclica;
- Determinar as curvas analíticas dos padrões dos fármacos analisados;
- Aplicar o eletrodo modificado na análise de amostras comerciais.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A água utilizada no preparo das soluções foi purificada através do sistema Millipore Milli-Q®. Nos experimentos de eletroquímica, as soluções eletrolíticas foram previamente borbulhadas com gás inerte (argônio 99,99% - White Martins) para a eliminação de oxigênio. O oxigênio é eletroativo no intervalo de potencial trabalhado, deste modo, sua remoção foi necessária. A acetonitrila (anidro 99,8%) (Sigma-Aldrich Co., Ltda) foi tratada previamente com peneira molecular (4Å) [63].

Os reagentes abaixo mencionados foram utilizados sem tratamento prévio.

Metanol (J. T. Baker, grau HPLC), éter etílico (Mallinckrodt Chemicals, anidro), brometo de potássio (Merck, 99%). Os reagentes hexafluorfosfato de sódio (98%), 1,4-bis-bromometil-benzeno (98%) e 4,4′- bipiridina (98%), fosfato de sódio monobásico (anidro, 99%), fosfato de sódio dibásico (anidro, 99%), fosfato de sódio tribásico (99,5%), água deuterada (99,8 %) e dimetilsulfóxido (DMSO – 99,5%) foram de procedência Sigma-Aldrich Co., Ltda. Ácido clorídrico, hidróxido de sódio (97%), acetato de sódio (97%), ácido bórico (99,5%) e ácido acético de procedência Synth.

Os fármacos 5-(2-clorofenil)-1,3-diidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona (Clonazepam – CNZ) e 1,3-diidro-7-nitro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona (Nitrazepam – NTZ) foram cedidos pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O fármaco *N*-(4-Nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida (Nimesulida - Nimes) foi de procedência Sigma-Aldrich Co., Ltda.

Os medicamentos utilizados nos experimentos com amostras comerciais foram: Rivotril® gotas 2,5 mg mL^{-1} (medicamento de referência que contém CNZ como princípio ativo) fabricado pelo laboratório Roche (lote nº RJ0437), Sonebon® comprimidos 5 mg

(medicamento que contém NTZ como princípio ativo) fabricado pelo laboratório EMS (lote nº L374507) e Nimesulida suspensão oral - gotas 50 mg mL^{-1}, medicamento genérico, fabricado pelo laboratório Biosintética - Ache (lote nº 1200095).

3.1.2 Instrumentação

Para a realização de medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato da marca Bioanalytical System (BAS) modelo CV 27 acoplado a um registrador X-Y e células eletroquímicas convencionais de três eletrodos; Ouro (Au) com área geométrica de 0,031 cm^2 ou Carbono vítreo (CV) com 0,071 cm^2 de área geométrica como eletrodos de trabalho, Platina (Pt) de grande área (fio de platina em espiral) como eletrodo auxiliar e $Ag/AgCl_{(s)}/KCl_{(sat)}$ como eletrodo de referência.

Os experimentos eletroquímicos que necessitaram de altas velocidades de varredura (maiores que 150 mV s^{-1}) foram desenvolvidos em um potenciostato/galvanostato da marca Autolab modelo BSTR 10A interfaciado com computador.

Os experimentos envolvendo eletrodo de disco rotativo foram realizados com eletrodo de disco rotativo de CV, com área geométrica de 0,20 cm^2, acoplado a um controlador de rotação da marca Pine Instruments MSRX.

Os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro modelo UV-2550 da marca Shimadzu.

O teor do CNZ foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência e utilizou-se o cromatógrafo da marca Shimadzu - modelo CBM-20A.

O espectro de ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^1H) do PBV foi feito no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto; o referido equipamento operou na frequência de 500 MHz.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese do polímero Poli (benzil viologênio) – $[PBV]Br_2$

O polímero $[PBV]Br_2$ (**fig. 2**) foi sintetizado por método semelhante ao descrito na literatura [88] com algumas modificações: 7,58 mmol (2,0 g) de 1,4-dibromometilbenzeno e 7,58 mmol (1,2 g) de 4,4'-bipiridina foram adicionados em 60 mL de acetonitrila. A mistura foi aquecida até refluxo, no qual permaneceu por 40 min. Após o resfriamento, o precipitado foi separado por filtração, em seguida lavado com éter etílico gelado e posteriormente seco a temperatura ambiente. O polímero foi caracterizado por RMN ^1H em água deuterada (D_2O). A espectroeletroquímica foi utilizada como método de caracterização do cátion radical formado a partir do polímero submetido à eletrólise.

3.2.2 Experimentos

3.2.2.1 UV-Vis

Os espectros de absorção dos fármacos CNZ e NTZ foram obtidos em diferentes pHs: tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0, tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0. Os tampões com os sais de fosfato de sódio e acetato de sódio foram feitos de acordo com os valores de pH_s desejados e os referidos sais ou ácidos considerando os valores dos pK_{as}. Foi utilizado ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para o ajuste fino do pH. Para o tampão borato, foi utilizado o ácido bórico na concentração desejada e adicionado hidróxido de sódio até a manutenção do pH desejado, no caso 9,0.

Os espectros dos fármacos foram obtidos na concentração de 50 μmol L^{-1}, partindo de um estoque de 50 mmol L^{-1} de cada um dos fármacos em DMSO. A baixa solubilidade da Nimes em meio ácido, possibilitou apenas a obtenção dos espectros deste fármaco nos pHs 7,0, 9,0 e 12,0. Para os demais fármacos, os espectros foram feitos em todos os pH_s: 2,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 12,0. Todos os experimentos foram desenvolvidos na temperatura ambiente (aprox. 25℃).

3.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Devido ao não conhecimento da procedência específica dos fármacos CNZ e NTZ, o grau de pureza destes padrões não era determinado. Como o objetivo era utilizar estes padrões para verificar a aplicabilidade do eletrodo CV-PBV, o teor do fármaco CNZ foi analisado por cromatográfica líquida de alta eficiência.

Foi utilizada uma coluna C_{18} (Merck) de 12,5 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro, com partículas de 5 μm. A fase móvel utilizada foi 70% metanol e 30% água na vazão de 0,8 mL min^{-1}, método adaptado da literatura [5]. Foram analisadas concentrações de 5,0 a 45 μg mL^{-1}de CNZ em metanol, partindo do estoque de 250 μg mL^{-1} em 308 nm.

3.2.2.3 Espectroeletroquímica

Os espectros foram obtidos utilizando um eletrodo de ITO (óxido de Estanho dopado com Índio), previamente limpo com etanol e água destilada. A solução do polímero PBV foi mantida a 1 mg mL^{-1} em KBr 0,1 mol L^{-1}. O potencial aplicado para a geração do cáton radical foi - 0,4 V vs $Ag/AgCl_{(s)}/KCl_{(sat)}$. Utilizou-se como eletrodo auxiliar um fio de platina e as medidas foram realizadas em cubetas de vidro. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro, já contendo a solução do polímero e tampada com uma tampa de teflon na qual, os eletrodos foram encaixados e os mesmos foram inseridos na solução. Antes de traçar os espectros da solução de PBV, foi feito o espectro apenas da solução de KBr 0,1 mol L^{-1} submetida à aplicação do potencial de -0,4 V e outro espectro da solução de PBV submetida ao potencial de 0,0 V. O potencial foi aplicado por cinco segundo antes de traçar o espectro na região de 450 a 600 nm.

3.2.2.4 Voltametria cíclica

Todas as medidas eletroquímicas (salvo exceções quando citadas) foram obtidas por voltametria cíclica na ausência de oxigênio (borbulhamemento de gás argônio por 10 minutos) em células eletroquímicas convencionais de três eletrodos. Enquanto as medidas eletroquímicas eram obtidas, o fluxo de argônio foi mantido sob a superfície da solução

analisada. Eletrodos de CV ou Au foram utilizados como eletrodos de trabalho (polidos ou modificados), Pt como eletrodo auxiliar e $Ag/AgCl_{(s)}/KCl_{(sat)}$ como eletrodo de referência.

3.2.2.4.1 Preparo do eletrodo modificado

O eletrodo CV foi polido com suspensão de alumina 1μm (Arotec), lavado com água destilada e em seguida, sonicado por 30 segundos em água destilada. O eletrodo de Au foi limpo com solução "Piranha" (3:1 – ácido sulfúrico/peróxido de hidrogênio), lavado com água destilada. Posteriormente foi submetido a uma limpeza eletroquímica varrendo os potenciais entre +1,6 e -0,4 V a 100 mV s^{-1} em solução aquosa de ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} previamente desoxigenada e finalmente lavado com água destilada.

Para a modificação dos eletrodos, foi utilizada uma solução aquosa do polímero PBV 1 mg mL^{-1} em KBr 0,1 mol L^{-1}, para o eletrodo de CV o intervalo de potencial utilizado foi de -0,8 a 0 V e para o de Au de -0,7 a 0 V. Ambos a 50 mV s^{-1} por dois ciclos completos e em -0,4 V (durante o terceiro ciclo) foi aplicado a eletrólise por 30 s. Imediatamente após a eletrólise, os eletrodos de trabalho foram mergulhados em uma solução saturada de $NaPF_6$ para a precipitação do polímero com o contraíon PF_6^- e, em seguida, lavados com água destilada.

O método de modificação acima escrito foi obtido após avaliação da cobertura gerada por variações no método proposto. As variações forma feitas em relação aos intervalos de potencial, aos tempos de eletrólise e aos números de ciclos (seção 4.2).

A cobertura foi calculada pela análise dimensional **(1)**, obtendo-se a área do pico de redução do PBV a 10 mV s^{-1}.

$$\Gamma = \frac{A.V}{cm^2} \; x \; \frac{s}{V} \; x \; \frac{mol}{nCoulombs} \qquad \textbf{(1)}$$

Onde ***A.V*** é a área do pico obtida pela pesagem do pico recortado, determinada em comparação com o peso de um quadrado de área conhecida. O número de elétrons envolvidos no processo redox é **n**. A cobertura obtida **Γ** é dada em mol/cm^2.

3.2.2.4.2 Comportamento eletroquímico dos fármacos CNZ, NTZ e Nimes

O comportamento eletroquímico do CNZ foi estudado por voltametria cíclica a 10 mV s^{-1} em diferentes pH_s (os mesmos utilizados nos experimentos de UV-Vis). A concentração dos fármacos utilizada foi 70 μmol L^{-1}. Uma vez que, a estrutura química das moléculas de CNZ e NTZ são semelhantes, assim como seus valores de pK_{as}, mudanças significativas não foram esperadas no comportamento eletroquímico frente aos pH_s, em relação de uma para outra. Dessa forma, o NTZ foi avaliado apenas em condições extremas de pH, ou seja, em 2,0 e 12,0, também em 7,0 como padrão para a comparação com os outros pH_s.

No caso da Nimes, a baixa solubilidade deste fármaco em meio ácido permitiu que o estudo do comportamento eletroquímico fosse desenvolvido em pH 7,0 e, em relação aos pH_s básicos, o pH 12,0 foi escolhido. O estudo em pH 9,0 não foi desenvolvido pois, o comportamento obtido seria semelhante ao pH 12,0; ambos os valores de pH_s são superiores ao valor do pK_a da Nimes.

3.2.2.4.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo

Os experimentos com eletrodo de disco rotativo foram realizados a 10 mV s^{-1}, variando a rotação de 100 a 1000 rpm. Foi utilizada a concentração de 100 μmol L^{-1} de cada um dos fármacos em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH 7,0.

3.2.2.4.4 Detecção de CNZ, NTZ e Nimes

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 como eletrólito de suporte a 10 mV s^{-1}. As curvas analíticas com os padrões CNZ, NTZ e Nimes foram construídas em relação aos valores de corrente correspondentes a cada concentração do fármaco adicionada. A faixa de concentração trabalhada foi de 0 a 150 μmol L^{-1}. Foram construídas curvas para as análises com os eletrodos CV e Au (modificados e polidos).

3.2.2.4.5 Análise de amostras comerciais

Os experimentos com amostras comerciais foram desenvolvidos a fim de determinar a concentração de cada um dos princípios ativos nos respectivos medicamentos (Rivotril®, Sonebon® e Nimesulida genérico).

Para estas análises foi utilizado o eletrodo CV-PBV. Foi empregado método de adição de padrão [89] para a determinação do valor da concentração do princípio ativo em cada um dos medicamentos. Este método é empregado sempre que não se pode obter o elemento de análise livre dos interferentes da matriz, como foi o caso neste trabalho. O método consiste na adição de uma alíquota do medicamento e adições de alíquotas do padrão em diferentes concentrações, todas exatamente conhecidas. Após a adição de cada alíquota, o valor de corrente (Ip_c) foi determinado. O valor do principio ativo no medicamento foi determinado através da regressão linear da curva Ip_c x concentração do padrão.

As adições foram feitas partindo das soluções estoques de 50 mmol L^{-1} dos padrões em DMSO. Cada adição correspondia a 10 μmol L^{-1} do padrão. A concentração dos medicamentos foi calculada baseada nas especificações de cada fabricante, quanto a real concentração de cada princípio ativo contida no medicamento. A concentração trabalhada foi 7,0 μmol L^{-1}. A obtenção dessa concentração para cada um dos medicamentos esta descrita a seguir:

<u>Rivotril®</u>

A apresentação deste medicamento (gotas) permitiu que, o volume correspondente à concentração citada fosse retirado diretamente do frasco, sem prévia diluição.

<u>Sonebon®</u>

Neste caso, uma solução estoque do medicamento foi necessária. Esta solução estoque foi feita considerando o valor em massa do principio ativo que havia em um comprimido (especificado pelo fabricando) e o peso médio de cada comprimido. Assim, foi calculado o peso médio de quatro comprimidos, os quais foram macerados em seguida.

Deste pó, utilizou-se a massa relativa a dois comprimidos que forneceu a concentração de 12,5 mmol L^{-1} em DMSO.

Nimesulida – medicamento genérico

O medicamento utilizado apresentava-se em suspenção, a qual não era solúvel em tampão fosfato (eletrólito para as análises). Desta forma, foi necessário o emprego de uma solução estoque do medicamento. Esta solução foi preparada pipetando-se do frasco do medicamento um volume que correspondesse a uma concentração final de 7,0 mmol L^{-1} (segundo fabricante) em 1mL de DMSO.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do polímero PBV

4.1.1 Espectroeletroquímica

A caracterização do polímero PBV recém-sintetizado foi feita por espectroeletroquímica. A técnica consiste no acompanhamento do perfil de absorção das moléculas na região do visível, enquanto se aplica o potencial de -0,4 V e 0,0 V. A **figura 3** apresenta o espectro de absorção do PBV (1 mg mL^{-1} em KBr 0,1 mol L^{-1}) sobre a superfície do eletrodo de ITO.

Durante a aplicação do potencial de 0,0 V no eletrodo de ITO inserido na solução do polímero, não foi visualizada nenhuma banda de absorção em toda a região do espectro (450 a 600 nm). À medida que o eletrodo de ITO foi polarizado em -0,4 V, a cadeia polimérica do PBV foi reduzida, o monômero formado ($PBV^{\bullet+}$) na superfície do eletrodo apresentou a coloração azul. Desta forma, na **figura 3** foi possível observar uma única banda com absorção máxima na região de 530 nm; consequência da absorção dos cátions radicais. Os derivados de viologênio quando sofrem a primeira redução, por método químico ou eletroquímico, geram cátions radicais e estas espécies apresentam como característica a absorção máxima na faixa de 525 a 540 mm [90-93].

Nas condições da metodologia proposta para a síntese do polímero, apenas as cadeias do PBV foram precipitadas na forma de brometo, com rendimento de aproximadamente 100% e então o polímero foi recristalizado a quente. Desta forma, a espectroeletroquímica pode ser empregada como metodologia de caracterização, uma vez que, já é conhecido seu emprego na caracterização de derivados de viologênio.

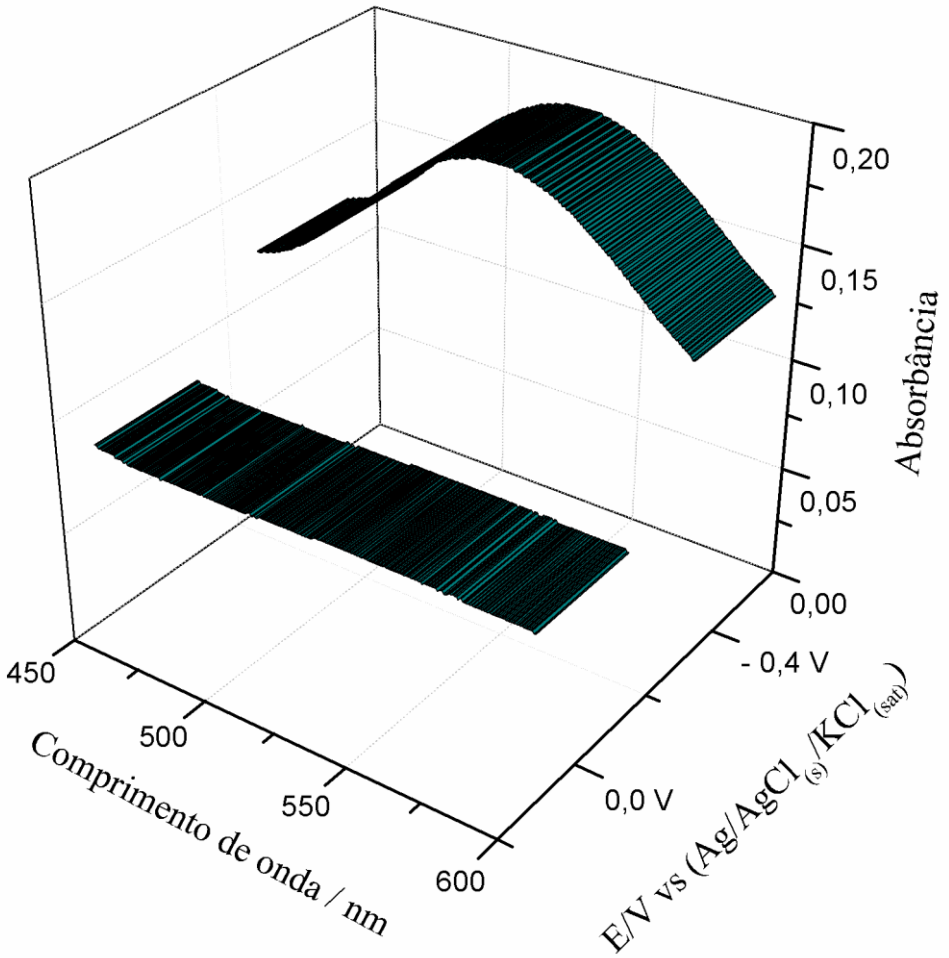


Figura 3. **Espectroeletroquímica do polímero PBV (1 mg mL^{-1}) em KBr 0,1 mol L^{-1}**. Espectros de absorção do eletrodo de ITO em solução aquosa do polímero (previamente desoxigenada). Eixo em 0,0 V absorção do PBV^{2+} durante a aplicação de potencial em 0,0 V. Eixo -0,4 V absorção do cátion radical formado durante a eletrólise em -0,4 V.

4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio (RMN ^{1}H)

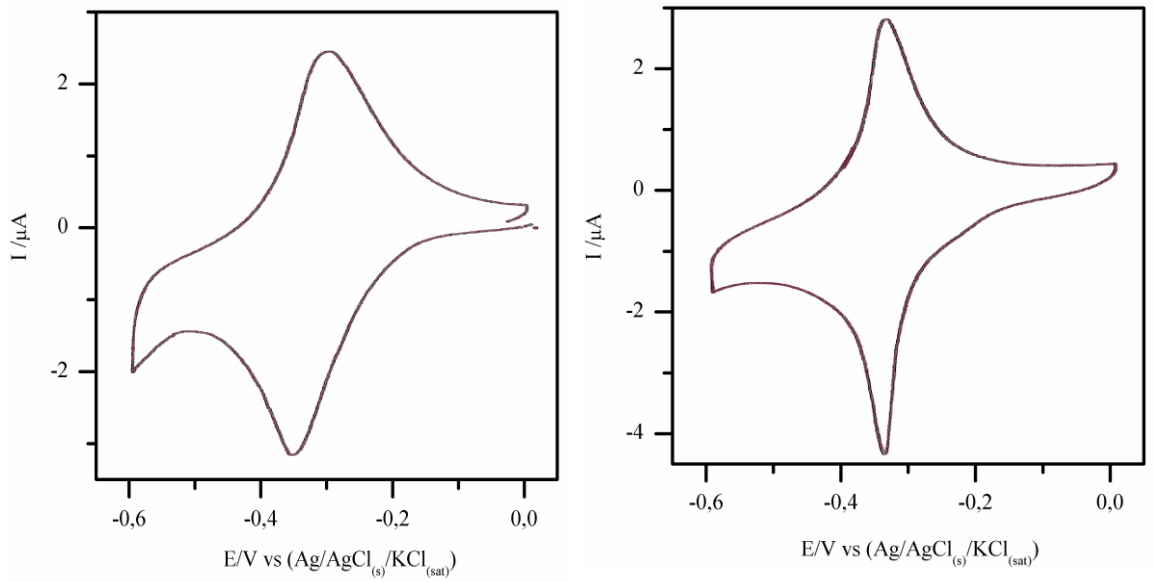
O polímero também foi caracterizado por RMN ^{1}H (500 MHz, D_2O) (**anexo A)** e o perfil espectral correspondeu aos seguintes deslocamentos: picos maiores: δ 9,16 (*t*, *J* = 5,0 Hz, 1H); δ 8,54 (*t*, *J* = 6,1 Hz, 1H); δ 7,66 – 7,55 (*m*, 1H); δ 5,97 (*s*, 1H); picos menores: δ 9,08 – 9,00 (*m*, 0,27H); δ 8,83 (*d*, *J* = 6,5 Hz, 0,26H); δ 8,44 (*d*, *J* = 6,6 Hz, 0,27H); δ 8,10 – 7,96 (*m*, 0,27H); δ 7,50 (*d*, *J* = 7.0 Hz, 0.27H); δ 5.92 (*s*, 0,44H). Os picos maiores correspondem às unidades de repetição do polímero de viologênio, ou seja, são encontrados em valores de deslocamento semelhantes ao espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) do monômero Benzil viologênio comercializado pela Sigma-Aldrich (Benzyl viologen Dichloride 97% n^o do produto 271845). Os picos menores, obtidos na caracterização do polímero, são atribuídos às unidades da bipiridina monoalquilada e aos grupos metilenos, os quais são os constituintes terminais da cadeia do polímero. Os dados obtidos por RMN ^{1}H são comparáveis aos obtidos por Creager e Fox [94], que caracterizaram por RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) o mesmo polímero, apenas com contraíon diferente, os autores utilizaram o cloreto ao invés de brometo.

4.2 Modificação do eletrodo de CV com PBV

Existem dois métodos encontrados na literatura para a modificação de eletrodos com o polímero PBV, descritos por Abruña e Bard [63]. Um deles se dá pela evaporação do solvente no qual o polímero se encontrava disperso (com o contraíon PF_6^-). A outra forma descrita de modificação é através da fotoredução do PBV. Ambas as formas de modificação descritas, segundo os autores Creager e Fox [94], não fornecem coberturas permanentes. Os dois últimos autores introduziram a abordagem eletroquímica para a modificação do eletrodo, através da ciclagem sobre as duas formas de redução do PBV ($PBV^{2+}/PBV^{\bullet+}$, $PBV^{\bullet+}/PBV^{0}$), garantindo melhor adesão do filme ao eletrodo.

Apesar da diferença dos métodos de modificação propostos pelos autores aqui citados, todos obtiveram eletrodos modificados com mesmo perfil eletroquímico. Isso se deve provavelmente à semelhança das espécies geradas na superfície do eletrodo. Em todas as modificações, a redução do polímero vai até à espécie neutra PBV^0 que se deposita na superfície do eletrodo, provavelmente, de forma aleatória, sem ordenação. Estas espécies possuem carga total igual a zero desta forma, sugere-se que não há orientação (interação por carga) para que estas moléculas se agrupem ordenadamente no eletrodo.

Apesar da metodologia que utiliza a técnica de eletroquímica produzir um perfil de picos alargados, ainda é vantajosa em detrimento ao método de precipitação (evaporação do solvente) apenas, pois, possibilita principalmente o controle do crescimento da cobertura do polímero na superfície do eletrodo e garante maior aderência do material na superfície. O método eletroquímico citado [94] foi reproduzido e o perfil voltamétrico do eletrodo modificado com PBV em solução aquosa está apresentado na **figura 4 A**. Objetivando uma cobertura polimérica estável, com perfis de picos definidos e principalmente, o controle sobre o processo de formação dessa cobertura, um método de modificação foi desenvolvido, o qual resumidamente é uma otimização das metodologias citadas.



A **B**

Figura 4. **Perfil voltamétrico do eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 20 mV s^{-1} após a modificação**. **A**- Modificação por consecutivas varreduras de 0 a -0,8 V a 50 mV s^{-1} (6 ciclos). ΔEp = 55 mV. **B**- Modificação com metodologia proposta neste trabalho. ΔEp = 15 mV.

Para tanto, a modificação eletroquímica da superfície do eletrodo de CV com o PBV, pode acontecer por dois processos que ocorrem durante a redução do polímero. Os processos redox fundamentais para a formação das monocamadas no eletrodo são: a geração do cátion radical ($PBV^{\bullet+}$) em aproximadamente -0,4 V e a formação da espécie neutra (PBV^{0}) em aproximadamente -0,7 V. Esses processos são semelhantes aos publicados para outros derivados de viologênio [95].

A forma neutra do polímero é insolúvel em solução aquosa, portanto, permanece na superfície do eletrodo após sua formação. A espécie $PBV^{\bullet+}$ permanece na superfície do eletrodo apenas durante o processo de sua formação, ou seja, durante a eletrólise em -0,4 V aproximadamente. Uma vez que a eletrólise é interrompida, essa espécie tende, pelo processo difusional, a deixar a superfície do eletrodo indo novamente para o seio da solução. Para que isso não aconteça, imediatamente após ter decorrido o tempo de eletrólise, o

eletrodo foi mergulhado em uma solução saturada de hexafluorfosfato de sódio. Dessa forma, as espécies ficam precipitadas na superfície do eletrodo na forma do sal insolúvel $[PBV](PF_6)_2$.

As espécies $PBV^{\bullet+}$ determinam picos mais resolvidos para o perfil do eletrodo modificado em solução aquosa, como pode ser visualizado na **figura 4 B**. Isto, provavelmente devido às cargas que ordenam a formação da cobertura sobre o eletrodo de trabalho. O cátion radical é uma espécie que possui um elétron desemparelhado e por esse motivo interage bem com a parte positiva de outras moléculas do PBV, determinando assim, uma ordenação nas monocamadas formadas. Ao contrário do comportamento das espécies PBV^0, que como já foi dito, não se acomodam de forma ordenada, pois, são moléculas que possuem mesma carga ocupando a superfície.

A contribuição de ambos os processos foi avaliada por experimentos nos quais, o intervalo de potencial, o tempo de eletrólise e o número de ciclos foram variados. A melhor condição para a modificação do CV com PBV foi obtida através dos valores de cobertura (Γ) e de número de monocamadas, considerando que uma monocamada corresponde a 3 x 10^{-10} mol cm^{-2} [96]. Os resultados referentes às variações no método de modificações do eletrodo CV estão apresentados na **figura 5** e **tabela 1 (A, B** e **C)**. Para todos os experimentos a concentração do polímero foi mantida em 1mg mL^{-1} em KBr 0,1 mol L^{-1} e a varredura de potencial, quando feita, desenvolveu-se a 50 mV s^{-1}.

Uma vez comprovado que as espécies $PBV^{\bullet+}$ conferem picos mais resolvidos no perfil eletroquímico do eletrodo CV-PVB, um estudo para verificação do processo de formação da cobertura apenas com a contribuição destas espécies foi desenvolvido. Para tanto, o perfil de formação da cobertura (nmol cm^{-2}) foi avaliado em relação ao tempo (s) em que se manteve a eletrólise em –0,4 V. Este perfil (formação da cobertura em função do tempo de eletrólise) pode se visto na **figura 5**.

A **figura 5** apresenta o gráfico que relaciona os valores de cobertura do eletrodo CV-PBV obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mVs^{-1} em função do tempo de eletrólise de 30 a 300 s em -0,4 V. É possível verificar um comportamento de uma sigmoide (R^2 = 0,995) em relação à cobertura em função do tempo da eletrólise. No intervalo de 0 a 105 s de eletrólise, observou-se a formação de no máximo duas monocamadas. Já a partir de

intervalos superiores a 105 s até 240 s (~4 min) houve um aumento correspondente a aprox. 15 monocamadas, ou seja, um curto intervalo de tempo (~2 min) determinou a formação de um número significativo de monocamadas. Após 240 s foi possível observar uma tendência na manutenção do valor da cobertura com o tempo, a qual permaneceu em aprox. 17 monocamadas.

Para o método de modificação de eletrodos, o controle de formação da cobertura é fundamental. As respostas das análises eletroquímicas são obtidas em relação à área do eletrodo de trabalho. Uma vez que o eletrodo está modificado com algum material, é fato que, a resposta eletroquímica se dará levando em consideração a quantidade de material sobre a superfície deste eletrodo, ou seja, a cobertura.

Com isso, considerando o controle sobre o processo de formação de monocamadas, constou-se que a modificação feita apenas pela eletrólise em -0,4 V, na qual há a contribuição somente do monoradical, ofereceu um bom resultado acima de 4 min de eletrólise e para intervalos inferiores a 105 s, os quais, fornecerem uma manutenção no valor de cobertura em função do tempo. No intervalo entre estes valores, ou seja, de 105 a 240 s, ocorreu uma mudança grande no número de monocamadas em um curto tempo. Apesar do controle em relação ao método de modificação obtido para os dois intervalos de eletrólise determinados (inferior a 105 s e superior a 240 s), o valor do número de monocamadas não foi significativo para intervalos inferiores a 105 s. Desta forma, um resultado considerável foi obtido apenas para intervalos de eletrólise iguais ou maiores a 5 min.

Assim, decidiu-se variar o potencial de inversão e o número de ciclos entre os potenciais redox do PBV, realizando ou não a eletrólise em -0,4 V durante 30 e 60 s. Espera-se com isso determinar uma condição mais reprodutível e rápida para a modificação do eletrodo.

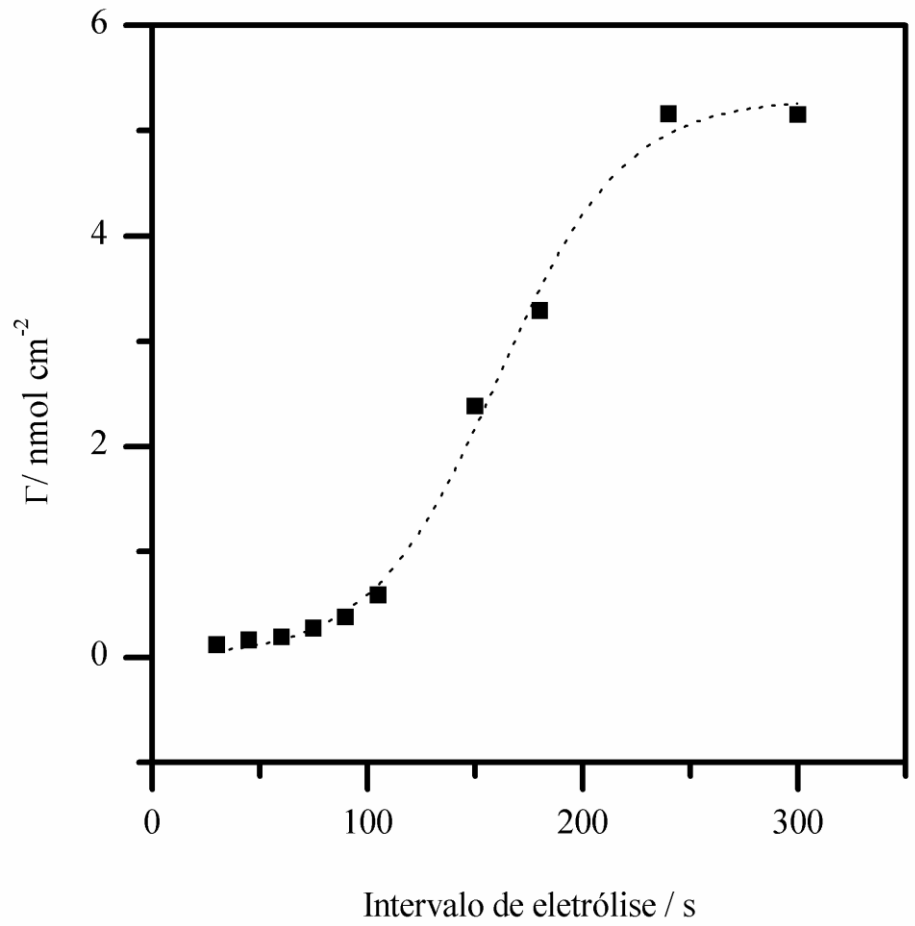


Figura 5. **Perfil da formação da cobertura com o PBV sobre o eletrodo de CV em relação apenas a diferentes intervalos de eletrólise**. Gráfico dos valores de cobertura do eletrodo CV-PBV em função do tempo de eletrólise, de 30 a 300 s. O potencial aplicado foi -0,4 V. A cobertura foi determinada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

A **Tabela 1 A** apresenta os resultados em relação à variação do intervalo de potencial de varredura. Este experimento foi realizado mantendo a eletrólise por 30 segundos em -0,4 V durante o terceiro ciclo a 50 mV s^{-1}. As coberturas obtidas para os intervalos de -0,4 a 0 V e -0,5 a 0 V não foram promissoras. Os valores obtidos não foram suficientes para completar

uma monocamada, sendo assim, estes intervalos não foram utilizados nos próximos experimentos. O maior valor de cobertura (~7 monocamadas) foi obtido para o maior intervalo de potencial, devido a abrangência do potencial de formação de PBV^0 na superfície do eletrodo, que contribui para a formação de uma maior quantidade das espécies $PBV^{\bullet+}$ durante a eletrólise.

Os valores de cobertura em relação à variação do número de ciclos completos a 50 mV s^{-1} sem eletrólise e para diferentes intervalos de potenciais estão apresentados na **Tabela 1 B**. Este experimento deixou ainda mais evidente a influência da espécie neutra para uma maior cobertura da superfície do eletrodo, pois, o aumento do número de ciclos só foi efetivo para intervalos de potencial mais amplos.

Em relação aos intervalos mais curtos de potencial (de -0,5 a 0 V), apenas com 6 ciclos foi possível obter uma monocamada. Isto porque, neste intervalo de potencial o segundo processo de redução do PBV não foi atingido e a única contribuição para a formação da cobertura é a do cátion radical. Quando o intervalo de potencial foi delimitado a -0,6 V, o valor obtido para o número de monocamadas ficou em aproximadamente 1, independente do número de ciclos. Neste intervalo, apesar de não ser o ótimo para a formação da espécie neutra, deve-se considerar o fato de que, um pouco dela pôde ser formada em -0,6 V e contribuiu para a cobertura. Essa observação foi fundamentada na diferença dos resultados de -0,5 e -0,6 V. Caso, somente as espécie $PBV^{\bullet+}$ fossem as responsáveis para a formação da cobertura, o mesmo valor para intervalo até -0,5 V seria obtido para o intervalo até -0,6 V. Na verdade, para este intervalo (-0,6 a 0 V) já com 4 ciclos foi possível obter uma monocamada.

No intervalo de -0,7 V a 0 V, o limite negativo está muito próximo do potencial de redução do PBV^0, assim foi obtido um valor de cobertura razoável, de aproximadamente 6 monocamadas, tanto para 4 ou 6 ciclos. Os melhores valores foram obtidos para o maior intervalo de potencial, no qual, houve energia suficiente para que as espécies fossem reduzidas até a forma PBV^0 na superfície do eletrodo. Assim, o aumento no número de ciclos, contribuiu para o aumento de aproximadamente uma monocamada.

Tabela 1 C apresenta os resultados da variação do tempo de eletrólise em -0,4 V durante o terceiro ciclo a 50 mV s^{-1} para diferentes intervalos de potencial. Neste caso, os

melhores valores de cobertura foram obtidos para os maiores intervalos de potencial, para os quais o aumento do tempo de eletrólise não foi significativo. Quando se tratava de um intervalo de potencial menor, uma pequena quantidade da espécie neutra foi formada, e a maior contribuição para a cobertura vem do cátion radical. Assim, um tempo maior de eletrólise proporcionou uma melhor cobertura.

Experimentos com eletrólise durante o quarto ciclo foram realizados, porém o aumento do valor de cobertura não foi significativo em relação aos experimentos com eletrólise durante o terceiro ciclo. Os resultados para eletrólise durante o segundo ciclo não foram promissores, por esse motivo, as **tabelas 1 A** e **1 C** apresentam os resultados em relação aos experimentos com eletrólise durante o terceiro ciclo.

Com base nos resultados obtidos, a condição estabelecida para a modificação do eletrodo de CV foi manter eletrólise em -0,4 V por 30 segundos no terceiro ciclo, varrendo os potenciais de -0,8 a 0 V a 50 mV s^{-1} (**fig**. **6**). Com este método foi possível controlar o crescimento da cobertura sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Os números de monocamadas obtidos com o método de modificação proposto em diferentes dias apresentaram linearidade na resposta das análises (seção 4.4.6).

Com o método proposto para a modificação, a solução aquosa do polímero utilizada durante o processo de modificação pode ser reutilizada sem que o valor de cobertura decrescesse significativamente, como pode ser visto na **tabela 1 D**.

Tabela 1 A. Valores de cobertura e número de monocamadas obtidos em diferentes intervalos de potencial, após eletrólise por 30 s em -0,4 V durante a varredura do terceiro ciclo a 50 mV s^{-1}.

Janela de potencial (V)	**-0,8 a 0**	**-0,7 a 0**	**-0,6 a 0**	**-0,5 a 0**	**-0,4 a 0**
Γ (nmol cm^{-2})	2,2	1,9	0,61	0,12	0,070
N^0 de monocamadas	7	6	2	0,4	0,2

Tabela 1 B. Valores de cobertura e número de monocamadas obtidos em diferentes intervalos de potencial, após a varredura de 4 e 6 ciclos a 50 mV s^{-1} sem eletrólise.

Janela de potencial (V)	**4 ciclos**		**6 ciclos**	
	Γ (nmolcm^{-2})	**n^0 monocamadas**	**Γ (nmolcm^{-2})**	**n^0 monocamadas**
-0,8 a 0	2,3	8	2,6	9
-0,7 a 0	1,8	6	1,8	6
-0,6 a 0	0,40	1	0,49	2
-0,5 a 0	0,28	0,9	0,43	1

Tabela 1 C. Valores de cobertura e monocamadas obtidos para diferentes intervalos de potencial após a eletrólise por 30 e 60 s em -0,4 V durante a varredura do terceiro ciclo a 50 mV s^{-1}.

Janela de potencial (V)	**30 segundos**		**60 segundos**	
	Γ (nmolcm^{-2})	**n^0monocamadas**	**Γ (nmolcm^{-2})**	**n^0monocamadas**
-0,8 a 0	2,2	7	2,4	8
-0,7 a 0	1,8	6	1,9	6
-0,6 a 0	0,65	2	1,2	4

Tabela 1 D. Valores de cobertura e monocamadas obtidos com a modificação feita a partir da mesma solução aquosa de $[PBV]Br_2$ 1mg mL^{-1} em KBr 0,1 mol L^{-1} em diferentes janelas de potenciais e após a eletrólise por 30 s em -0,4 V durante o terceiro ciclo a 50 mV s^{-1}.

Uso da solução	**-0,6 a 0V**		**-0,7 a 0V**		**-0,8 a 0V**	
	Γ ($nmolcm^{-2}$)	**n^0mono-camadas**	**Γ ($nmolcm^{-2}$)**	**n^0mono-camadas**	**Γ ($nmolcm^{-2}$)**	**n^0mono-camadas**
1º	0,74	2	1,8	6	2,7	9
2º	0,54	2	1,4	5	2,6	9
3º	0,37	1	1,4	5	1,9	6
4º	-	-	1,1	4	1,7	5
5º	-	-	0,86	3	1,3	4

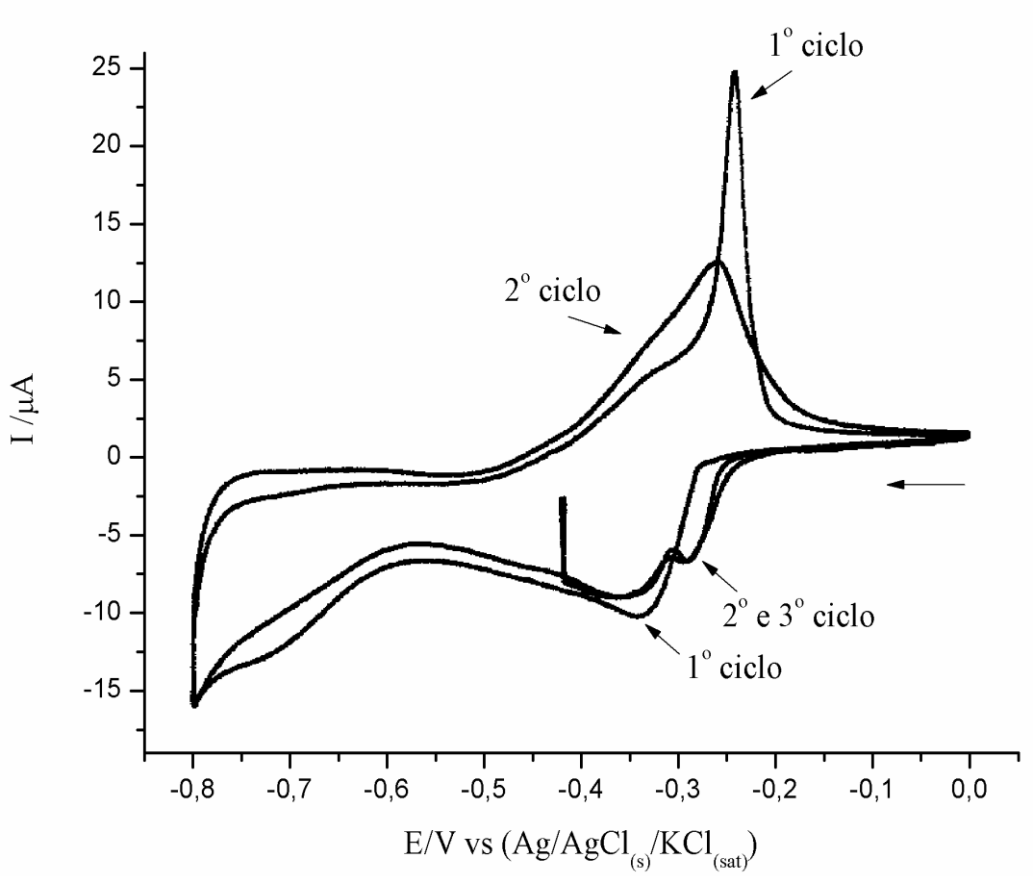


Figura 6. **Comportamento eletroquímico do polímero [PBV]Br_2 em solução aquosa**. Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do PBV (1 mg mL^{-1}) em solução aquosa de KBr 0,1 mol L^{-1} previamente desoxigenada com argônio por 10 minutos. Eletrodo de trabalho CV, eletrodo auxiliar Pt, velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}. Início da varredura de potencial em 0,0 V.

4.3 Parâmetros cinéticos

Após a modificação do eletrodo de carbono vítreo (CV-PBV), seguindo método descrito na seção anterior, o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi obtido em diferentes velocidades de varredura, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 e está apresentado na **figura 7**. É possível observar a simetria dos picos redox, característica de um material depositado na superfície do eletrodo de trabalho. Também, é notável que, tanto o potencial do pico de redução (Ep_c) quanto o de oxidação (Ep_a) não sofreram variação significativa com a velocidade de varredura, este comportamento é característico de uma substância redox que não está sofrendo processo difusional, ou seja, está confinada na superfície do eletrodo [97]. Devido à existência de simetria em relação às correntes de pico anódica e catódica, somada ao fato de que não houve variação considerável nos valores de potencial de pico (anódico e catódico), sugere-se que o processo redox deste polímero é reversível.

Na verdade, uma pequena variação na diferença dos valores do Ep_c e Ep_a (ΔEp) foi observada com o aumento da velocidade de varredura. No caso do polímero PBV, essa variação era esperada. O PBV é um polímero com carga e há um fluxo de íons na interface polímero/solução para que se mantenha a eletroneutralidade ao eletrodo ser polarizado. Isto se torna ainda mais evidente à medida que a velocidade de varredura aumenta. Além do mais, o polímero não possui apenas uma monocamada e quanto maior o número de monocamadas, maior desvio é esperado no perfil linear (ΔEp vs ν) [98].

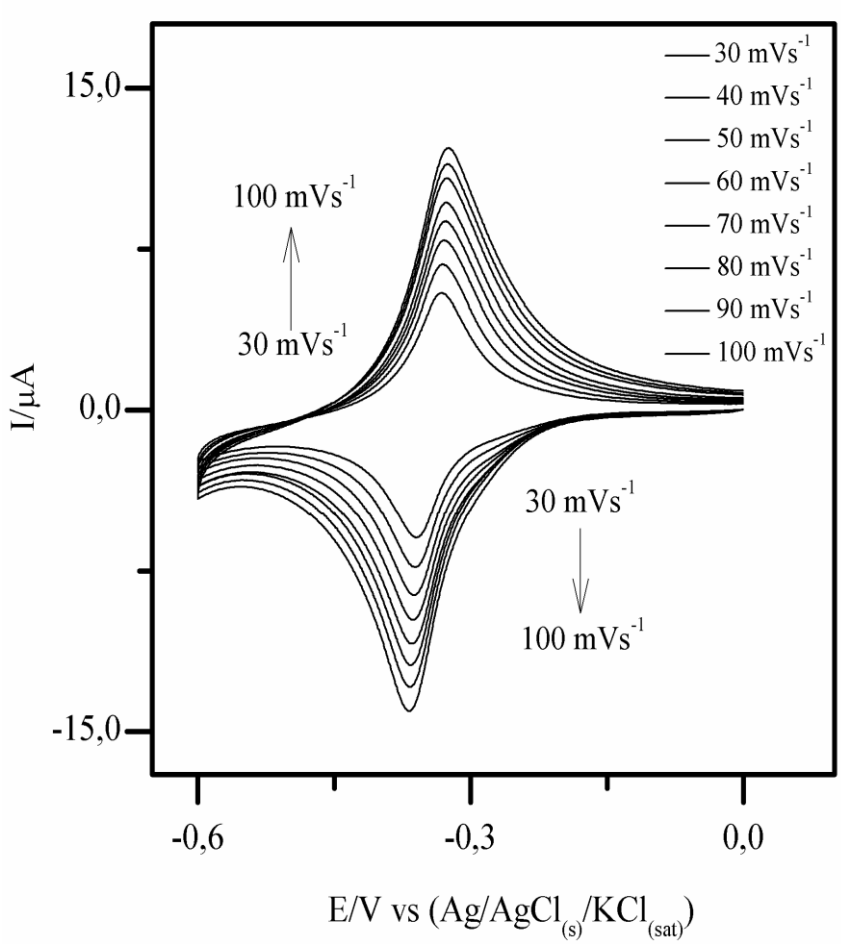


Figura 7. **Comportamento eletroquímico do eletrodo CV-PBV em solução aquosa em diferentes velocidades de varredura**. Voltamogramas cíclicos referentes ao processo redox do eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1}.

Um parâmetro muito utilizado para comprovar se as espécies redox estão confinadas na superfície do eletrodo ou se estão sofrendo processo difusional é linearidade do gráfico *Ip* vs ν ou *Ip* vs $\nu^{1/2}$. Para o gráfico *Ip* vs ν, a linearidade indica que as espécies redox estão na

superfície do eletrodo, devido á proporcionalidade direta entre corrente (*Ip*) e velocidade de varredura (ν) relacionadas na **equação 2** [99], como foi o caso do eletrodo CV-PBV.

$$Ip = \frac{n^2 F^2}{4\,R\,T}\, x\, \nu\, A\, \Gamma \qquad \textbf{(2)}$$

Onde: $\boldsymbol{T}$ = 298K, $\boldsymbol{R}$ = 8,3 J K^{-1} mol^{-1} (constante universal dos gases perfeitos), $\boldsymbol{n}$ = 1 (número de elétrons transferidos), $\boldsymbol{F}$ = 96485,3399 C mol^{-1} (constante de Faraday), ν = valor da velocidade de varredura e $\boldsymbol{A\Gamma}$ = mols da espécie adsorvida na superfície do eletrodo.

O gráfico apresentado na **figura 8** foi obtido através dos valores de Ip_c e Ip_a em função da velocidade de varredura para o eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Ambas as retas exibidas (Ip_c e Ip_a) apresentaram comportamento linear, com R^2 de 0,999 para a reta dos valores de Ip_c e R^2 de 0,994 para os valores correspondentes a Ip_a, até aproximadamente 100 mV s^{-1} para ambas as retas.

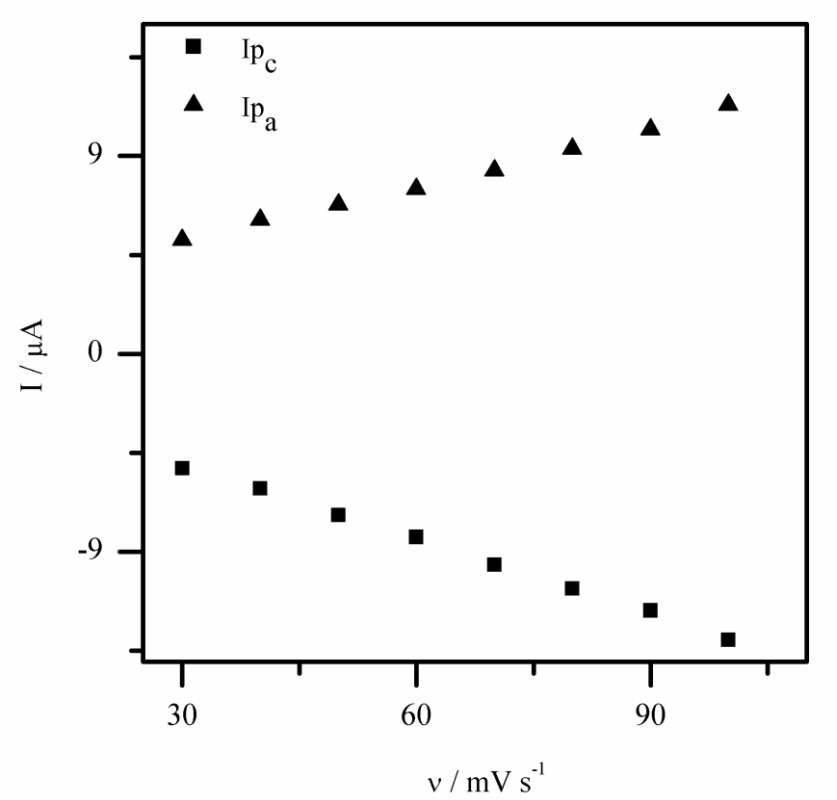


Figura 8. **Variação dos valores de corrente de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura para o eletrodo CV-PBV em solução aquosa**. Os valores de corrente de pico foram obtidos por voltametria cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura, sendo : 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mVs^{-1}.

O valor do coeficiente de transferência de elétrons (α) e da constante de transferência de carga (k) (para o transporte de elétrons entre a superfície do eletrodo e o polímero depositado) foram determinados através da expressão geral de Laviron [100] (**equação 3**).

$$\log k = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha)\log\alpha - \log\left(\frac{T}{F\nu}\right) - \frac{\alpha(1-\alpha)\, n\, F\, \Delta Ep}{2,3\, R\, T} \qquad \textbf{(3)}$$

Onde: $\boldsymbol{T}$ = 298 K, $\boldsymbol{R}$ = 8,3 J K^{-1} mol^{-1} (constante universal dos gases perfeitos), $\boldsymbol{n}$ = 1 (número de elétrons transferidos) e $\boldsymbol{F}$ = 96485,3399 C mol^{-1} (constante de Faraday), $\boldsymbol{\nu}$ = valor da velocidade de varredura no limiar a separação dos picos.

Esta equação satisfaz a condição Ep_a - Ep_c > 200 mV/*n* (separação de pico a pico) para espécies confinadas na superfície do eletrodo [100]. Os valores de ν, Ep_a e Ep_c foram obtidos através da extrapolação das curvas Ep_c e Ep_a do gráfico apresentado na **figura 9**.

O gráfico (**fig**. **9**) apresenta os dados da diferença dos potenciais (*Ep* - *Ej*) em função do logaritmo da velocidade de varredura (*log* ν). O termo E_j é a média aritmética dos potenciais redox obtidos na velocidade de varredura mais baixa [101], ou seja, $\boldsymbol{Ej = (Ep_a + Ep_c)/2}$. Os valores de Ep_a, Ep_c e E_j são respectivamente -0,324 V; -0,359 V e -0,341 V. O termo *Ep* é o valor de potencial anódico (Ep_a) ou catódico (Ep_c) correspondente à cada velocidade de varredura.

O valor do coeficiente de transferência de elétrons (α), que indica a simetria entre as reações redox do polímero, foi obtido através dos valores das inclinações das retas determinadas para as duas porções (Ep_a e Ep_c) em altas velocidades de varredura. Essas duas porções de pontos apresentaram valores de inclinações de retas iguais a $\boldsymbol{-2,3RT/\alpha nF}$ para o pico catódico e $\boldsymbol{2,3RT/(1-\alpha)nF}$ para o anódico. Desta maneira, o valor de $\boldsymbol{\alpha}$ obtido foi aproximadamente 0,5. Usando a **equação 3**, o valor de $\boldsymbol{k}$ determinado para o eletrodo CV-PBV em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 foi 5,2 s^{-1}.

A transferência de carga no polímero não é muito rápida, como foi apresentado pelo valor de *k* e através da variação dos *Ep* com a velocidade de varredura [98]. Este valor chega a 1,2 x 10^3 s^{-1} para uma constante moderadamente rápida [96]. O valor obtido pode não ter sido tão alto devido à própria característica do polímero e também pela somatória de outros fatores que diminuem o valor da constante. Dentre estes fatores, podemos citar a diferença na solvatação e/ou movimento iônico [61] e o fato de que se trata de um polímero com uma

cobertura significativa com 2,3 nmol cm^{-2}, correspondente a 8 monocamadas aprox. Assim, existe uma resistência da própria cobertura em relação ao fluxo iônico.

Porém, o valor de 4,3 x 10^1 s^{-1} para a constante de transferência de carga foi relatado como bom resultado [102] para o qual, o gráfico de Laviron apresentou o *Ep* quase independente do logaritmo da velocidade de varredura, isto para baixas velocidades de varredura. Este comportamento sugere que a comunicação eletrônica entre os sítios redox do mediador e a superfície do eletrodo não limita o processo interfacial. Esse mesmo comportamento (ou seja, a independência de *Ep* com $log\ \nu$ para baixas velocidades de varredura) também foi obtido para o polímero PBV e está apresentado na **figura 9**, desta forma, há uma boa transferência de carga entre o polímero PBV e a superfície do eletrodo.

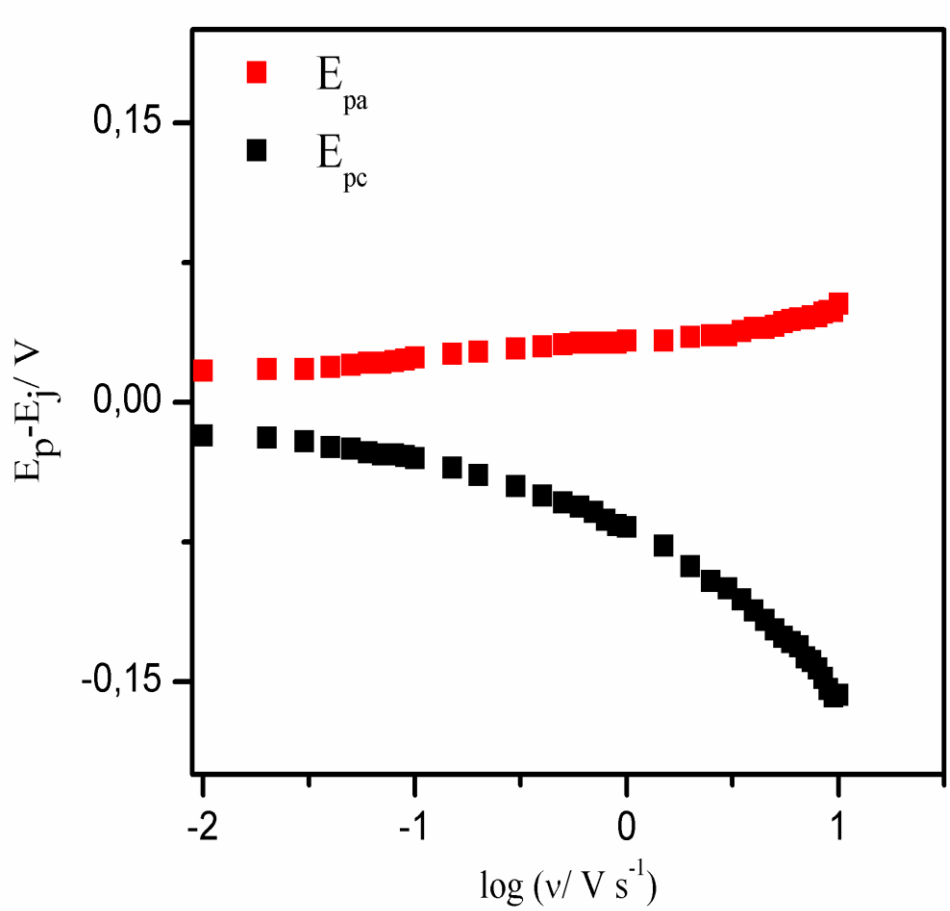


Figura 9. **Gráfico de Laviron**. Valores de potencial de pico (anódico e catódico) correspondentes a diferentes velocidades de varredura (0,01 a 10 V s^{-1}) em função do logaritmo da velocidade de varredura. Valores obtidos para o eletrodo CV-PBV por voltametria cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

4.4 Clonazepam

4.4.1 Determinação do teor de CNZ

Devido à procedência não específica do padrão CNZ, o teor foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. A **figura 10** apresenta o gráfico da relação linear (R^2 = 0,998) dos valores das áreas dos picos e as concentrações de CNZ totais adicionadas, com o valor de inclinação da reta de 6,26 x 10^4. Os valores das áreas foram calculados pela integração dos picos cromatográficos. O valor da área do pico obtido para a amostra de CNZ (25,0 μg mL^{-1}) foi 1,61 x 10^6. Este valor de área correspondeu ao valor obtido experimentalmente de 26,4 μg mL^{-1} para a concentração de CNZ. Considerando os erros experimentais, adotou-se o valor de 100% para o teor do CNZ.

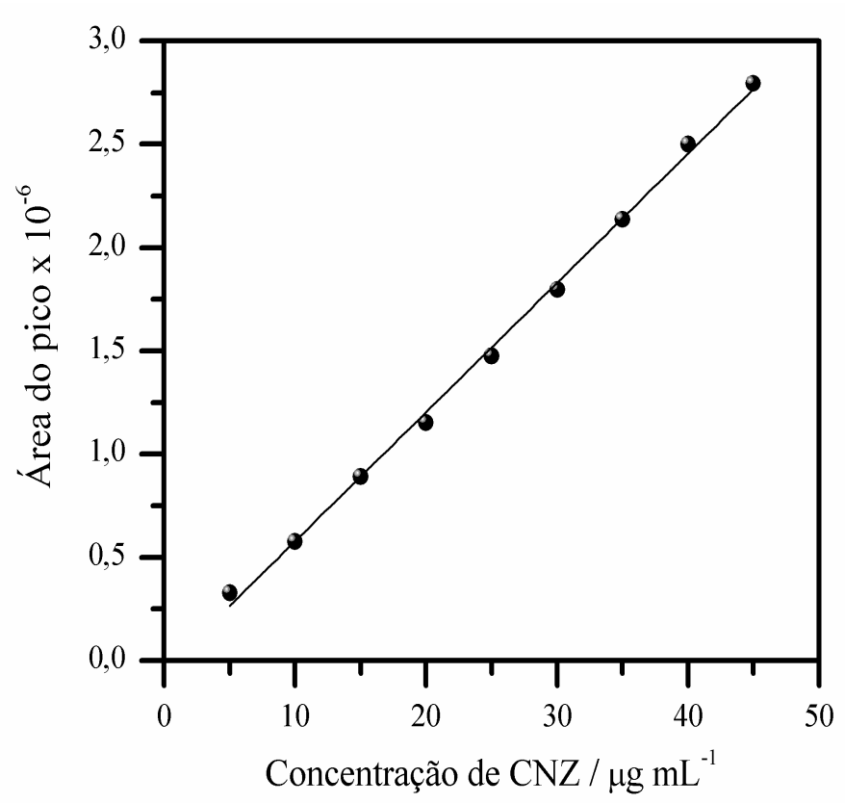


Figura 10. **Determinação do teor de CNZ**. Gráfico dos valores das áreas dos picos em relação à concentração de CNZ (μg mL^{-1}).

4.4.2 Espectros de absorção em diferentes pH_s

Os espectros de absorção foram realizados em diferentes pH_s, como forma de caracterização da molécula em diferentes estágios de protonação, de acordo com os valores de pK_a apresentados na **figura 11**. Os espectros de absorção do CNZ em diferentes pH_s podem ser visualizados na **figura 12**. Nos pH_s 5,0; 7,0 e 9,0 observou-se picos de absorção em 250 e 300 nm (aprox.) muito similar aos espectros da literatura [103]. Estes pH_s (5,0; 7,0 e 9,0) estão acima do valor do primeiro pK_a (pK_{a1} = 1,95 [104]) da molécula de CNZ; nestas condições, a molécula teve seu primeiro próton liberado. Em pH 2,0 foi visualizada uma banda alargada englobando a região de 250 a 300 nm, isso porque o valor de pH está muito próximo ao valor do pK_a, coexiste portanto, proporções semelhantes da molécula na forma protonada e desprotonada. Em pH 12,0, observou-se uma banda de forte absorção em aproximadamente 400 nm. O aparecimento desta banda é atribuído ao mecanismo de conjugação de elétrons (**fig. 13**) originado pela perda do segundo próton (pK_{a2} = 10,5 [104]), semelhante ao espectro da literatura obtido em outros meios não aquosos [105]. Desta forma, devido a facilidade de transição eletrônica, a absorção foi obtida em comprimentos de onda maiores, ou seja, menor energia requerida pela molécula (deslocamento batocrômico).

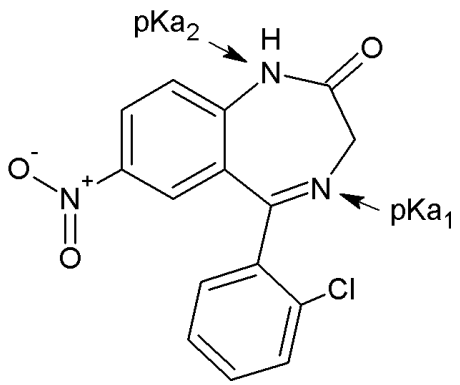


Figura 11. **Representação da estrutura química do CNZ e seus respectivos pK_{as}.** Estrutura química do CNZ e os valores de seus pK_{as}: pK_{a1} = 1,95; pK_{a2} = 10,5. 315,72 g mol^{-1} [104].

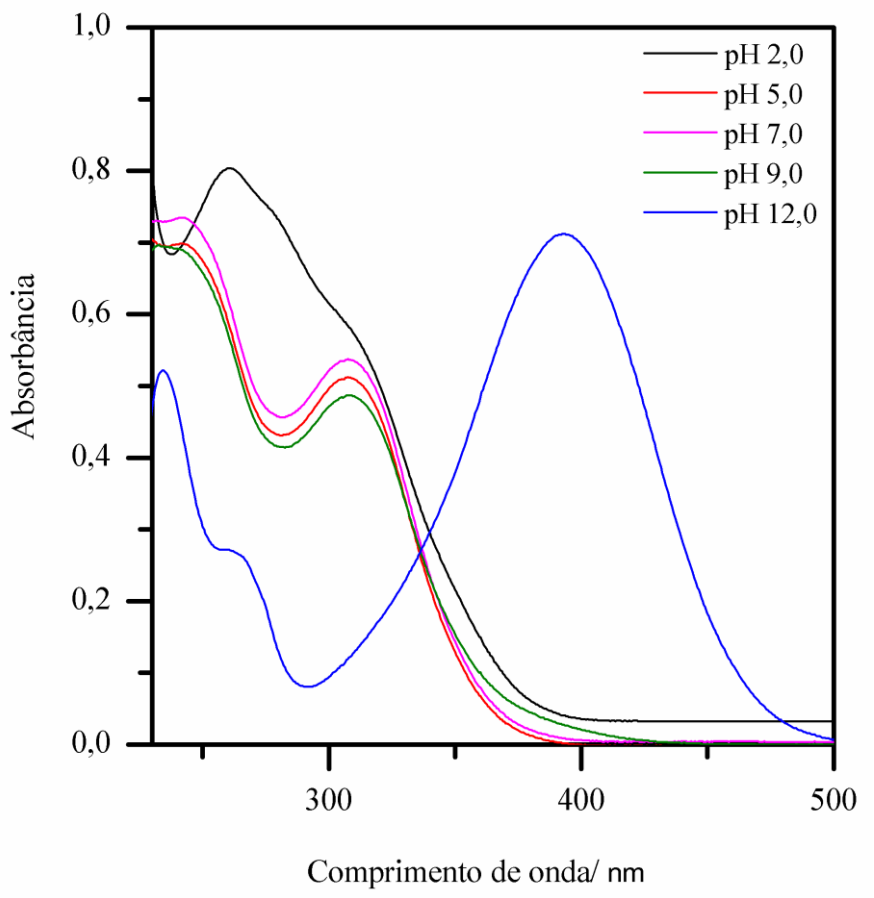


Figura 12: **Espectro de absorção de CNZ 50 μmol L^{-1} em diferentes pHs**. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0; tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0; tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0.

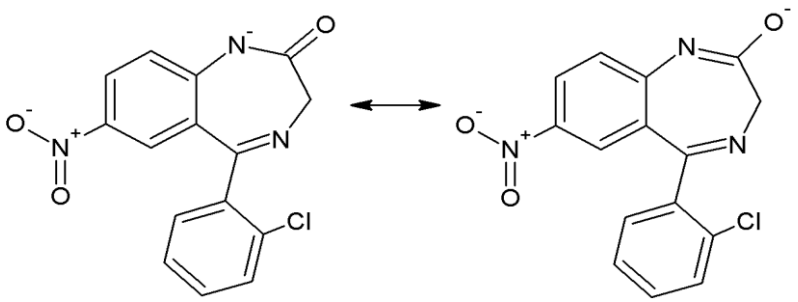


Figura 13: **Representação da conjugação de elétrons da molécula de CNZ em pH 12,0**. Esquematização da molécula do CNZ totalmente desprotonada.

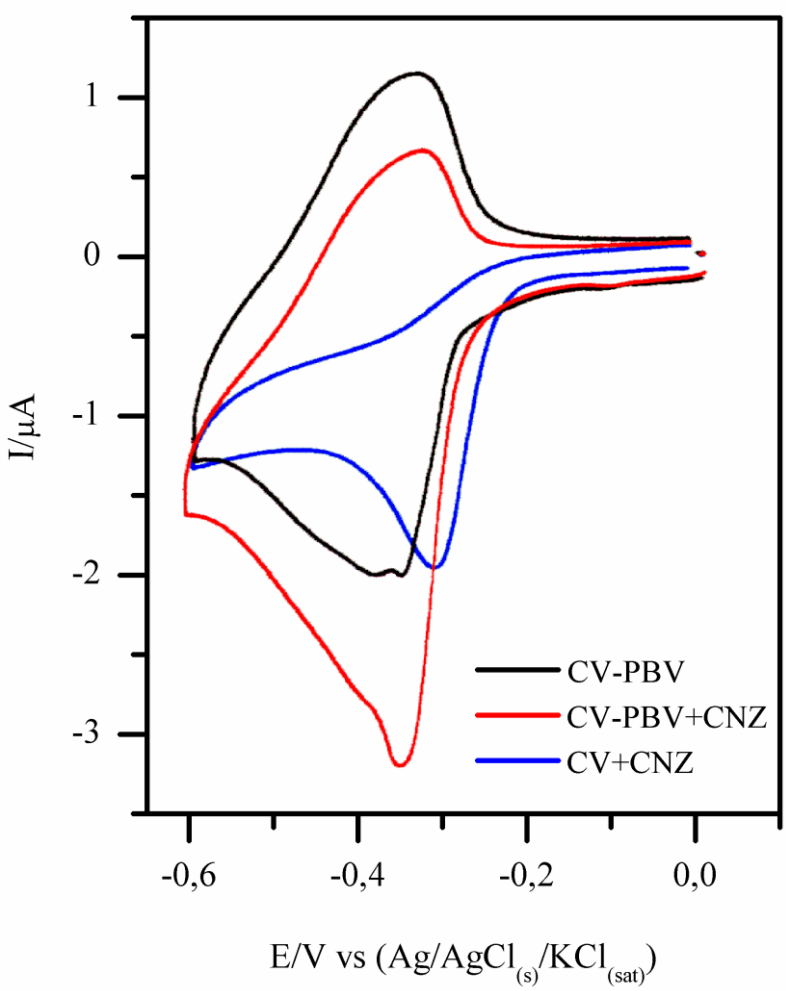
4.4.3 Comportamento eletroquímico do CNZ em diferentes pH_s

O comportamento eletroquímico do CNZ foi analisado para os mesmos pH_s citados anteriormente, portanto, utilizou-se os mesmos tampões nas mesmas concentrações. Como pode ser observado nas **figuras 14 A** e **14 B** em comparação aos voltamogramas apresentados em **14 C**, **14 D** e **14 E** houve um adiantamento no potencial de redução do fármaco quando foi utilizado tampões de caráter ácido. Isto significa que, a condição do meio propiciou uma diminuição na energia requerida para reação. O favorecimento da redução do CNZ em pH baixo está de acordo com o mecanismo de redução eletroquímica dos compostos nitroaromáticos [citado na seção 1.2]. Como reação geral dessa classe de compostos em meio aquoso, a redução eletroquímica do grupamento nitro depende do ganho de 4 elétrons acompanhado de 4 prótons (H^+), como apresentado no **esquema 1** (p. 06).

De maneira geral, o estudo eletroquímico de redução do CNZ em diferentes pH_s demonstrou que, o potencial de redução do CNZ aumentou com o aumento do valor de pH do meio. Porém, a análise dos potenciais de redução do CNZ utilizando o eletrodo modificado (CV-PBV) e polido (CV) demonstrou que, com o eletrodo CV-PBV, o aumento do potencial de redução do fármaco não foi tão significativo em comparação ao eletrodo CV (polido). A redução do CNZ em pH 9,0 (**fig**. **14 D**) com o eletrodo CV-PBV aconteceu no mesmo potencial de redução em pH 7,0 para o eletrodo CV (**fig**. **14 C**). Mesmo com o aumento do pH (dificultando a redução), o eletrodo CV-PBV foi mais eficiente. O CNZ, resumidamente (nos pH_s de 7,0 a 12,0) foi reduzido em potenciais menos negativos quando utilizou-se o eletrodo modificado (em relação ao eletrodo polido). A diminuição do potencial de redução do CNZ (CV-PBV em relação ao CV) alcançou 170 mV em pH próximo de 7,0 (**fig**. **14 C**).

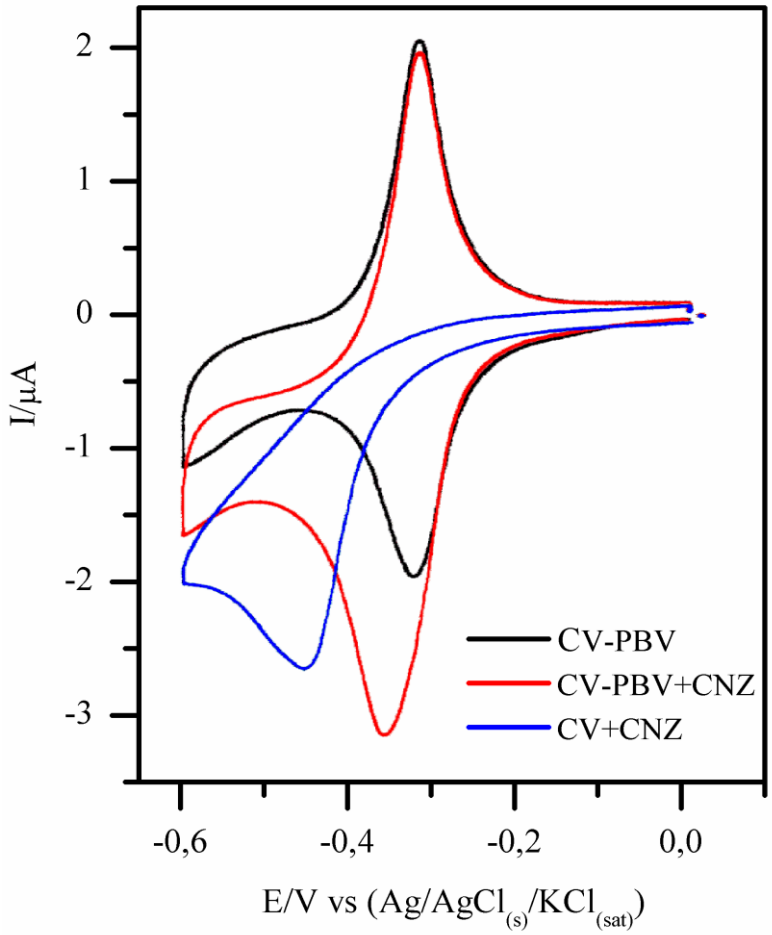
Em pH 12,0, (**fig**. **14 E**) o valor de corrente obtido para a análise do CNZ utilizando CV-PBV, foi substancialmente maior em relação à mesma análise utilizando CV polido. Isto pode estar relacionado com uma maior interação entre o analito e o filme polimérico. O polímero possui carga positiva, e o fármaco em pH 12,0 se encontra totalmente desprotonado apresentando assim, carga negativa. Desta forma, neste pH pode ter havido forte interação entre cargas opostas. O alto valor de corrente obtido pode ser, portanto,

consequência de um maior número de moléculas presentes na superfície do eletrodo, devido a esta forte interação.



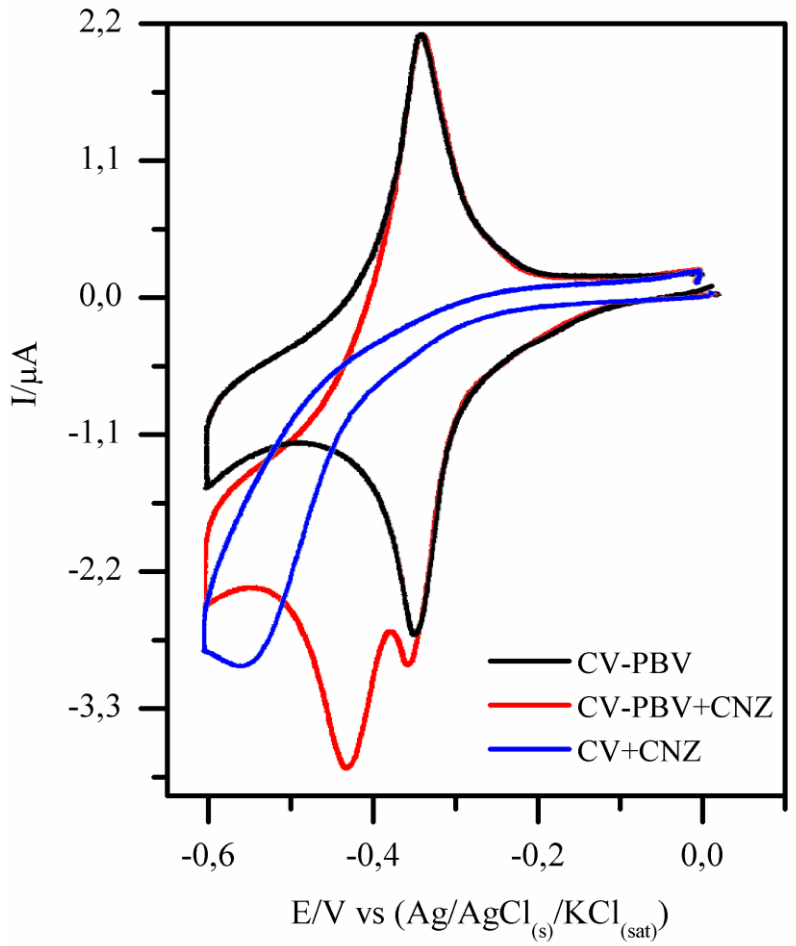
A

Figura 14. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. A-** Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ.



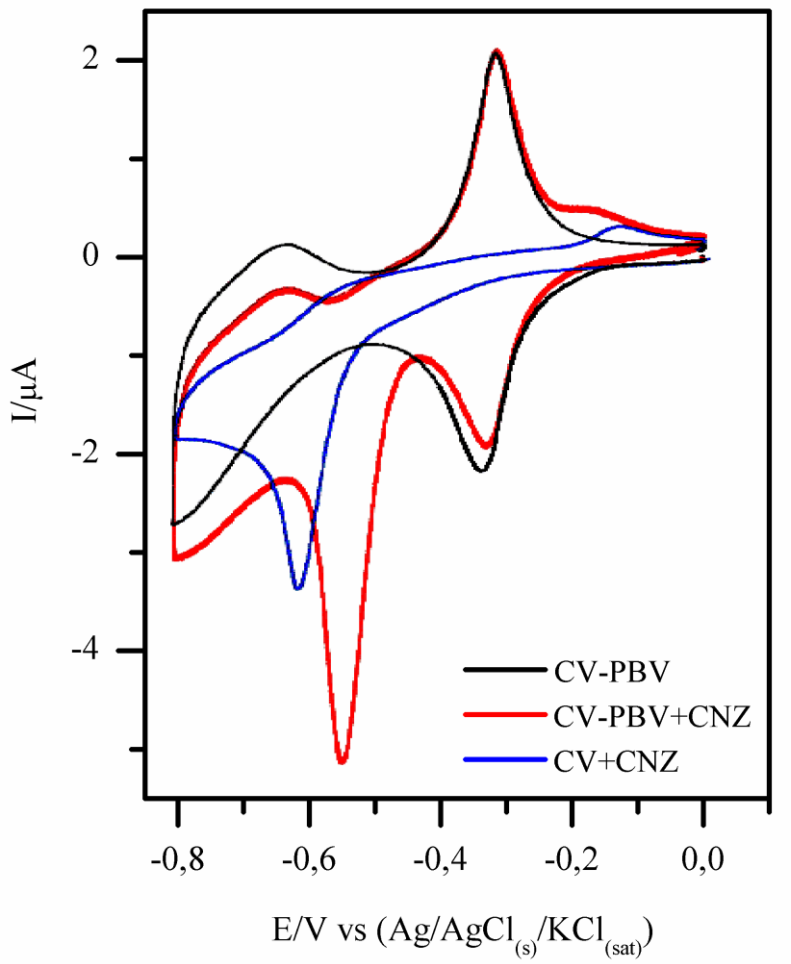
B

Figura 14. Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s. B- Tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ.



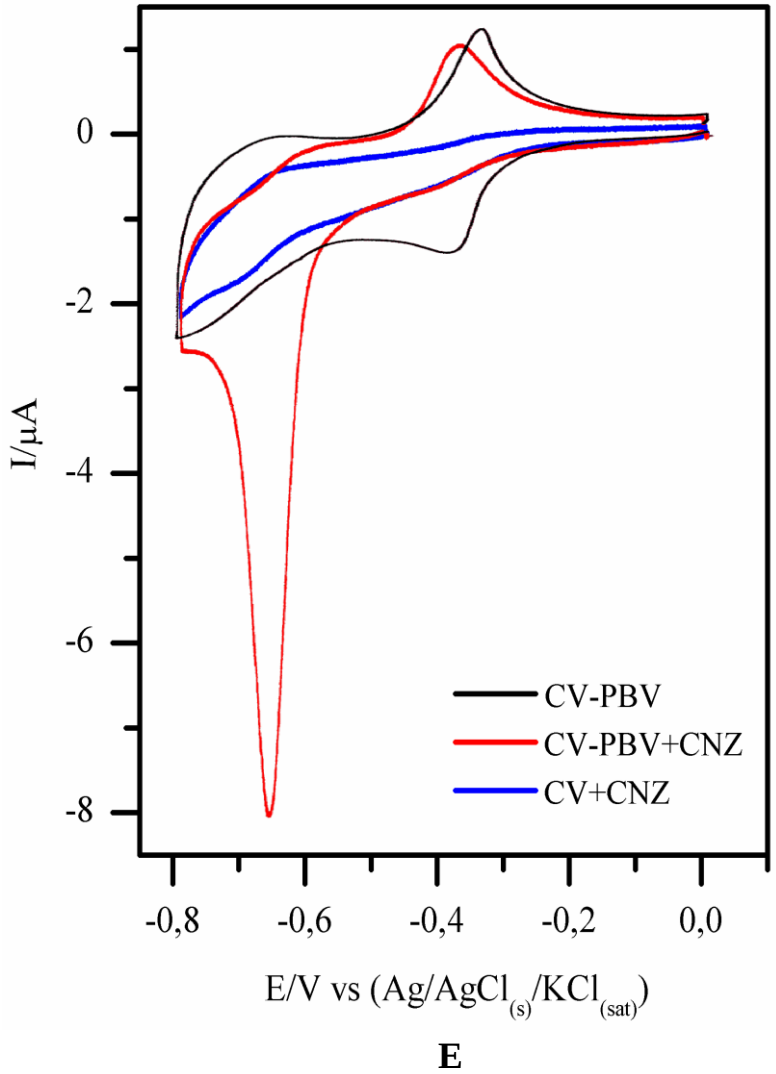
C

Figura 14. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s. C**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ.



D

Figura 14. Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s. D- Tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ.



E

Figura 14. Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. E- Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de CNZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de CNZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de CNZ.

Foi sugerido inicialmente que esse elevado valor de corrente em pH 12,0 poderia ser resultado da adsorção do fármaco no filme polímero. Devido à interação das cargas de sinais opostos, o CNZ (carga negativa) estaria incorporando no filme (carga positiva). A **figura 15** apresenta os voltamogramas, com diferentes inícios da varredura de potencial (0 V; + 0,2 V e +0,4 V) referentes ao perfil eletroquímico do CNZ em pH 12,0 analisado com CV-PBV a 10 mV s^{-1}. Como o CNZ possui carga negativa neste pH, o início da varredura em potenciais positivos proporciona a chegada de mais espécies negativas na superfície do eletrodo. Uma vez que, o polímero incorpora essas espécies negativas, o aumento da resposta (corrente) seria esperado. Porém, os voltamogramas com início das varreduras em potenciais mais positivos apresentam as menores respostas (**fig**. **15**). Primeiro foi feito o voltamograma partindo de 0 V, depois começando em +0,2 V e o último voltamograma teve seu início em +0,4 V.

Foi verificado que, essa diminuição na resposta estava relacionada com a perda do filme polimérico. À medida que o tampão fosfato foi submetido a potenciais positivos, os ânions foram atraídos para o eletrodo e podem ter ocasionado a substituição do PF_6^- que estava como contraíon do polímero. O íon PF_6^- mantém o PBV na superfície do eletrodo, por tornar esse composto (PBV) insolúvel em solução aquosa, uma vez que este contraíon foi substituído, o filme polimérico acaba saindo da superfície do eletrodo. Isto pode ser constatado com a diminuição dos valores do Ip_c para eletrodo CV-PBV quando o mesmo experimento foi desenvolvido na ausência do CNZ. Este comportamento está apresentado na **figura 16**. Portanto, apenas com esse experimento não foi possível comprovar se, de fato, há uma incorporação do CNZ no PBV.

Foi desenvolvido um experimento utilizando a técnica de espectroeletroquímica (já utilizada na caracterização do PBV) para verificação da possível adsorção, porém essa técnica não foi sensível o bastante. A absorbância do cátion radical $PBV^{\bullet+}$ formado na superfície do eletrodo já modificado é muito pequena (abaixo do valor 0,1) e a verificação de alguma mudança por conta da incorporação do CNZ não foi possível, visto que, a quantidade de CNZ possivelmente adsorvido no polímero, também seria pequena. Após a modificação do eletrodo de ITO com o PBV, foi feito o espectro de absorção durante a aplicação de -0,4 V em seguida, o eletrodo ITO-PBV foi submetido à análise com CNZ,

lavado com água e, novamente feito um espectro em com aplicação -0,4 V. Nenhuma mudança foi observada. As análise foram feitas em tampão fosfato pH 12,0. A concentração de CNZ utilizada foi 70 μmol L^{-1}.

Um experimento semelhante ao anterior (espectroeletroquímica) foi desenvolvido ainda em relação à possível adsorção. Neste experimento, o eletrodo utilizado foi o CV-PBV e ao invés da espectroeletroquímica, utilizou-se a voltametria cíclica. Após a obtenção do eletrodo CV-PBV, o mesmo foi utilizado na análise de CNZ 70 μmol L^{-1} em tampão fosfato pH 12,0 e, em seguida lavado com água destilada e inserido em tampão fosfato na ausência do fármaco. O Ip_c obtido para a análise do CNZ com o eletrodo CV-PBV não foi observado quando utilizou-se o mesmo eletrodo (após análise do CNZ) na ausência do fármaco.

Diante dos resultados apresentados, a elevada corrente obtida na análise do CNZ em pH 12,0 com o eletrodo CV-PBV, justifica-se pela interação entre as cargas do analito e do polímero no momento da análise.

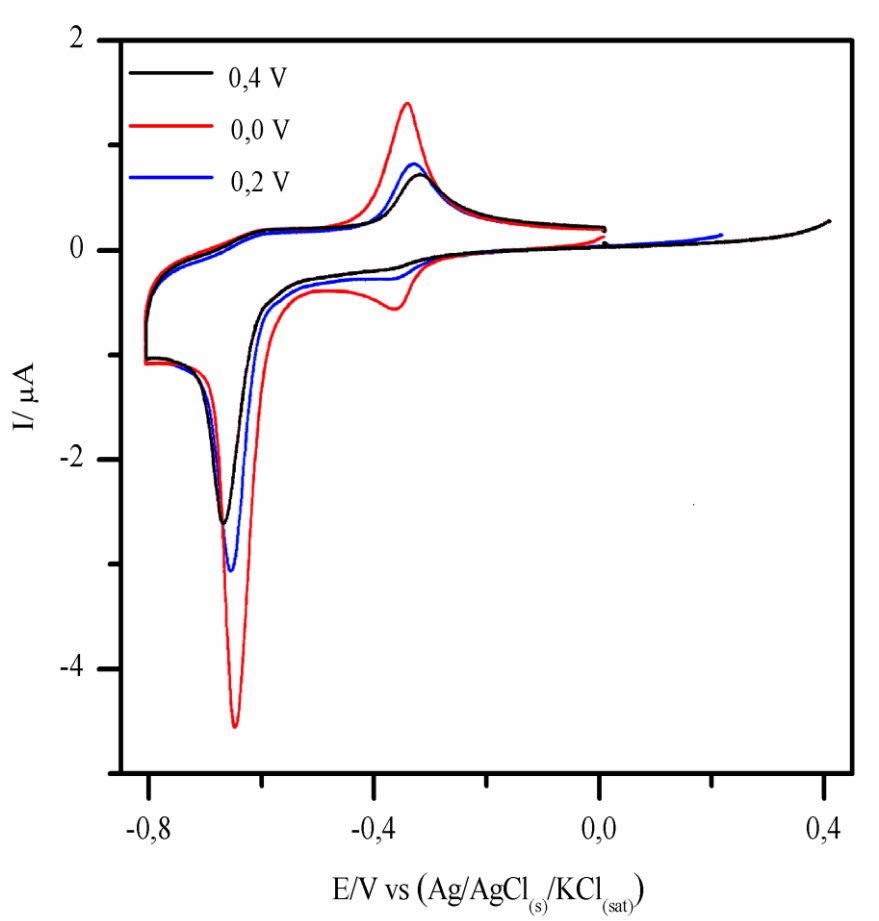


Figura 15. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CNZ 70 µmol L^{-1} em pH 12 em diferentes inícios de varredura de potencial a 10 mV s^{-1} com o eletrodo CV-PBV**. Voltamograma na cor **preta**: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em 0 V. Voltamograma na cor **azul**: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em + 0,2 V . Voltamograma na cor **vermelha**: análise de CNZ em pH 12,0, varredura iniciada em +0,4 V.

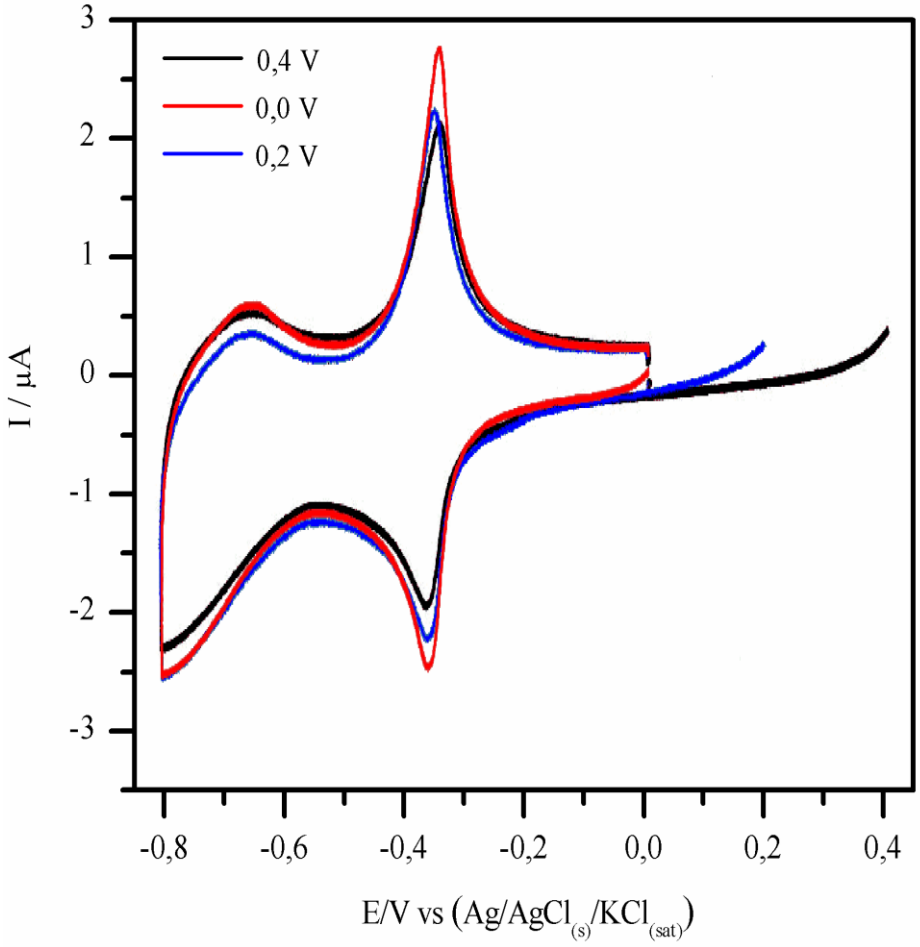


Figura 16. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do CV-PBV em pH 12 em diferentes inícios de varredura de potencial a 10 mV s^{-1}**. Voltamograma na cor **preta**: CV-PBV em pH 12,0, varredura iniciada em 0 V. Voltamograma na cor **azul**: CV-PBV em pH 12,0,varredura iniciada em + 0,2 V . Voltamograma na cor **vermelha**: CV-PBV em pH 12,0, varredura iniciada em +0,4 V.

4.4.4 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo

O valor do coeficiente difusional das espécies redox (*D*) foi obtido a partir do valor da inclinação do gráfico de Levich. Para tanto, a corrente limite de redução do CNZ foi calculada para o eletrodo de disco rotativo de CV modificado com PBV. A concentração de CNZ utilizada foi 100 μmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. A velocidade angular foi variada de 100 a 1000 rpm. Observou-se que a corrente limite aumentou com o aumento da velocidade de rotação, da mesma forma em que estão relacionadas na **equação 4** [99].

A **figura 17** apresenta o gráfico de Levich da corrente limite (μA) obtida em -0,420 mV (potencial de redução do CNZ para este eletrodo) em função da raiz da velocidade de rotação (rad s^{-1}). O valor da corrente limite manteve a linearidade para altas velocidades de rotação, o gráfico exibiu uma reta com $R^2 = 1$, sugerindo que não há controle cinético no processo de redução do CNZ com o eletrodo CV-PBV.

A partir do valor da inclinação da reta (**fig. 17**) e utilizando a **equação 4** foi possível determinar o valor de *D* para o CNZ. Desta forma, o valor de *D* determinado com o eletrodo CV-PBV foi 3,81 x 10^{-5} ± (0,02) cm^2 s^{-1}. O valor do coeficiente difusional varia com viscosidade do meio, fato que provavelmente justifica a diferença em relação ao valor apresentado por Kumar e colaboradores [106], uma vez que não foi utilizado o mesmo tampão para as duas análises. O trabalho citado utilizou o tampão citrato/borato/fosfato com pH 6,0.

$$\boldsymbol{I = 0,620\, n\, F\, A\, D^{2/3}\, \varpi^{1/2}\, \upsilon^{-1/6}\, [CNZ]} \qquad \textbf{(4)}$$

Onde: ***I*** = valor da corrente; ***n*** = número de mols envolvidos na reação do grupo nitro (= 4); ***F*** = 96485,3399 C mol^{-1} (constante de Faraday); **ϖ =** velocidade angular (rad s^{-1}); ***A*** é a área do eletrodo (= 0,20 cm^2); ***D*** = coeficiente difusional das espécies redox; **υ** = viscosidade cinemática do meio (= 0,01cm^2 s^{-1}).

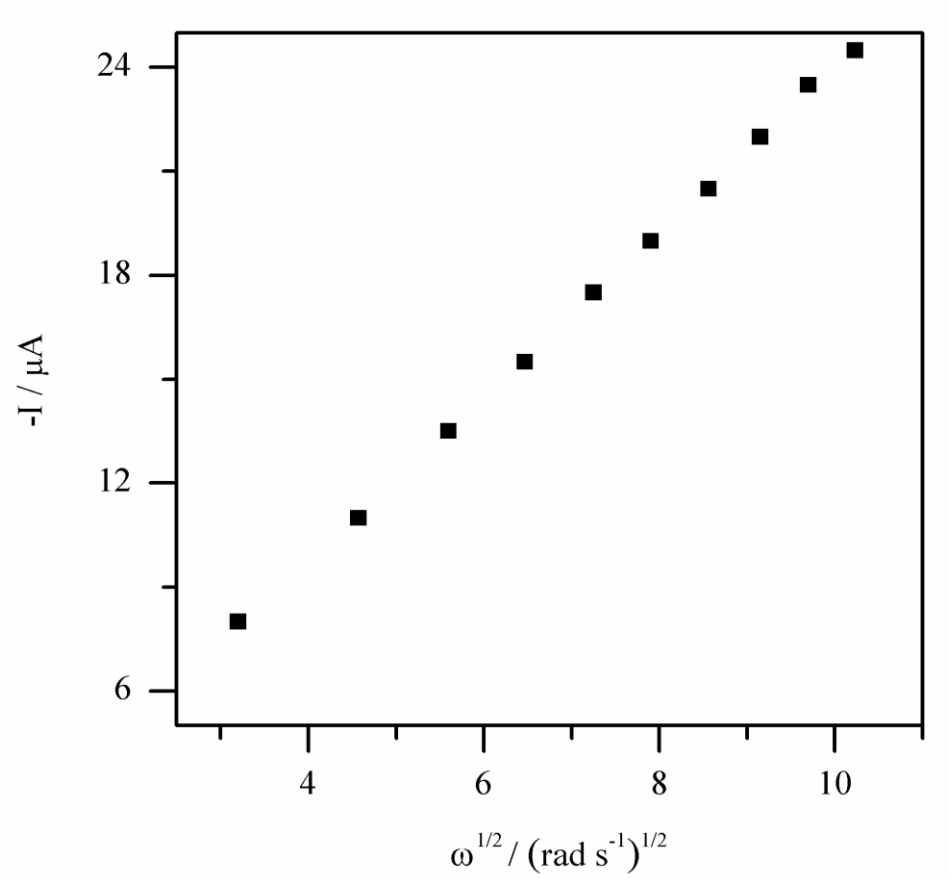


Figura 17. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de CNZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

O coeficiente difusional é característico de cada espécie redox, como identidade da mesma, assim, praticamente o mesmo valor para o *D* foi encontrado quanto utilizou-se o eletrodo polido (CV) nas mesmas condições do experimento anterior, utilizando os valores de corrente em -0,590 mV (potencial de redução do CNZ para este eletrodo). Essa proximidade entre os valores demonstra a confiabilidade na determinação experimental do coeficiente difusional do CNZ. A curva apresentou perfil linear (R^2 = 0,997) (**fig**. **18**) e o valor obtido para o *D* utilizando o eletrodo CV foi 3,89 x 10^{-5} (±0,05) cm^2 s^{-1}.

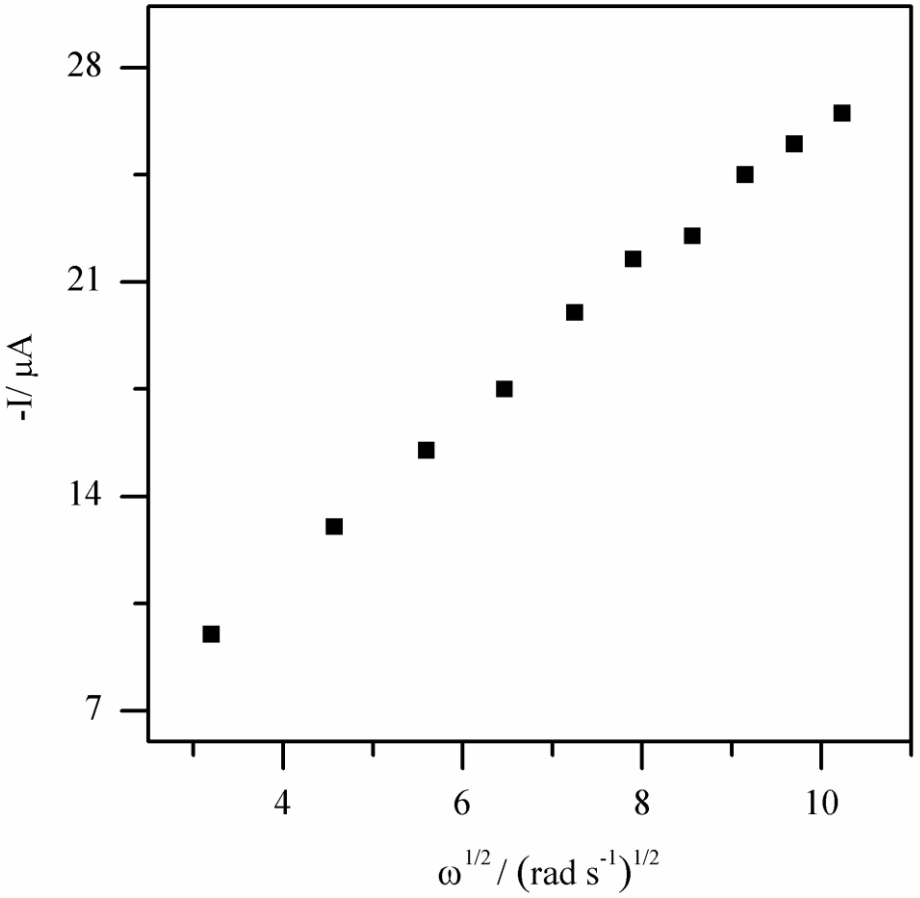


Figura 18. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de CNZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

4.4.5 Detecção de CNZ

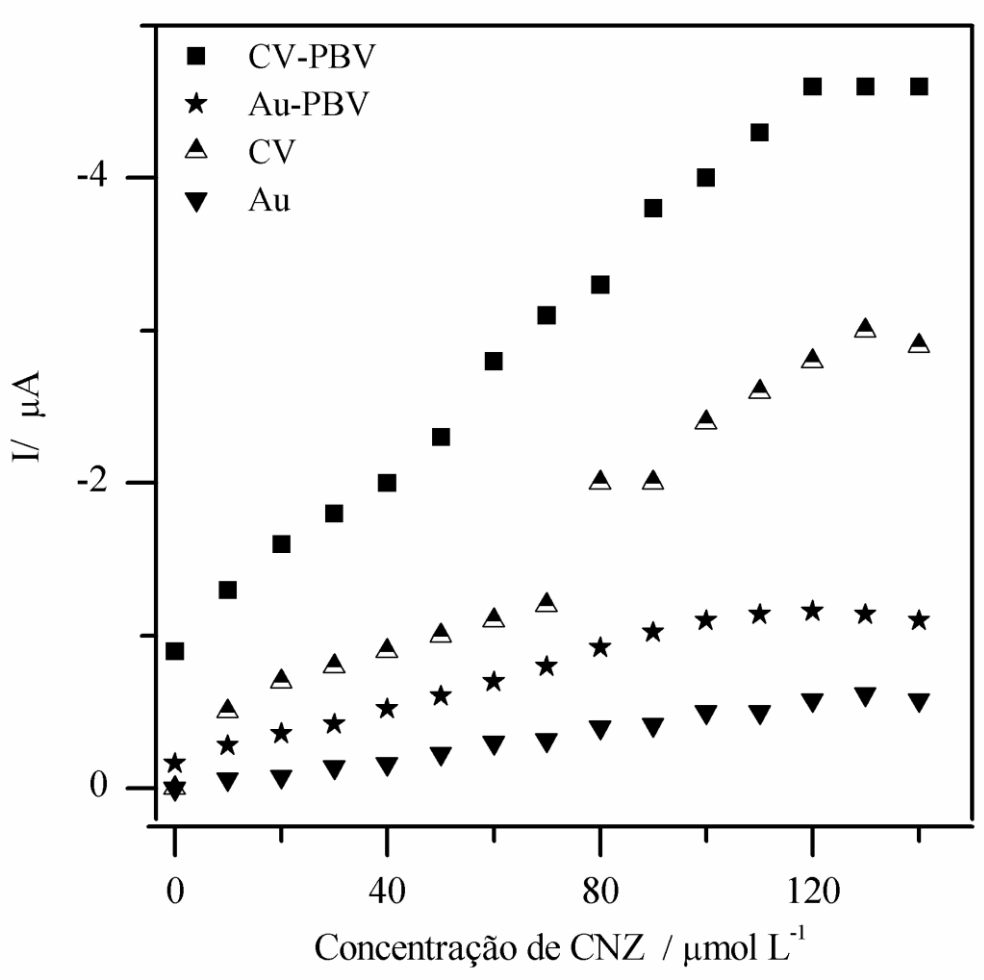
As **figuras 19 A**, **19 B** e **19 C** apresentam as curvas analíticas obtidas a partir dos valores de corrente em função da concentração de CNZ. As análises foram feitas por voltametria cíclica a 10 mV s^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 utilizando como eletrodo de trabalho CV, CV-PBV, Au e Au-PBV.

A resposta de cada eletrodo, em relação às concentrações de CNZ adicionadas, está apresentada na **figura 19 A**. Os valores de corrente observados no gráfico foram obtidos nos respectivos potenciais de redução do CNZ, para cada eletrodo de trabalho utilizado. O eletrodo CV-PBV apresentou eficiência na análise do fármaco, visto que, a corrente obtida para este eletrodo foi bem maior em relação aos demais eletrodos para a mesma análise.

Como se sabe, a corrente é proporcional à área do eletrodo e, consequentemente à cobertura do mesmo. Por este motivo, para viabilizar a comparação entre as respostas dos eletrodos, uma vez que se tratava de coberturas e áreas diferentes, os valores de corrente foram normalizados pela área ou cobertura (eletrodo polido ou modificado, respectivamente) e os valores obtidos estão apresentados na **figura 19 B**.

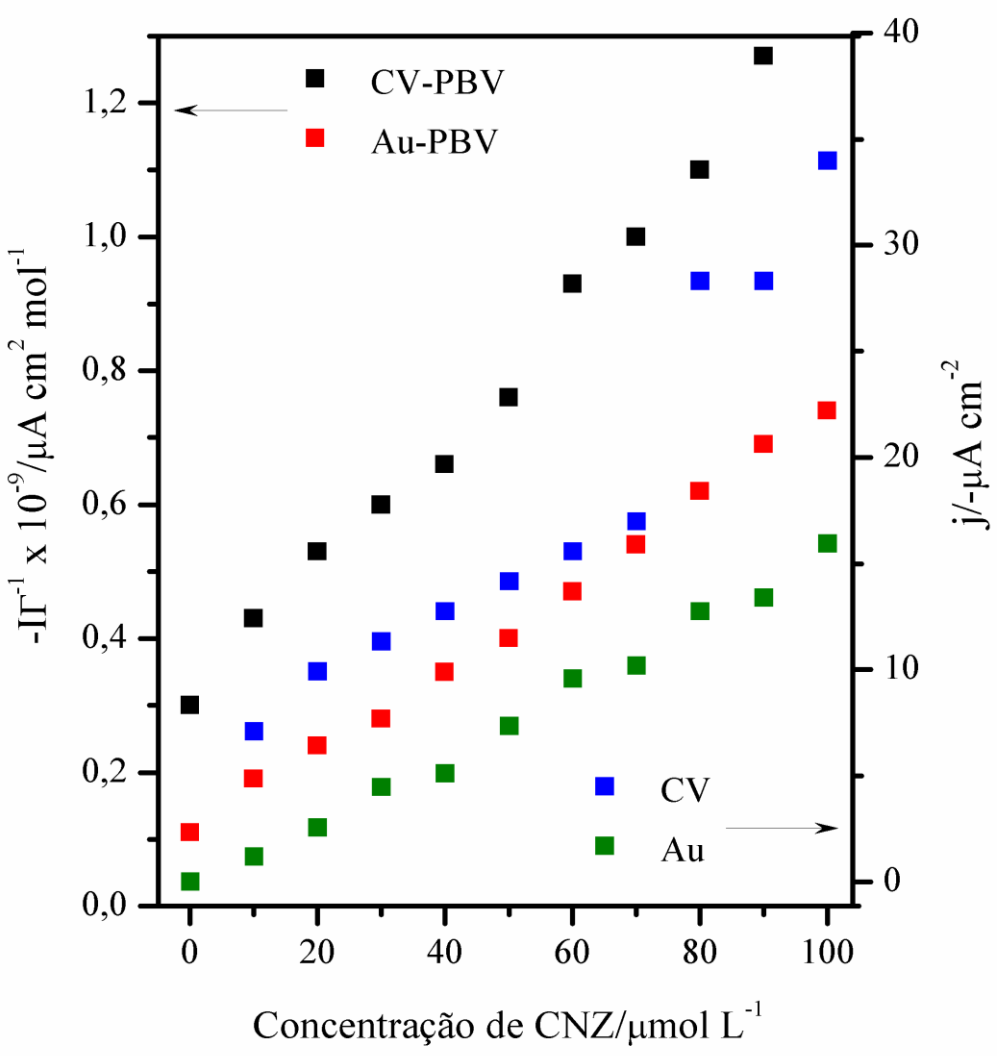
A **figura 19 B** apresenta o gráfico que relaciona os valores de corrente obtidos nos respectivos potenciais de redução do CNZ, para cada eletrodo de trabalho utilizado, normalizados pela cobertura ou área. Estes valores de corrente normalizados estão apresentados em função da concentração de CNZ. Verificou-se que a resposta de todos os eletrodos apresentou certa linearidade, porém, o eletrodo CV-PBV demonstrou melhor desempenho, em relação ao eletrodo Au-PBV. A sensibilidade da análise pode ser avaliada através da inclinação da curva analítica, ou seja, o eletrodo CV-PBV apresentou melhor sensibilidade para a análise do CNZ. Vale ressaltar que, além da melhor resposta apresentada pelo eletrodo CV-PBV, o mesmo também foi capaz de diminuir em 170 mV o valor de potencial da redução do fármaco (em comparação ao eletrodo polido).

Os valores dos potenciais de redução do CNZ (Ep_c) para cada eletrodo de trabalho foram: CV = Ep_c ~ -0,590 V, CV-PBV = Ep_c -0,420 V, Au = Ep_c ~ -0,560 V e Au-PBV = Ep_c -0,430 V. Os valores de cobertura calculados: 3,0 x10^{-9} mol cm^{-2} para CV-PBV e 1,5 x 10^{-9} mol cm^{-2} para Au-PBV e os valores das áreas geométricas para os eletrodos polidos: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2.



A

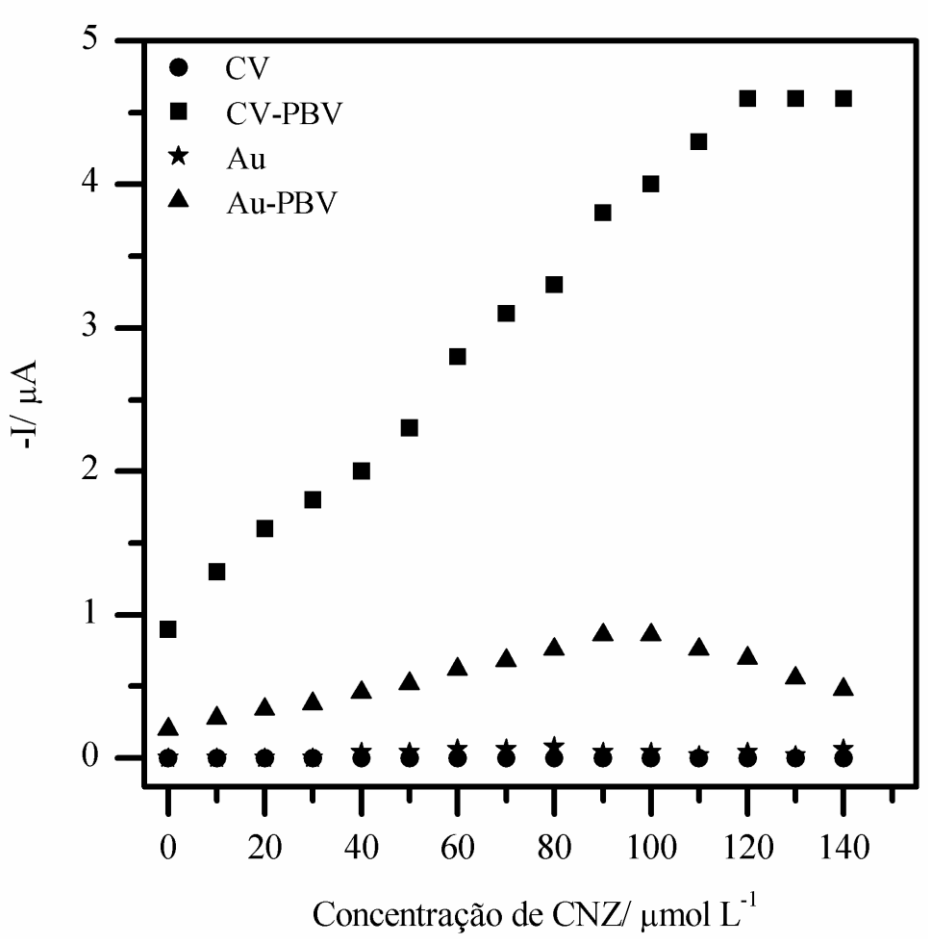
Figura 19. **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}**. **A**- Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) nos respectivos potenciais de redução do CNZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 140 μmol L^{-1}. Dados: CV = Ep_c ~ -0,590 V, CV-PBV = Ep_c -0,420 V, Au = Ep_c ~ -0,560 V e Au-PBV = Ep_c -0,430 V.



B

Figura 19. **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}**. **B**- Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução do CNZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 100 μmol L^{-1}. Dados: cobertura calculada para CV-PBV 3,0 x 10^{-9} mol cm^{-2}, para Au-PBV 1,5 x 10^{-9} mol cm^{-2}, valores das áreas geométricas para os eletrodos polidos: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2. CV = Ep_c ~ -0,590 V, CV-PBV = Ep_c -0,420 V, Au = Ep_c ~ -0,560 V e Au-PBV = Ep_c -0,430 V.

A **figura 19 C** apresenta os valores de corrente determinados em -0,420 V (para todos os eletrodos de trabalho) em função da concentração de CNZ. Esta figura ilustra melhor a eficiência do eletrodo CV-PBV, uma vez que, neste potencial (-0,420 V), apenas o eletrodo CV-PBV foi capaz de reduzir o fármaco CNZ. Os demais eletrodos de trabalhos utilizados precisaram de mais energia para reduzir o CNZ, indo assim, para potenciais mais negativos. A resposta do eletrodo CV-PBV foi linear em relação à concentração de CNZ até 120 μmol L^{-1} com R^2= 0,9951 e, pode ser determinada através da equação I= 0,031 (μA μmol^{-1} L) [CNZ] + 0,90 ($\pm$0,04) (μA).



C

Figura 19. **Determinação de CNZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}**. **C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) obtidos em -0,420 V para todos os eletrodo de trabalho em função das mesmas concentrações de CNZ analisadas. Concentrações de CNZ totais adicionadas: 10 a 140 µmol L^{-1}.

4.4.6 Análise de amostras comerciais

A fim de verificar a aplicabilidade do eletrodo CV-PBV na determinação de CNZ em amostras comerciais, uma análise com medicamento de referência Rivotril® em gotas foi desenvolvida utilizando o referido eletrodo. Para tanto, foi utilizada uma alíquota do medicamento Rivotril®, sem prévia dissolução, correspondente a 7,0 μmol L^{-1} de CNZ, mediante as informações do fabricante contida na bula do medicamento. A análise foi feita em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. O valor da concentração de CNZ (no Rivotril®) foi determinado pelo método de adição de padrão.

Os valores de corrente em função da concentração de CNZ estão apresentados na **figura 20**. Estes valores são referentes à alíquota do medicamento (ponto correspondente a 0 μmol L^{-1} de CNZ) e às demais adições do padrão CNZ (de 10 a 90 μmol L^{-1}). A figura representa a média de três determinações, relacionadas através da barra de erro em cada um dos pontos da curva. Estas determinações foram feitas em dias diferentes, com eletrodos CV-PBV preparados com o mesmo método de modificação, para cada uma das análises.

O valor obtido experimentalmente para a concentração de CNZ presente no Rivotril® foi calculado através da regressão linear (**fig**. **20**), a qual descreve a equação I = 0,033 (μA μmol^{-1} L) [CNZ] + 0,21 (±0,50 x 10^{-3}) (μA) com R^2= 0,999. A concentração de CNZ encontrada foi de 7,0 μmol L^{-1}, que corresponde a um fator de recuperação de 100%. Como já foi explicado, através da inclinação da curva é possível dimensionar a sensibilidade da análise. O valor encontrado para a sensibilidade foi 33 nA μmol^{-1} L, que indica uma boa sensibilidade para o método proposto. Quando se compra este valor de sensibilidade com o valor obtido para a inclinação da reta (CV-PBV) apresentada na **figura 19 C**, é notória a semelhança entre eles, este fato indica boa reprodutibilidade para o método de análise de CNZ com o eletrodo CV-PBV.

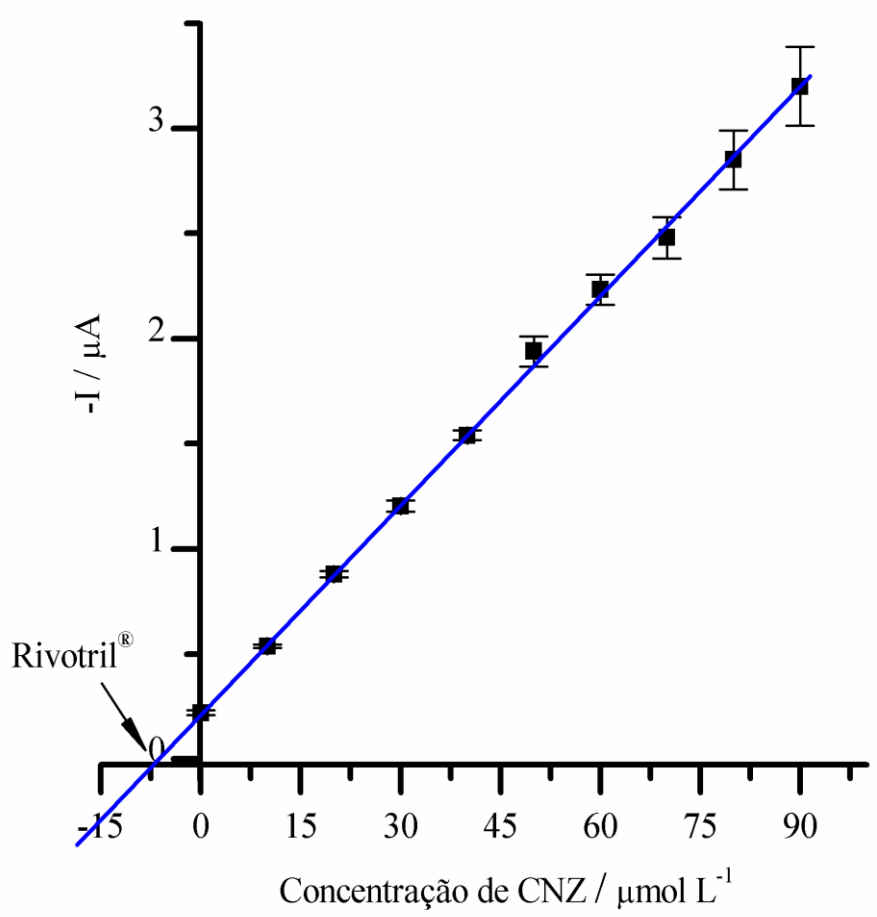


Figura 20. **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de CNZ adicionada, inclusive para o fármaco Rivotril®. Os pontos apresentados são as médias de três determinações feitas em dias diferentes com diferentes eletrodos CV-PBV. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

A **figura 21** apresenta o gráfico no qual, os valores de corrente obtidos para a análise de Rivotril®, a mesma análise descrita anteriormente, encontram-se normalizados pela cobertura. Nota-se que, a linearidade apresentada pelo método de análise manteve-se em relação às três determinações. As análises apresentaram semelhança nas respostas em relação aos valores de corrente normalizados pela cobertura, com uma boa correlação linear. Esse resultado indica que a resposta do eletrodo modificado independe do dia no qual a análise foi desenvolvida, ou seja, do valor de exato de cobertura (na faixa dos valores de cobertura obtidos para estas análises).

Apesar de cada modificação não oferecer exatamente o mesmo valor de cobertura, o que seria um impedimento para a reprodutibilidade das análises, dentro da faixa dos valores de cobertura que o método de modificação ofereceu, o método de análise de CNZ demonstrou-se reprodutível. Deste modo, é possível traçar uma curva analítica universal, dentro da faixa dos valores de cobertura estudados, para ser aplicada nas determinações analíticas [45]. Esta curva (**fig**. **21**) apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,982. O eletrodo CV-PBV deixou de responder linearmente com a concentração do fármaco a partir do valor de cobertura de $3,2 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}.

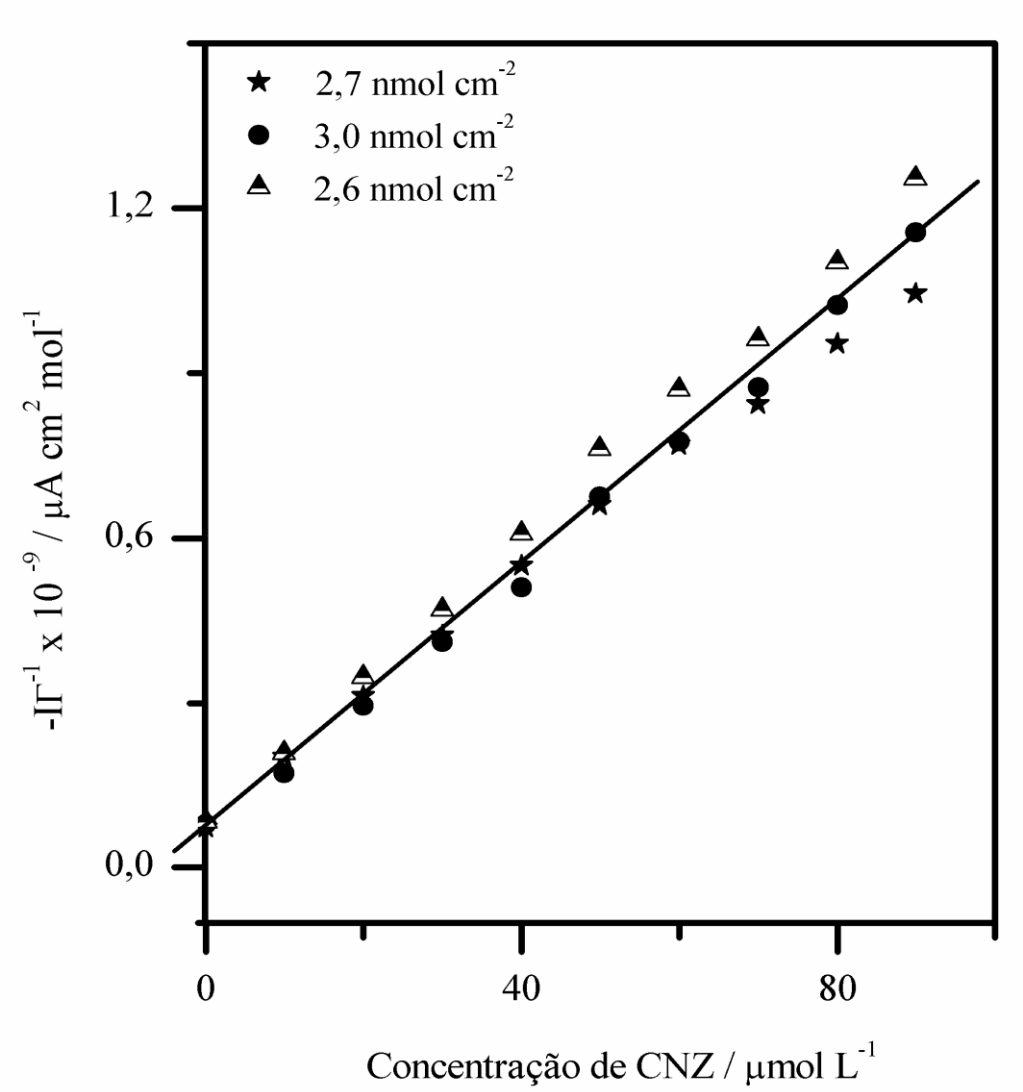


Figura 21. **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de CNZ adicionada, inclusive para o fármaco Rivotril®, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Três análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10

4.5 Nitrazepam

Como o padrão de CNZ determinado por cromatografia apresentou aproximadamente 100% de recuperação e as determinações eletroquímicas com o eletrodo CV-PBV também ficaram na mesma faixa, concluiu-se que, o método eletroquímico foi confiável. Assim, como as análises eletroquímicas do NTZ também produziram resultados satisfatórios (aprox. 100% de recuperação), julgou-se que a determinação do teor de NTZ por cromatográfica não era necessária.

4.5.1 Espectros de absorção em diferentes pH_s

Os espectro de absorção do NTZ foram realizados em diferentes pH_s, da mesma forma descrita para o CNZ. Devido à semelhança entre as moléculas do CNZ e do NTZ, os valores dos pK_{as}, são bem próximos. A **figura 22** apresenta a estrutura química do NTZ, assim como os valores de seus pK_{as}

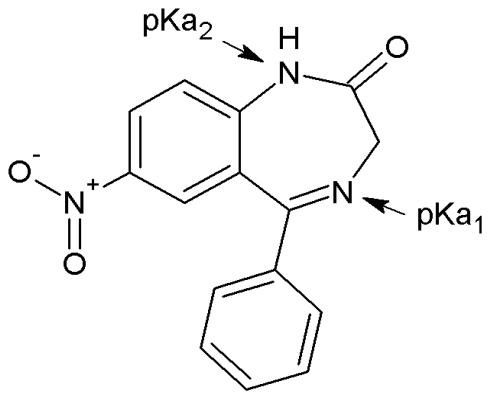


Figura 22. **Representação da estrutura química do NTZ e seus respetivos pK_{as}**. Estrutura química do NTZ e os valores de seus pK_{as}: pK_{a1} = 2,98; pK_{a2} = 10,55. 281,27 g mol^{-1} [107].

Os espectros de absorção do NTZ em diferentes pH_s estão apresentados na **figura 23**. O perfil de absorção de luz para o NTZ foi similar aos espectros apresentados para o CNZ. Assim, o embasamento da explicação do perfil de absorção do CNZ nos referidos pH_s é, de forma geral, válido para o resultado com o NTZ.

Na **figura 23**, basicamente, observam-se três perfis de absorção característicos; que podem ser resumidos em quatro regiões distintas com $\lambda_{max.}$ de 260, 275, 310 e 370 nm. Nos pH_s 5,0; 7,0 e 9,0 observou-se o mesmo perfil: dois picos com absorção máxima em 260 e 310 nm. Esta semelhança nas bandas de absorção é devida à relação entres estes pH_s e o valor o pK_{a1}. Quando o valor do pH está acima do pK_a, a molécula perde o próton, portanto, considerando o valor do pK_{a1} = 2,98, a molécula de NTZ se encontrava na forma monoprotonada nos pH_s de 5,0 a 9,0, resultando assim, espectros semelhantes.

Em pH 2,0, foi visualizada uma banda alargada e distorcida, com absorção máxima próxima a 275 nm, isso porque o valor de pH está muito próximo ao valor do pK_a, coexiste possivelmente, proporções semelhantes da molécula na forma protonada e desprotonada.

Em pH 12,0, observou-se um deslocamento da banda de absorção para uma região do espectro diferente das apresentadas anteriormente. O máximo de absorção aconteceu em 370 nm, ou seja, uma região de menor energia. Este deslocamento batocrômico só foi possível devido a uma maior facilidade na transição eletrônica, originada pela perda do segundo próton (pK_{a2} = 10,55).

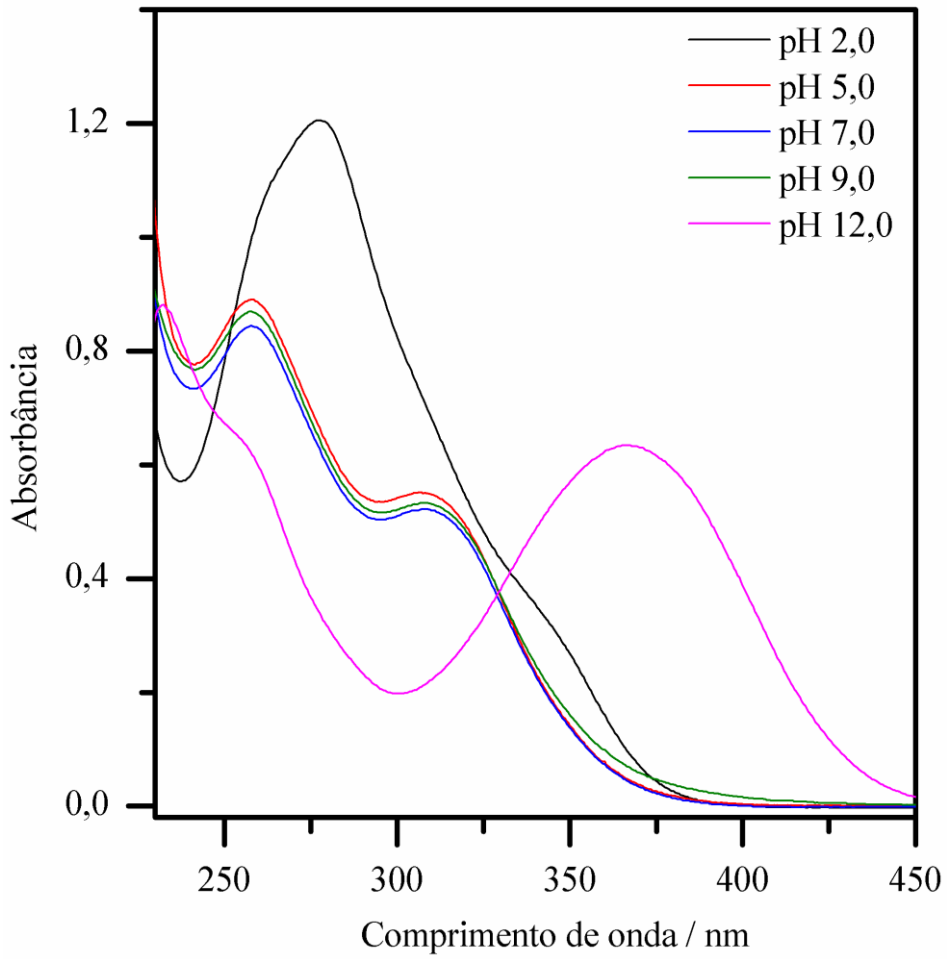


Figura 23: **Espectro de absorção do NTZ 50 μmol L^{-1} em diferentes pHs**. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0; tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0; tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0.

4.5.2 Comportamento eletroquímico do NTZ em diferentes pH_s

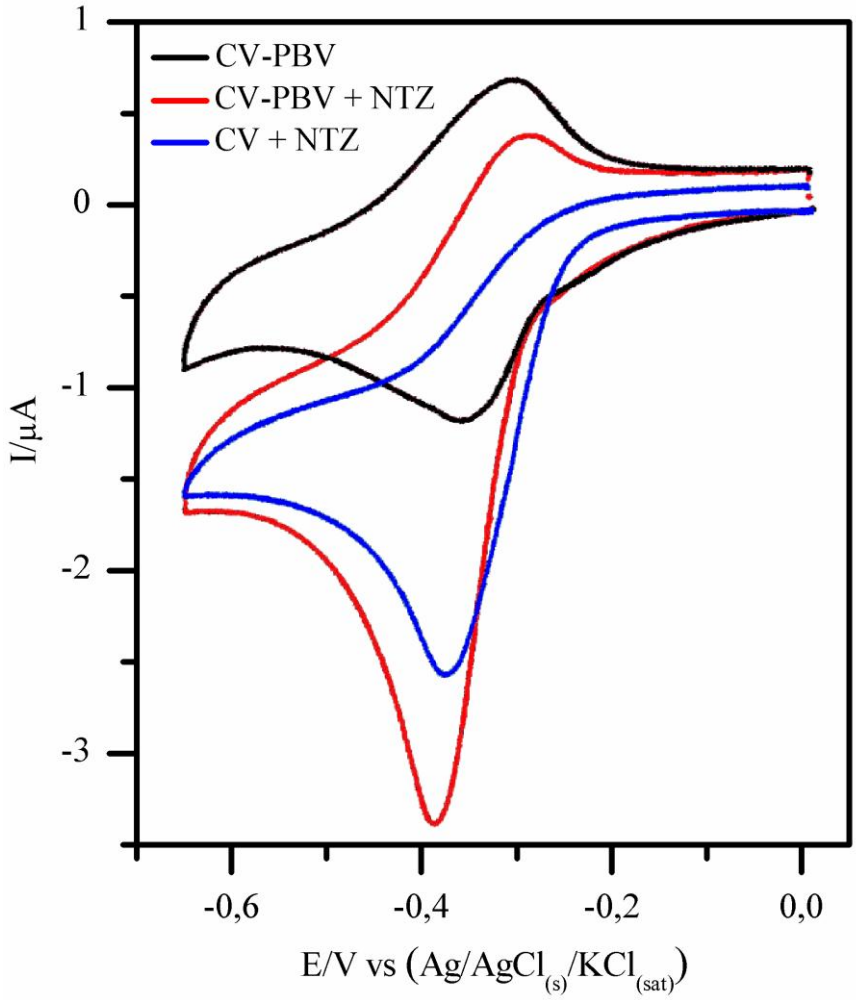
O comportamento eletroquímico do NTZ foi analisado somente para alguns valores de pH, dentre aqueles citados nos experimentos com o CNZ. Utilizou-se valores extremos de pH: 2,0 e 12,0. O pH 7,0 também foi analisado, como padrão de comparação para os outros pH_s. Nesta faixa de pH selecionada, o tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} foi utilizado, de acordo

com a capacidade tamponante de cada par ácido/base conjugado. Como já foi dito, as estruturas das moléculas do CNZ e do NTZ são muito semelhantes. O comportamento eletroquímico associado ao pH, obtido para o CNZ, também foi esperado para o NTZ. Desta forma, a redução eletroquímica do NTZ foi realizada em meio ácido, neutro e básico para a confirmação do comportamento eletroquímico desta molécula frente a condições extremas de pH.

Como pode ser observado na **figura 24 A**, em comparação aos voltamogramas apresentados nas **figuras 24 B** e **24 C**, houve um adiantamento no potencial de redução do fármaco, tanto para a análise desenvolvida com o eletrodo polido, quanto para o modificado. A condição do meio propiciou uma diminuição na energia requerida para reação, ou seja, houve um o favorecimento para a redução do NTZ em pH ácido. Esse comportamento está de acordo com o mecanismo geral proposto para a redução eletroquímica de compostos nitroaromáticos, como já discutido na **seção 4.4.3**.

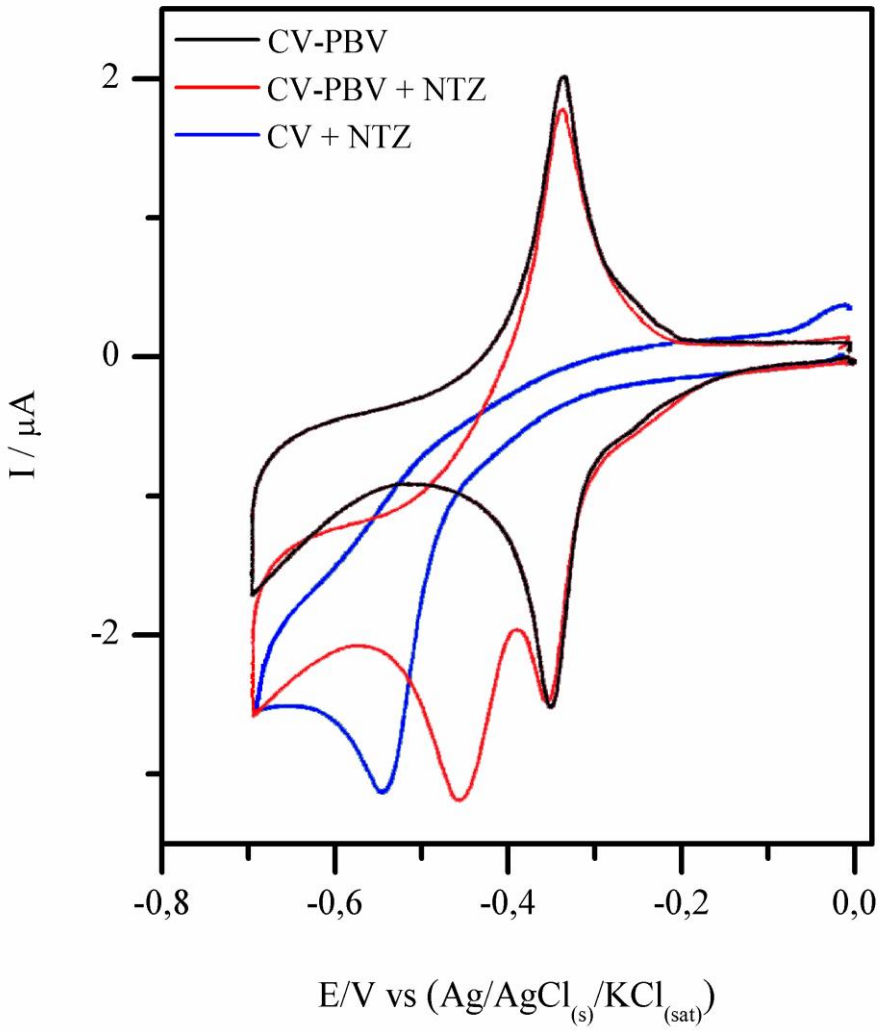
Em pH 7,0 (**fig**. **24 B**), o potencial de redução do NTZ, utilizando o eletrodo modificado (CV-PBV), teve valor menos negativo em relação ao potencial obtido na análise desenvolvida com o eletrodo polido (CV). A diminuição do potencial de redução do NTZ alcançou 100 mV (aproximadamente) em pH 7,0.

Em pH 12,0 (**fig**. **24 C**), o valor de corrente obtido para a análise do NTZ, utilizando CV-PBV foi substancialmente maior em relação à mesma análise utilizando CV polido. Novamente, a explicação cabível é interação entre cargas de sinais opostos, ou seja, a do polímero (carga positiva) e a do fármaco que, neste pH, apresenta carga negativa. Consequentemente, essa interação possibilitou a atração de um maior número de moléculas do fármaco na superfície do eletrodo, o que aumentou sua resposta, traduzida no elevado valor de corrente obtido nesta análise.



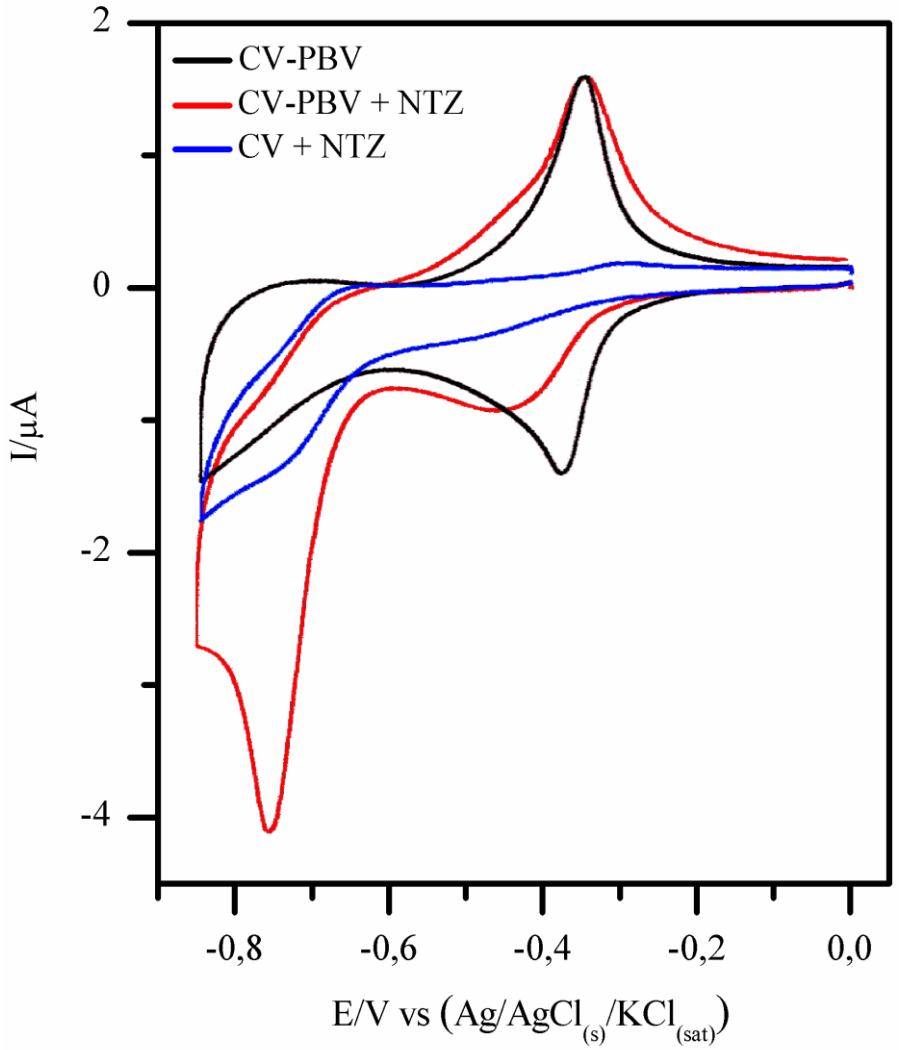
A

Figura 24. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **A**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 2,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ.



B

Figura 24. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **B**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ.



C

Figura 24. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do NTZ 70 μmol L^{-1} em diferentes pH_s. C**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de NTZ. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de NTZ. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de NTZ.

4.5.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo

O valor do coeficiente difusional das espécies redox (*D*) para o NTZ foi obtido a partir da **equação 4** (**seção 4.4.4**) e do gráfico de Levich. O valor de *D* foi calculado para o eletrodo disco rotativo de carbono vítreo modificado com PBV. A concentração do fármaco utilizada foi 100 μmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. A velocidade angular foi variada de 100 a 1000 rpm. Da mesma forma em que a corrente variou linearmente com a velocidade de rotação, explicado na **seção 4.4.4**, observou-se a mesma correspondência linear para o NTZ.

A **figura 25** apresenta o gráfico de Levich da corrente limite (μA), obtida em -0,470 mV (potencial de redução do NTZ para este eletrodo), em função da raiz da velocidade de rotação (rad s^{-1}) para o eletrodo CV-PBV. É notório que a corrente manteve a correspondência linear (R^2= 0,997) com a velocidade de rotação, mesmo quando altos valores de velocidade de rotação foram atingidos. Esta linearidade sugere que não há controle cinético no processo de redução do NTZ com o eletrodo CV-PBV. O valor do *D* determinado a partir da inclinação da reta, relacionada com a **equação 4**, foi 4,02 x 10^{-5} (± 0,04) cm^2 s^{-1} para o NTZ analisado com o eletrodo CV-PBV. Exatamente o mesmo valor (4,02 x 10^{-5} (± 0,02) cm^2 s^{-1}) foi obtido quando se utilizou o eletrodo CV polido (Ep_c= -0,560; potencial de redução do NTZ para este eletrodo), demonstrando novamente a confiabilidade do método. O gráfico de Levich para o NTZ analisado com o eletrodo CV está apresentado na **figura 26**.

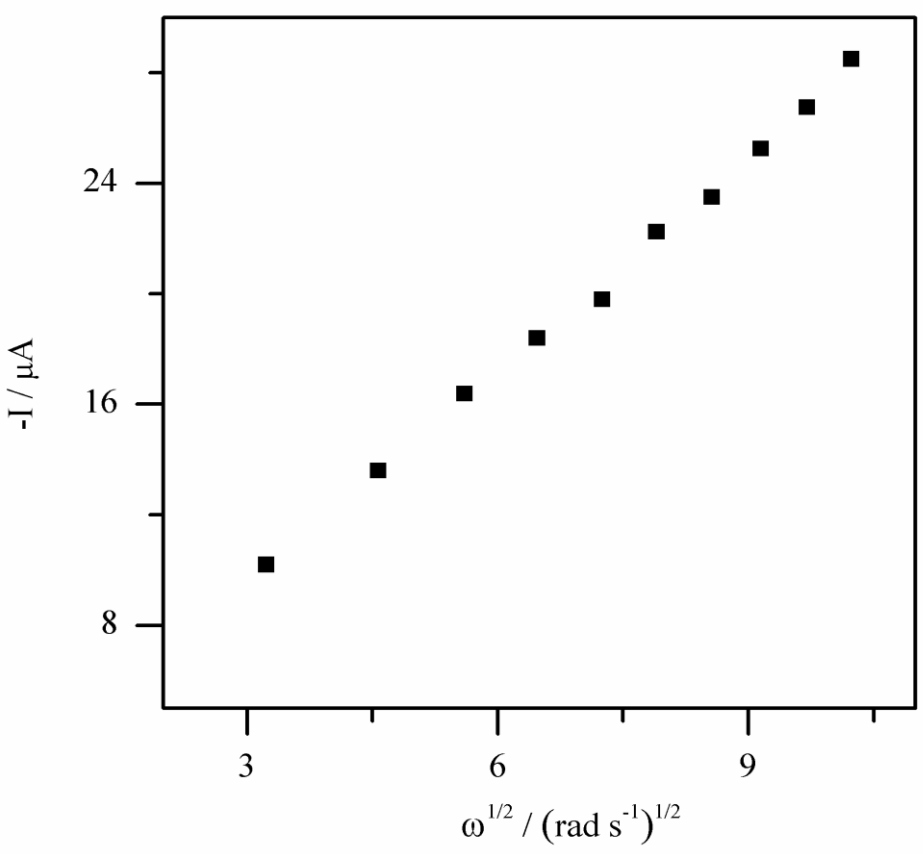


Figura 25. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de NTZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

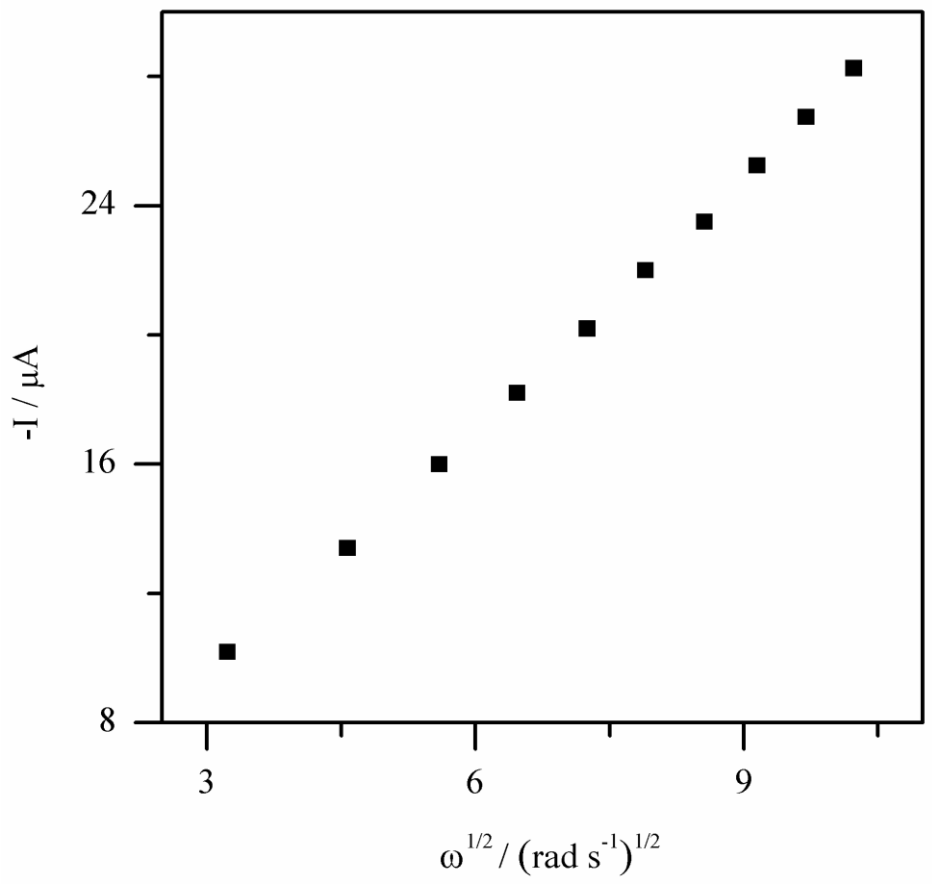


Figura 26. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de NTZ 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

4.5.4 Detecção de NTZ

As **figuras 27 A**, **27 B** e **27 C** apresentam as curvas analíticas obtidas a partir dos valores de corrente em função da concentração de NTZ. As análises foram feitas por voltametria cíclica a 10 mV s^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 utilizando como eletrodo de trabalho CV e Au polidos e modificados com PBV.

Na **figura 27 A** os valores de corrente correspondentes às concentrações de NTZ adicionadas, foram obtidos nos respectivos potenciais de redução para cada análise desenvolvida com cada eletrodo de trabalho. Os valores dos potenciais de redução do NTZ (Ep_c) em relação aos eletrodos de trabalho utilizados foram: CV = Ep_c ~ -0,560 V, CV-PBV = Ep_c -0,470 V, Au = Ep_c ~ -0,590 V e Au-PBV = Ep_c -0,470 V.

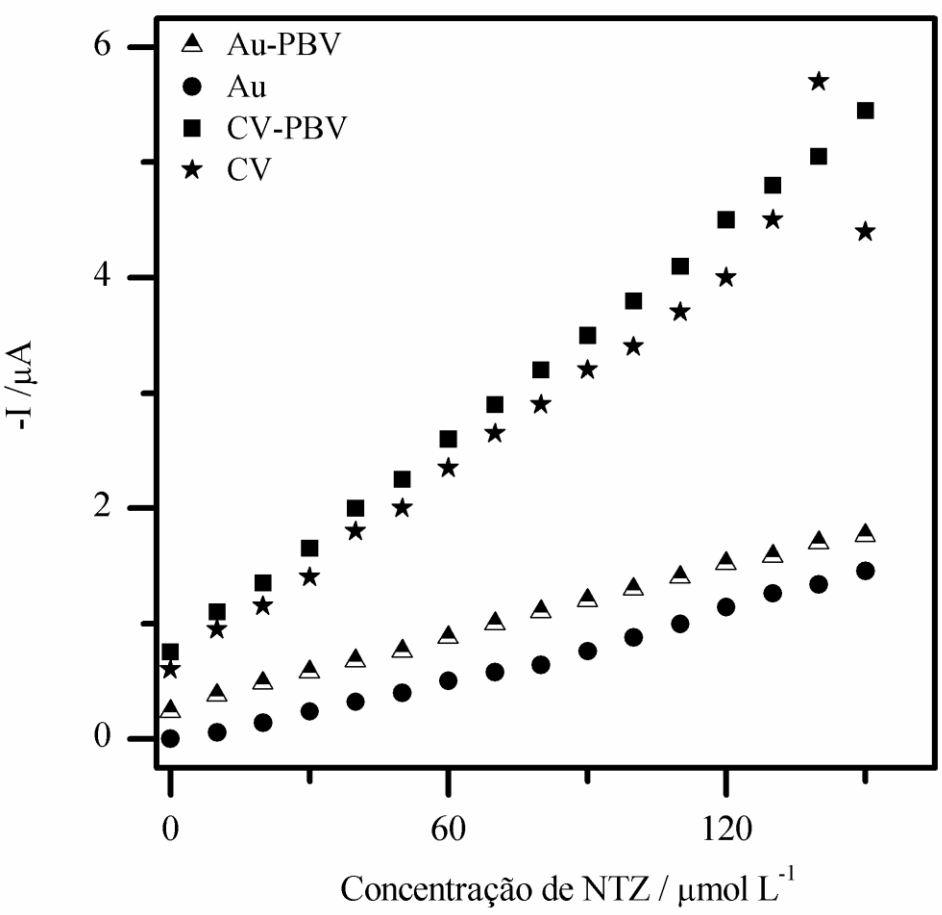
Todos os eletrodos apresentaram linearidade na reposta em relação à concentração do fármaco em até aproximadamente 120 μmol L^{-1}. Os eletrodos modificados apresentaram maior eficiência na análise do fármaco, visto que, o potencial de redução para o fármaco, quando analisado com os eletrodos modificados, foi menos negativo que em relação aos mesmos eletrodos polidos. A modificação com o polímero PBV diminuiu o potencial de redução do NTZ em 100 mV aprox. Porém, os valores de corrente obtidos para a análise utilizando tanto o eletrodo modificado, quanto o polido, foram bem próximos. Desta forma, os valores de sensibilidade em relação aos eletrodos polidos e modificados também ficaram próximos. Os valores de sensibilidade obtidos foram: CV-PBV = 31 nA μmol L^{-1} com R^2 = 0,999; CV = 28 nA μmol L^{-1} com R^2 =0,998; Au-PBV = 10 nA μmol L^{-1} com R^2 =0,999 e para o Au = 10 nA μmol L^{-1} com R^2 = 0,991.

A **figura 27 B** apresenta os valores de corrente normalizados, para a cobertura (eletrodos modificados) e área (eletrodos polidos), em função da concentração de NTZ. Todos os eletrodos apresentaram resposta linear em relação à concentração de NTZ, em até aprox. 120 μmol L^{-1}.

Vale ressaltar que, embora a sensibilidade do método de análise do NTZ com os eletrodos modificados não foi tão diferente da sensibilidade da análise com os eletrodos polidos, as melhores respostas (potencial de redução menos negativo) foram obtidas para as análises com os eletrodos modificados com PBV (Au-PBV e CV-PBV) e podem ser visualizadas na **figura 27 C**. Nesta figura, todos os valores de correntes foram obtidos no

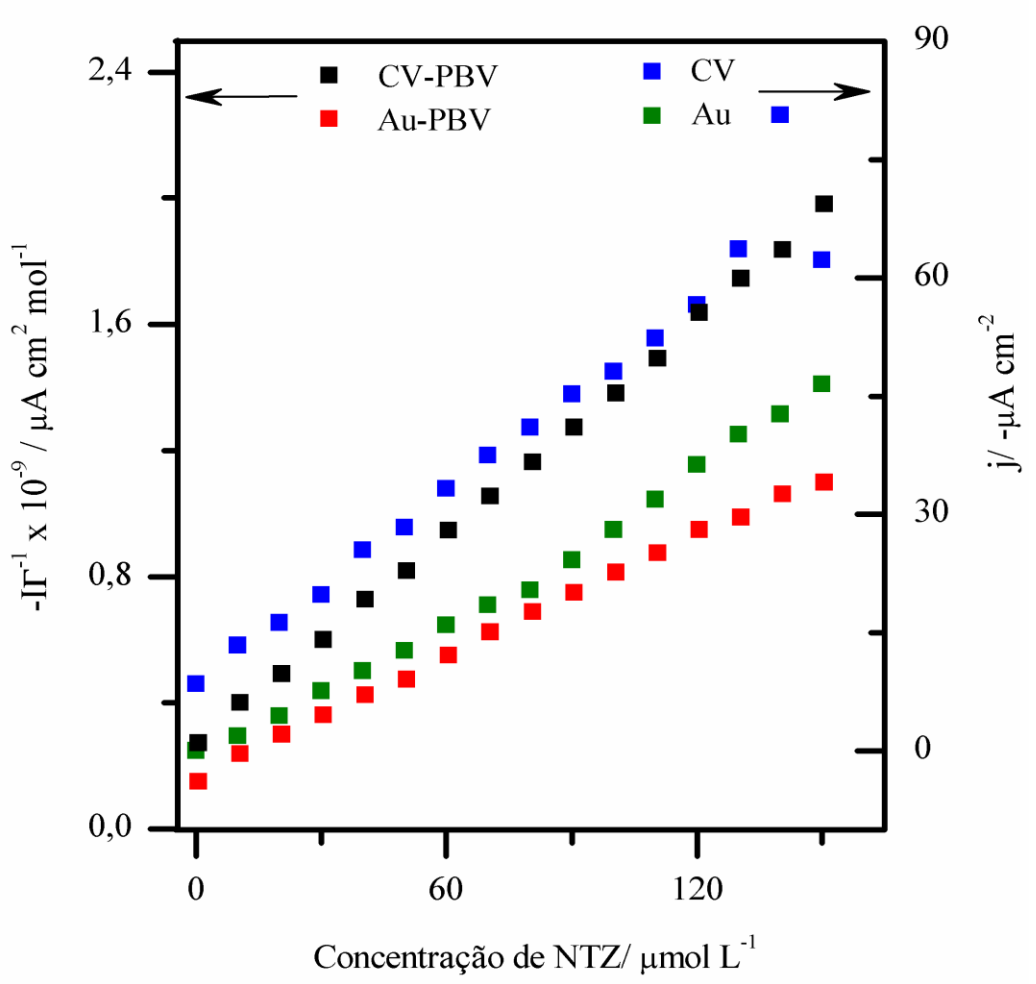
potencial de -0,470 V. Este potencial foi o menor para a redução do NTZ (considerando todos os eletrodos utilizados) e, somente os eletrodos modificados foram capazes de apresentar corrente significativa neste potencial, ou seja, apenas eles responderam para a análise em potencial menor.

Especificamente, o eletrodo Au-PBV diminuiu em aproximadamente 120 mV o valor do potencial de redução do fármaco em comparação ao eletrodo de Au polido. O eletrodo CV-PBV diminuiu em 90 mV o potencial de redução do NTZ em relação ao eletrodo de CV polido. Os maiores valores de corrente foram obtidos para a análise desenvolvida com o eletrodo CV-PBV (**fig**. **27 C**). Estes valores são coerentes ao tamanho da área do eletrodo. O eletrodo de CV possui uma dimensão de área maior em comparação com a área do eletrodo de Au assim, um maior valor de corrente era esperado para a análise desenvolvida com o eletrodo de CV.



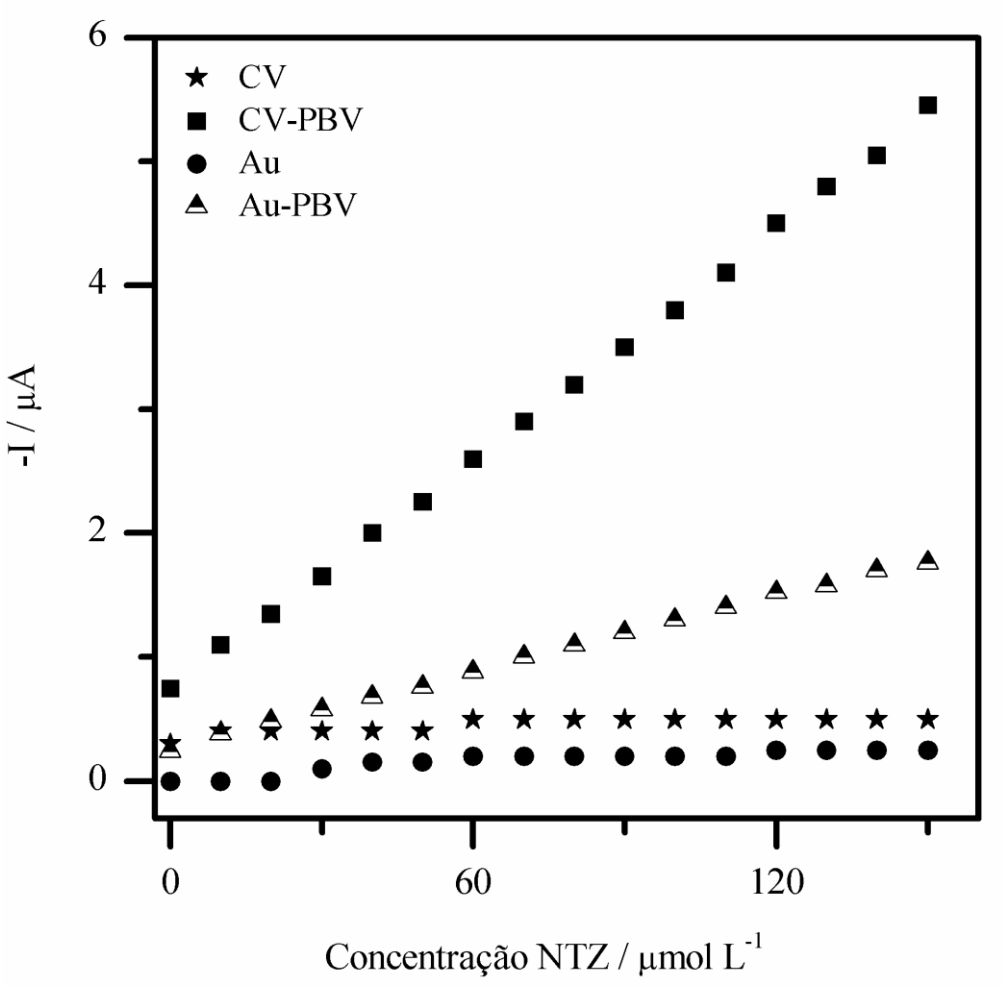
A

Figura 27. **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}**. **A-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) nos respectivos potenciais de redução do NTZ obtidos para as análises utilizando cada um dos eletrodo de trabalho. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}. Dados: CV = E_{pc} ~ -0,560 V, CV-PBV = Ep_c -0,470 V, Au = Ep_c ~ -0,590 V e Au-PBV = Ep_c -0,470 V.



B

Figura 27. **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. B-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução do NTZ obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 µmol L^{-1}. Os valores de cobertura calculados foram: 2,7 x 10^{-9} mol cm^{-2} para CV-PBV e 1,6 x 10^{-9} mol cm^{-2} para Au-PBV e os valores das áreas geométricas para os eletrodos de CV e Au polidos foram: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2. Dados: CV = E_{pc} ~ -0,560 V, CV-PBV = Ep_c -0,470 V, Au = Ep_c ~ -0,590 V e Au-PBV = Ep_c -0,470 V.



C

Figura 27. **Determinação de NTZ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}** a **10 mV s^{-1}**. **C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) obtidos em -0,470 V (para todos os eletrodos de trabalho) em função das mesmas concentração de NTZ analisadas com todos os eletrodos. Concentrações de NTZ totais adicionadas: 10 a 150 µmol L^{-1}.

4.5.5 Análise de amostras comerciais

A aplicabilidade do eletrodo CV-PBV na determinação de NTZ em amostras comerciais foi desenvolvida com o emprego do medicamento de Sonebon®. Para tanto, foi utilizado um volume proveniente da solução estoque 12,5 mmol L^{-1} do medicamento, correspondente a 7,0 μmol L^{-1}. A solução estoque foi preparada com os comprimidos (massa correspondente a 12,5 mmol $^{-1}$) em DMSO. A análise foi feita em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 com o eletrodo CV-PBV. O valor da concentração de NTZ foi determinado pelo método de adição de padrão.

Os valores de corrente, em função da concentração de NTZ estão apresentados na **figura 28**. Estes valores são referentes à alíquota do medicamento (ponto correspondente a 0 μmol L^{-1} de NTZ) e às demais adições do padrão NTZ solução padrão (de 10 a 50 μmol L^{-1}). A figura representa a média de três determinações e a discrepância entre elas está representada pela barra de erro em cada um dos pontos. Estas determinações foram feitas em dias diferentes, com eletrodos CV-PBV recém preparados com o mesmo método de modificação.

O valor obtido experimentalmente para a concentração de NTZ presente no Sonebon® foi calculado através da regressão linear (**fig**. **28**), a qual descreve a equação I = 0,044 (μA μmol^{-1} L) [NTZ] + 0,32 (±0,20 x 10^{-2}) (μA) com R^2= 1. A concentração de NTZ encontrada foi de 7,1 μmol L^{-1} que corresponde a um fator de recuperação de 101%. Como já foi explicado, através da inclinação da curva é possível dimensionar a sensibilidade da análise. O valor encontrado para a sensibilidade este método de análise foi 44 nA μmol L^{-1}, o qual indica uma boa sensibilidade para o método proposto.

As inclinações da curva de adição de padrão e da curva analítica (**fig**. **27 A**) não apresentaram os mesmos valores de inclinação. Provavelmente, essa diferença foi ocasionada pelo método de preparo das amostras comerciais que, foram processadas antes de serem analisadas, ou contrário do fármaco. A matriz do medicamento pode ter interferido no volume total da alíquota que foi retira da solução estoque do medicamento, mesmo assim, a curva obtida pelo método de adição de padrão manteve a linearidade para o método de análise.

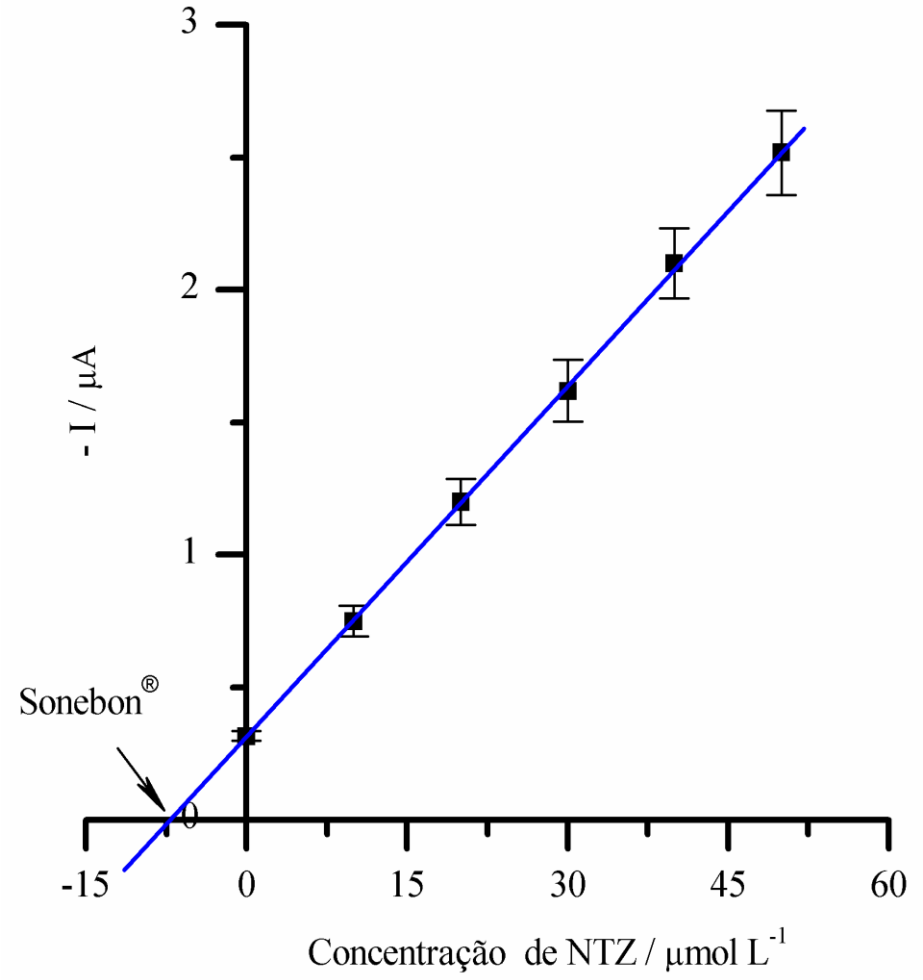


Figura 28. **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de NTZ adicionada, inclusive para o fármaco Sonebon®. Os pontos apresentados são as médias de três determinações feitas em dias diferentes com eletrodos CV-PBV diferentes. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

A **figura 29** apresenta o gráfico dos valores de corrente (apresentados na **figura 28**) normalizados pela cobertura de cada dos eletrodos CV-PBV utilizados nas análises. Nota-se que, a linearidade apresentada pelo método de análise manteve-se em relação às três análises

desenvolvidas. Na faixa dos valores de cobertura obtidos pelo método de modificação do eletrodo CV-PBV, o método de análise de NTZ demonstrou-se reprodutível. A curva analítica universal apresentou um coeficiente de correlação entre as três determinações de 0,946, o que significa que a mesma pode ser empregada na padronização de determinações analíticas. O valor do coeficiente de correlação não foi mais próximo do valor ideal (=1) porque, como já foi dito, a apresentação da solução estoque do medicamento propicia certo desvio na resposta de uma análise para outra. O eletrodo CV-PBV deixou de responder linearmente com a concentração do fármaco a partir do valor de cobertura de $3,2 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}.

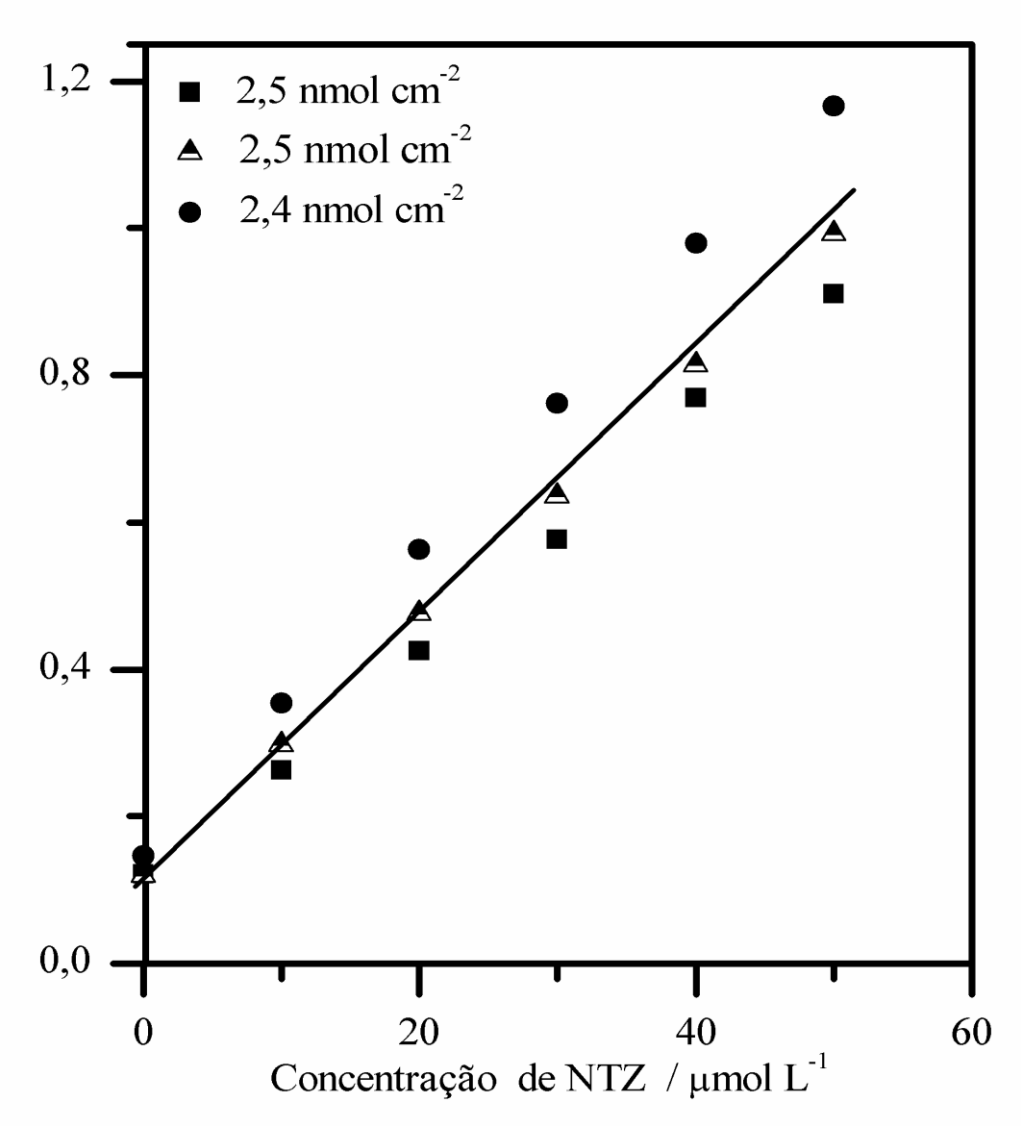


Figura 29. **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de NTZ adicionada, inclusive para o fármaco, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Três análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

4.6 Nimesulida

Uma vez que o padrão da Nimes tinha procedência Sigma-Aldrich e elevado grau de pureza, a determinação do teor por cromatografia líquida foi dispensada.

4.6.1 Espectros de absorção em diferentes pH_s

Os espectro de absorção da Nimes foram obtidos em pH 7,0; 9,0 e 12,0. Devido à baixa solubilidade da forma não iônica do fármaco, a obtenção dos espectros de absorção deste fármaco em meio ácido ficou prejudicada. Em pH_s menores que o valor do pK_a da Nimes, a molécula está em sua forma não dissociada, como representada na **figura 30**. Este caráter ácido fraco da Nimes é devido à presença do grupo metanossulfonamida que, ao contrário dos demais anti-inflamatórios da sua classe (não esteroidal), não possui o grupo ácido carboxílico [108].

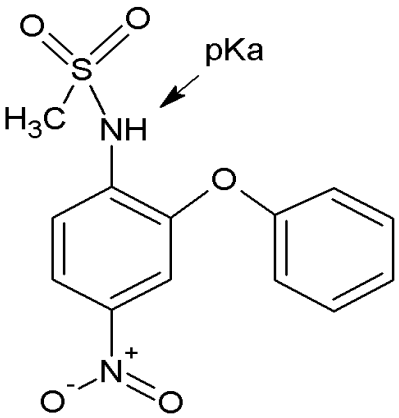


Figura 30. **Representação da estrutura química da Nimes e seu pK_a.** Estrutura química da Nimes. Valor de pK_a: 6,5. 308,311 g mol^{-1} [109].

A **figura 31** apresenta os espectros de absorção da Nimes 50 μmol L^{-1} nos pH_s 7,0; 9,0 e 12,0. Para tanto, foi utilizado o tampão fosfato para a manutenção dos pH_s 7,0 e 12,0 e tampão borato para o pH 9,0. A concentração de 50 μmol L^{-1} foi obtida a partir da solução estoque 50 mmol L^{-1} preparada em DMSO. Os espectros referentes ao comportamento da Nimes apresentaram o mesmo perfil de absorção, independente do valor de pH trabalhado (**fig**. **31**).

Na **figura 31** é possível observar que os três espectros apresentaram um único pico de absorção em aproximadamente 400 nm. Esta banda visualizada em meio neutro e básico pode ser atribuída à forma iônica da molécula (pH do meio maior que o pK_a do fármaco). A forma iônica da Nimes proporcionou a absorção de energia na região do visível, assim como a coloração amarela apresentada pela solução analisada. A forma iônica da Nimes é resultado de três estruturas ressonantes que estabilizam a carga negativa proveniente da desprotonação do único hidrogênio dissociável da molécula [108]. Estas estruturas estão apresentadas na **figura 32**.

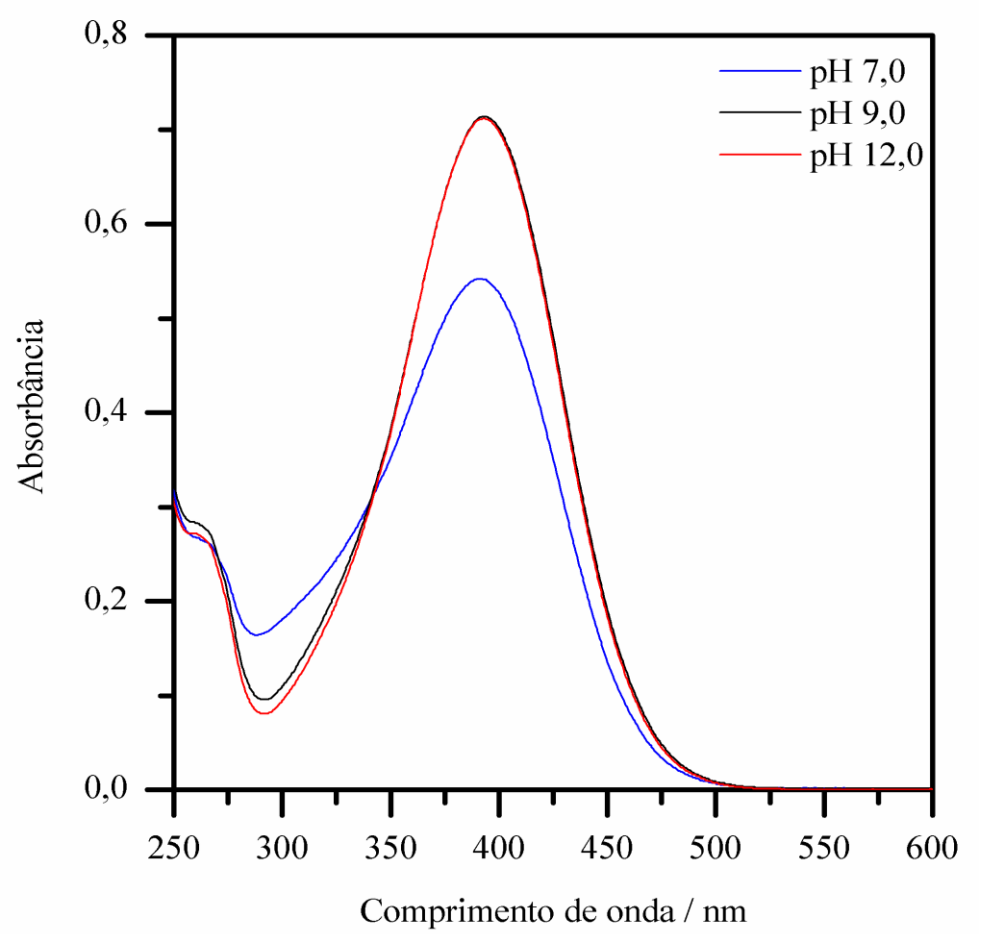


Figura 31. **Espectro de absorção da Nimes 50 μmol L^{-1} em diferentes pH_s**. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão borato 0,1 mol L^{-1} pH 9,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0.

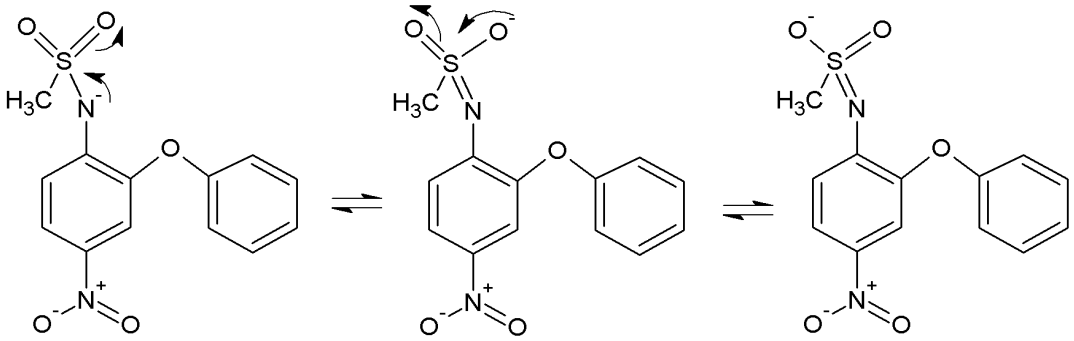
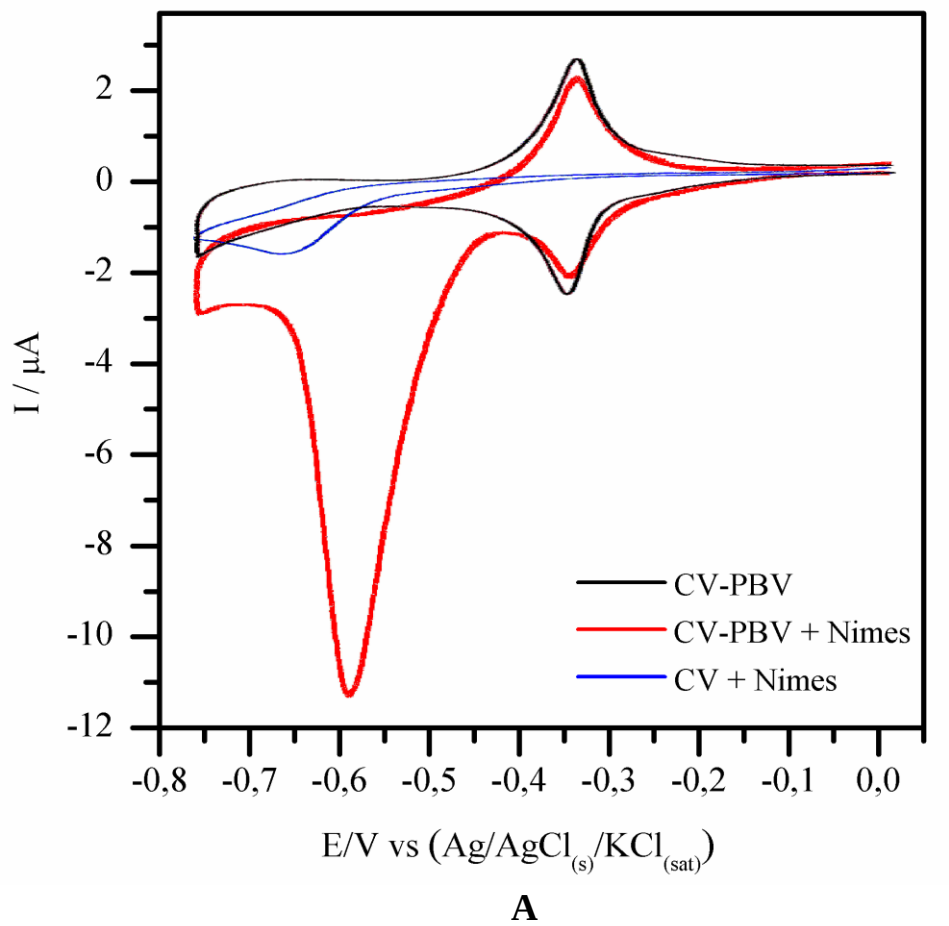


Figura 32. **Estabilização da carga negativa da Nimes após desprotonação**. Estruturas ressonantes referentes à estabilização da molécula após desprotonação em solução aquosa com valores de pH superiores ao pK_a [108].

4.6.2 Comportamento eletroquímico da Nimes em diferentes pH_s

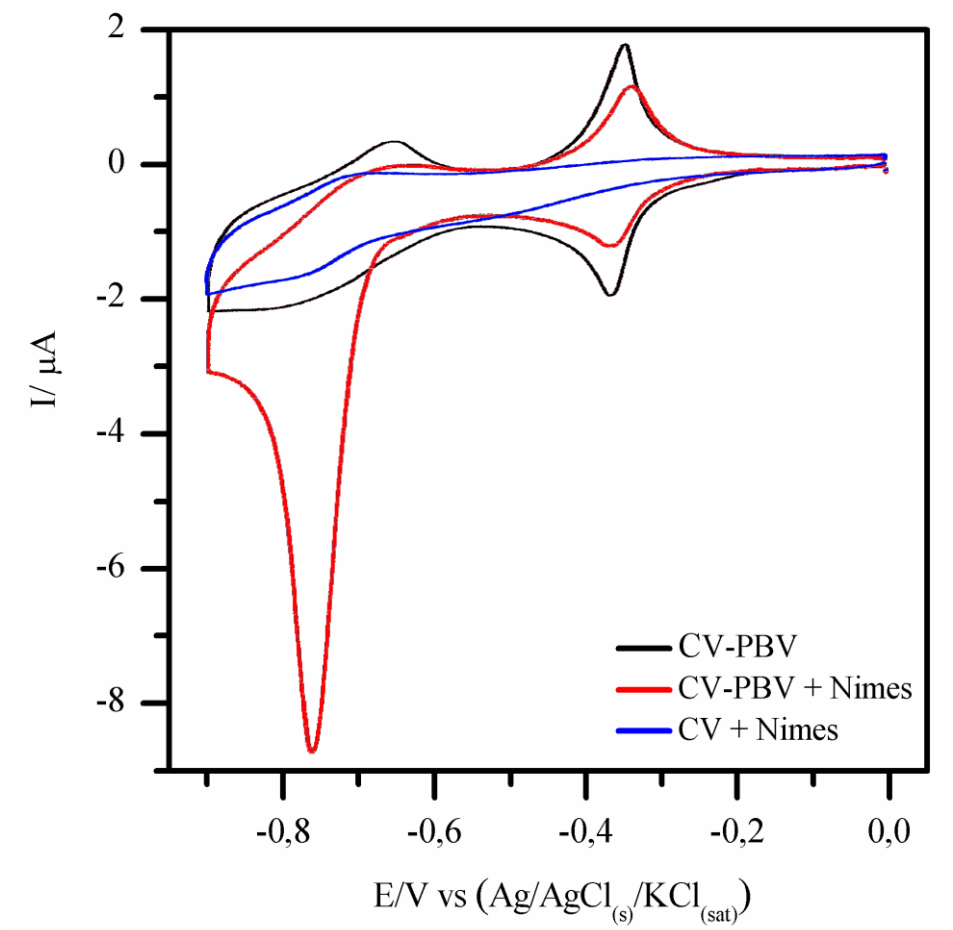
O comportamento eletroquímico da Nimes foi analisado nos pH_s 7,0 e 12,0 com os eletrodos CV e CV-PBV (**fig**. **33 A** e **33 B**). Foi utilizado tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, de acordo com a capacidade tamponante de cada par ácido/base conjugado para cada pH. O comportamento eletroquímico associado ao pH, obtido para a Nimes, também esteve de acordo com a reação geral dos compostos nitroaromáticos já apresentada. O valor do Ep_c da Nimes em pH 12,0 foi aproximadamente 170 mV maior que em pH 7,0. O eletrodo CV-PBV desempenhou a melhor resposta em relação ao valor do potencial de redução. Em pH 7,0 houve um adiantamento de aproximadamente 80 mV para o Ep_c em comparação com o eletrodo CV polido. Além do mais, o eletrodo CV-PBV foi capaz de responder de forma muito mais sensível para a análise em ambos os pH_s, visto que, a corrente dos voltamogramas em vermelho (**fig**. **33 A** e **33 B**) foi bem maior em comparação com os voltamogramas na cor azul (CV).

Uma vez que, este fármaco apresenta carga negativa desde o pH 7,0, era esperado que a corrente fosse alta para ambos os pH_s (7,0 e 12,0) na análise com CV-PBV. E, como pode ser observado nas **figuras 33 A** e **B**, a corrente apresentada como resposta da análise da Nimes com o eletrodo CV-PBV manteve-se alta para ambos os pH_s. Esta resposta é justificada novamente pela forte interação entre as cargas opostas presentes no filme e no fármaco, como já foi explicado anteriormente.



A

Figura 33. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico da Nimes 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s. A**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de Nimes. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de Nimes. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de Nimes.



B

Figura 33. **Voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico da Nimes 70 µmol L^{-1} em diferentes pH_s**. **B**-Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 12,0 a 10 mV s^{-1}. Voltamograma na cor **preta**: eletrodo CV-PBV na ausência de Nimes. Voltamograma na cor **azul**: eletrodo CV na presença de Nimes. Voltamograma na cor **vermelha**: eletrodo CV-PBV na presença de Nimes.

4.6.3 Voltametria linear com eletrodo de disco rotativo

O valor do coeficiente difusional das espécies redox (*D*) para a Nimes foi obtido a partir da **equação 4** (**seção 4.4.4**) e do gráfico de Levich. O valor de *D* foi calculado para o eletrodo disco rotativo de CV modificado com PBV. A concentração de fármaco utilizada foi 100 μmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}. A velocidade angular foi variada de 100 a 1000 rpm. Da mesma forma, em que a corrente variou linearmente com a velocidade de rotação, explicada nas **seções 4.4.4 e 4.5.3**, observou-se que a mesma correspondência linear foi obtida para a Nimes.

A **figura 34** apresenta o gráfico de Levich da corrente limite (μA) obtida em -0,590 mV (potencial de redução da Nimes para o eletrodo CV-PBV), em função da raiz da velocidade de rotação (rad s^{-1}). É notório que a corrente manteve a correspondência linear (R^2= 0,999) com a velocidade de rotação, mesmo quando altos valores de velocidade de rotação foram atingidos. Através desta linearidade, pode-se afirmar que não há controle cinético no processo de redução da Nimes com o eletrodo CV-PBV, da mesma forma para os demais fármacos analisados com o eletrodo CV-PBV e discutidos neste trabalho. O valor do *D* determinado a partir da inclinação da reta relacionada com a **equação 4** foi 4,14 x 10^{-5} (± 0,03) cm^2 s^{-1} para a Nimes, analisada com o eletrodo CV-PBV. Este valor é bem próximo ao determinado por cronoamperometria, 4,9 x 10^{-5} cm^2 s^{-1} em PBS pH 2,0, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbeto de Silício [17].

A **figura 35** apresenta o gráfico de Levich para a análise (a mesma que a anterior) desenvolvida com o eletrodo CV. Para este eletrodo, a corrente limite foi obtida em -0,670 mV (potencial de redução da Nimes para este eletrodo). Foi obtido o valor de 0,997 para o coeficiente de correlação dos pontos apresentados na reta. O valor para o *D* obtido com esta análise foi 3,86 x 10^{-5} (± 0,04) cm^2 s^{-1}. Como já foi discutido, o valor de *D* é característico de cada molécula, por isto, ambos os valores (obtidos com CV e CV-PBV) não se distanciaram quando comparados entre si.

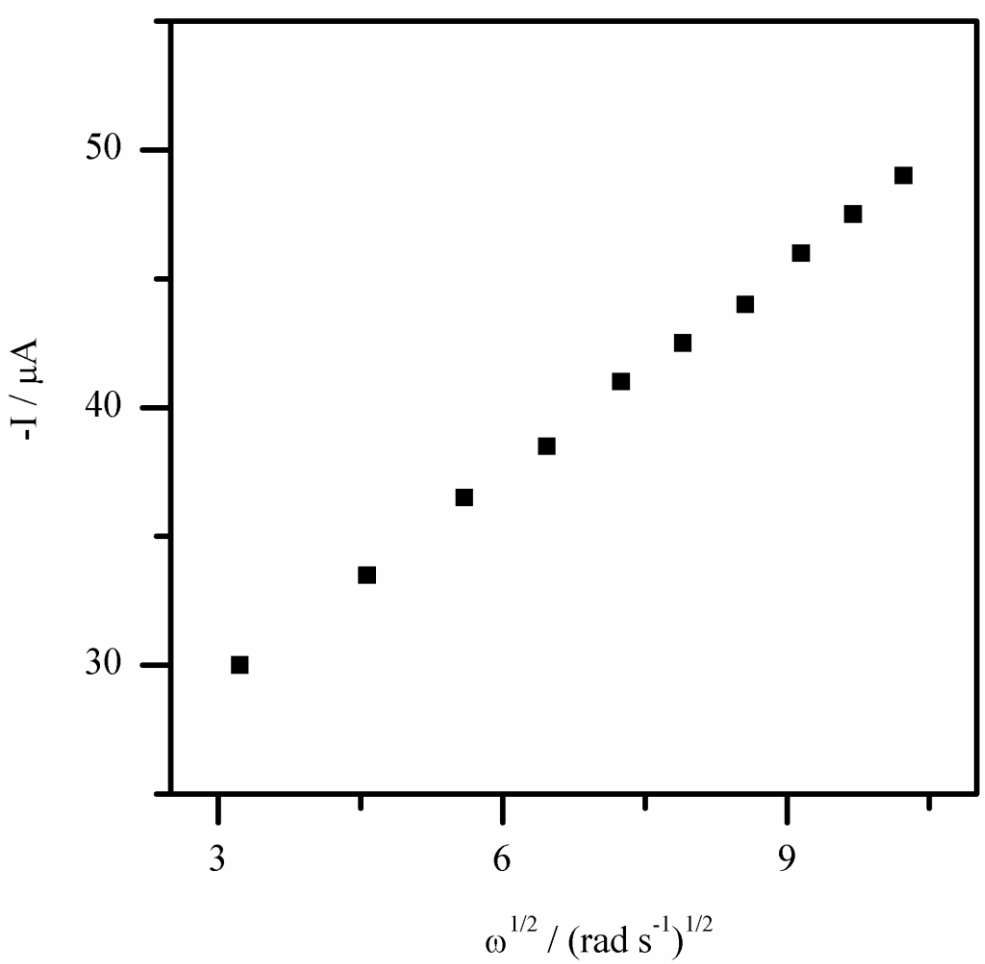


Figura 34. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de Nimes 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV-PBV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

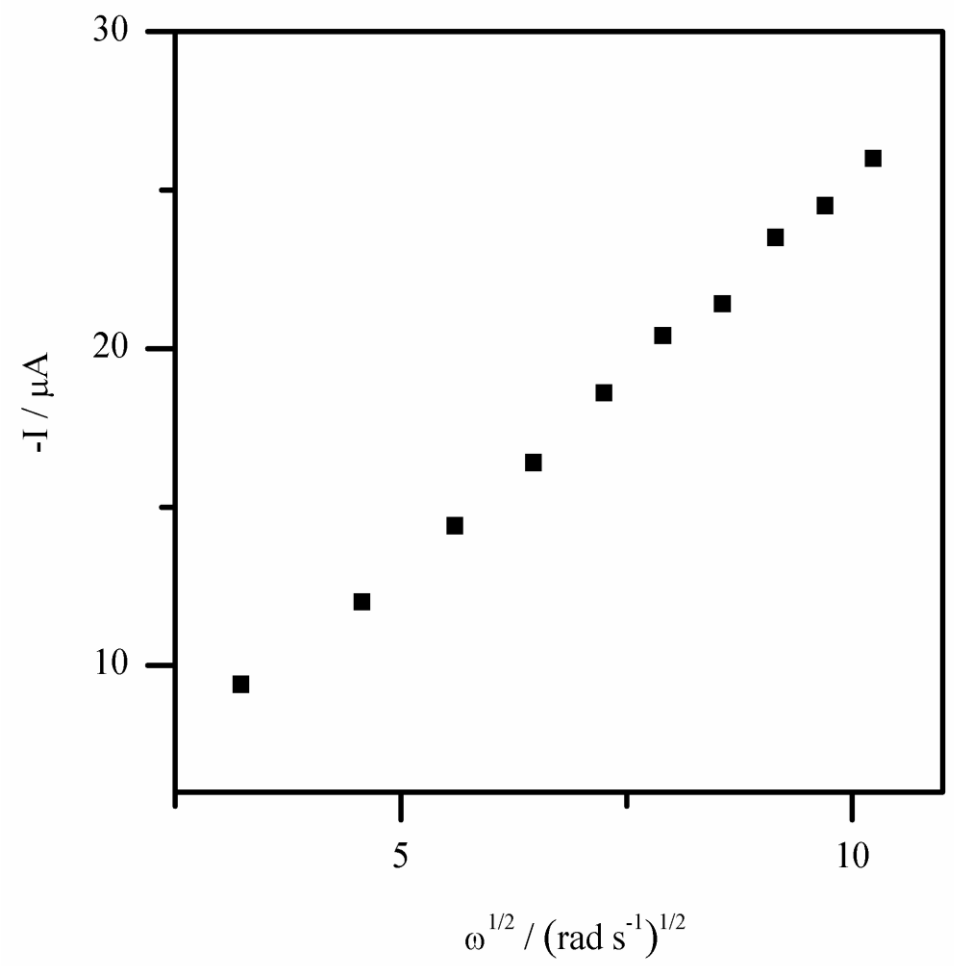


Figura 35. **Gráfico de Levich**. Gráfico dos valores de corrente (I) obtidos para diferentes velocidades de rotação do eletrodo de trabalho. Concentração de Nimes 100 μmol L^{-1}, eletrodo de trabalho CV, velocidade de varredura 10 mV s^{-1}, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0.

4.6.4 Detecção de Nimes

As **figuras 36 A**, **36 B** e **36 C** apresentam as curvas analíticas obtidas a partir dos valores de corrente em função da concentração de Nimes. As análises foram feitas por voltametria cíclica a 10 mV s^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, utilizando como eletrodo de trabalho CV e Au polidos e modificados com PBV.

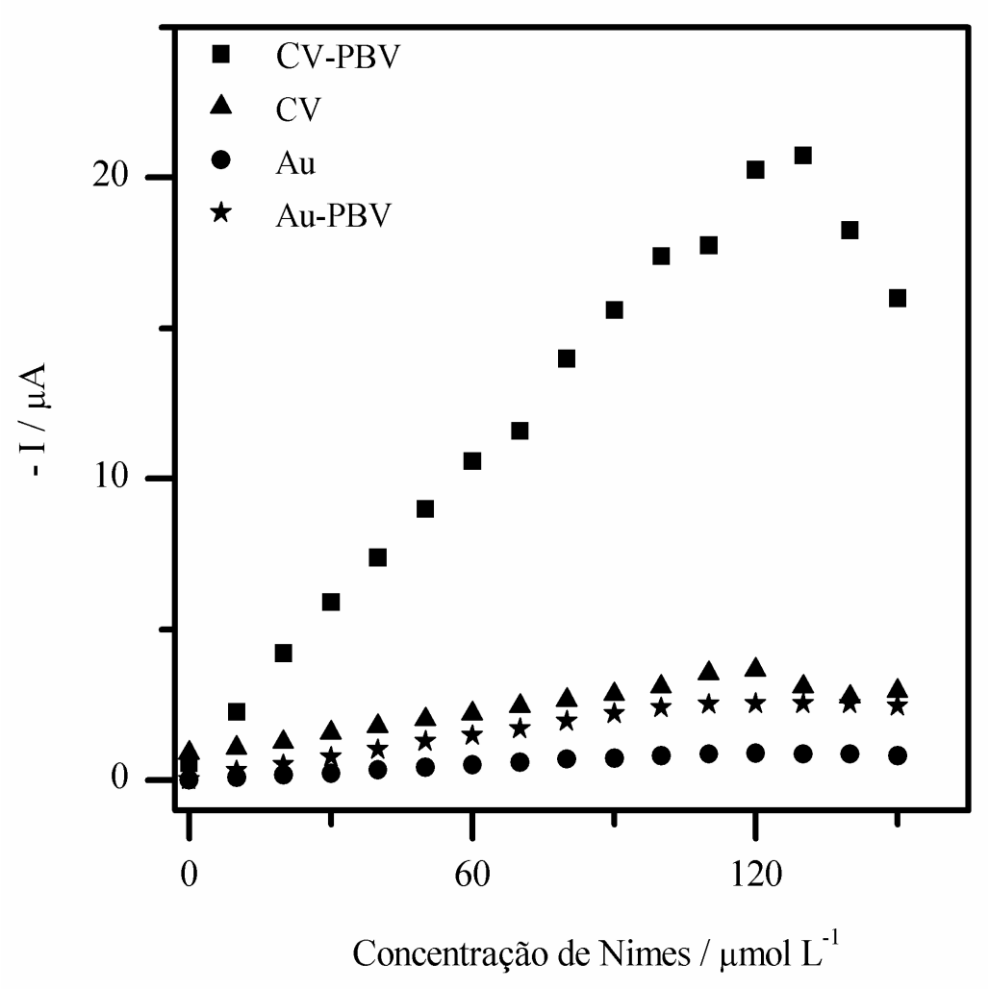
Na **figura 36 A**, os valores de corrente, correspondentes às concentrações de Nimes adicionadas, foram obtidos nos respectivos potenciais de redução para cada análise desenvolvida com cada eletrodo de trabalho (CV, CV-PBV, Au e Au-PBV). Os valores dos potenciais de redução da Nimes (Ep_c) em relação aos eletrodos de trabalho utilizados foram: CV = Ep_c ~ -0,670 V, CV-PBV = Ep_c -0,590 V, Au = Ep_c ~ -0,450 V e Au-PBV = Ep_c -0,610 V. Até a concentração de aproximadamente 120 μmol L^{-1}, todos os eletrodos empregados apresentaram linearidade na análise.

A modificação com o polímero PBV sobre a superfície de CV garantiu a diminuição do potencial de redução da Nimes em aproximadamente 80 mV, comparado com o eletrodo polido (CV). Esse efeito de diminuição no valor de potencial em relação às respostas dos eletrodos CV e CV-PBV pode ser visualizado na **figura 36 B**. Nesta figura, os valores de corrente para as análises da Nimes, tanto com o eletrodo de CV modificado quanto com o polido, foram obtidos no mesmo valor do Ep_c obtido para o eletrodo CV-PBV, ou seja, -0,590 V. Este valor foi o menor potencial de redução obtido para a análise da Nimes em relação aos eletrodos CV e CV-PBV. O mesmo efeito de diminuição do valor de potencial não foi obtido para a modificação no eletrodo de Au. A superfície deste eletrodo (Au) possibilitou a redução da Nimes em valores de potencial menos negativos que em relação à superfície modificada. A energia de superfície do ouro pode ser o fato que justifica esse melhor desempenho do eletrodo polido uma vez que, a modificação alterou a energia da superfície e pode ter provocado o aumento do valor potencial de redução da Nimes, atingindo valores mais negativos [44].

Porém, o PBV sobre as superfícies de todos os eletrodos garantiu a melhor resposta (sensibilidade) para a análise da Nimes visto que, os valores de corrente são bem mais significativos em comparação com as análises desenvolvidas com os eletrodos polidos. Essa melhora nas respostas pode ser constata através dos valores de sensibilidade obtidos pelos

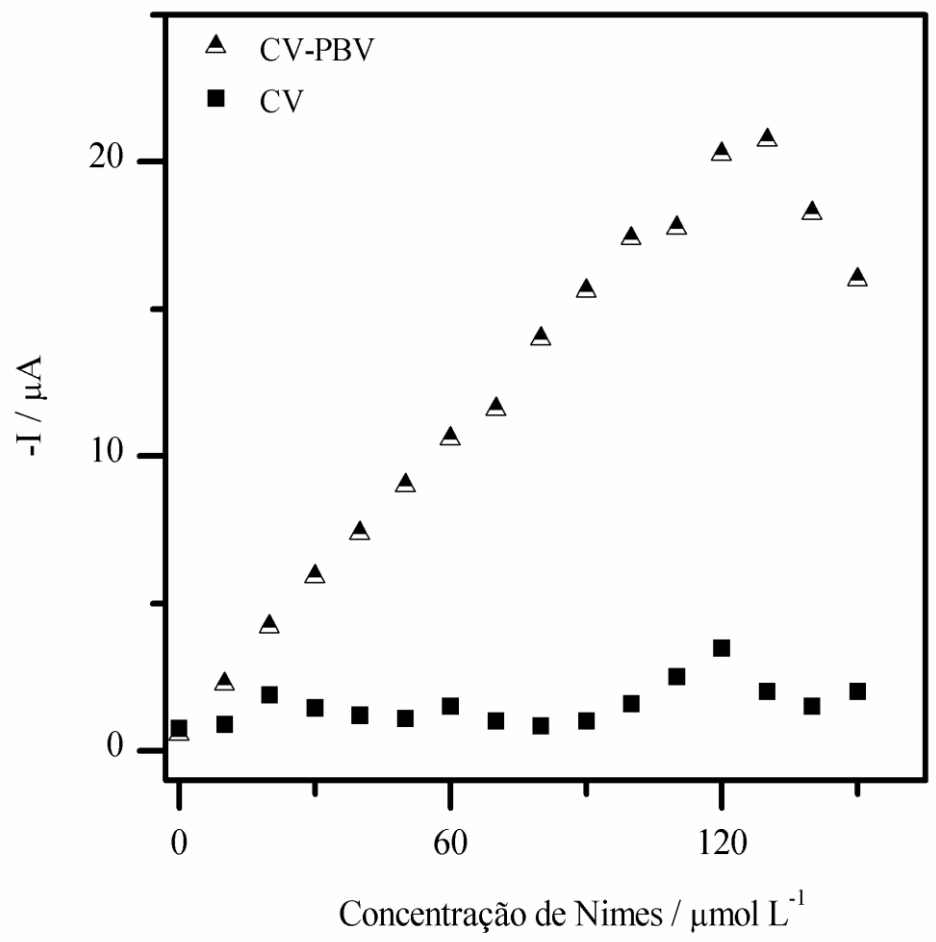
valores das inclinações das curvas apresentadas na **figura 36 A**. Para a análise com o eletrodo CV-PBV: 161 nA μmol L^{-1}, R^2 = 0,997; para o CV: 23 nA μmol L^{-1}, R^2 = 0,993; para eletrodo Au-PBV: 24 nA μmol L^{-1}, R^2 = 0,999 e o eletrodo Au apresentou 8,0 nA μmol L^{-1} para o valor de sensibilidade e R^2 =0,991.

A **figura 36 C** apresenta os valores de corrente normalizados para a cobertura (eletrodos modificados) e área (eletrodos polidos), em função dos valores das concentrações de Nimes adicionadas. Todos os eletrodos apresentaram resposta linear em relação à concentração de Nimes em até aproximadamente 120 μmol L^{-1}.



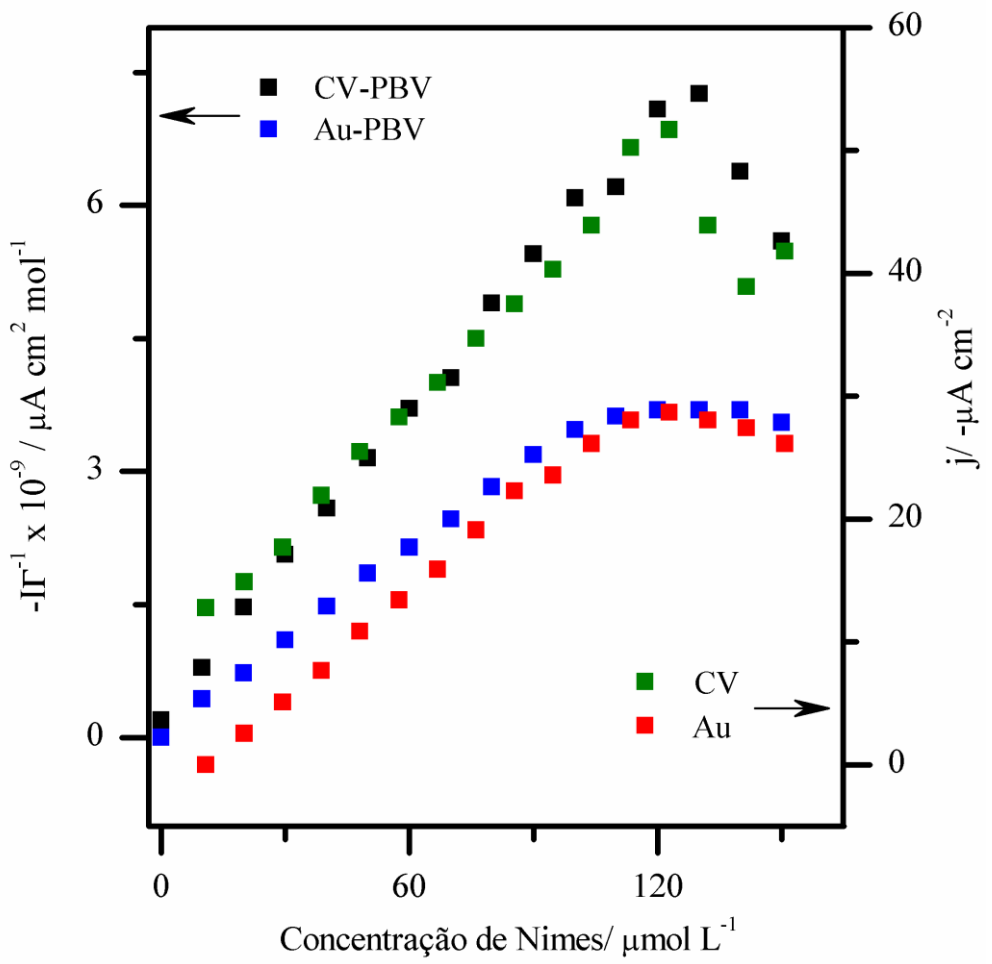
A

Figura 36. **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}**. **A-** Gráfico dos valores de corrente (Ip_c) nos respectivos potenciais de redução da Nimes obtidos para as análises utilizando cada um dos eletrodos de trabalho. Concentrações de Nimes totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}.



B

Figura 36. **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}. B-** Gráfico dos valores de corrente (Ip_c) obtidos em -0,590 V para os eletrodos CV e CV-PBV em função das mesmas concentrações de Nimes analisadas. Concentrações de Nimes totais adicionadas: 10 a 150 μmol L^{-1}.



C

Figura 36. **Determinação de Nimes em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a 10 mV s^{-1}**. **C-** Gráfico dos valores de corrente (I_{pc}) normalizados pela área (eixo da direita) e cobertura (eixo da esquerda) nos respectivos potenciais de redução da Nimes obtidos para cada eletrodo de trabalho. Concentrações de Nimes totais adicionadas: 10 a 150 µmol L^{-1}. Os valores de cobertura calculados foram: 2,9 x 10^{-9} mol cm^{-2} para CV-PBV e 6,9 x 10^{-10} mol cm^{-2} para Au-PBV e os valores das áreas geométricas para os eletrodos de CV e Au polidos foram: CV = 0,071 cm^2 e Au = 0,031 cm^2.

4.6.5 Análise de amostras comerciais

O eletrodo CV-PBV foi empregado na determinação de Nimes em amostras comerciais. Para tanto, uma análise com medicamento genérico Nimesulida suspensão oral - gotas 50 mg mL^{-1} foi desenvolvida. Foi utilizado o método de adição de padrão para a determinação da concentração do princípio ativo Nimes no medicamento. Uma alíquota do medicamento correspondente a 7,0 mmol L^{-1} de Nimes, mediante as informações do fabricante, foi utilizada no preparo da solução estoque do medicamento em DMSO. Da solução estoque foi retirado um volume correspondente a 7,0 μmol L^{-1} de Nimes. As alíquotas adicionadas da solução padrão de Nimes foram correspondentes a 10 μmol L^{-1}. A análise foi desenvolvida em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 com o eletrodo CV-PBV.

Os valores de corrente em função da concentração de Nimes estão apresentados na **figura 37**. Os valores de corrente são referentes à alíquota do medicamento (ponto correspondente a 0 μmol L^{-1} de Nimes) e às demais adições do padrão da Nimes (de 10 a 50 μmol L^{-1}). A figura representa a média de duas determinações, relacionadas através da barra de erro em cada um dos pontos da curva. Estas determinações foram feitas em dias diferentes, com eletrodos CV-PBV recém preparados com o mesmo método de modificação.

O valor obtido experimentalmente para a concentração de Nimes presente no medicamento foi calculado através da regressão linear (**fig**. **37**), a qual descreve a equação I = 0,104 (μA μmol^{-1} L) [Nimes] + 0,724 (±0,026) (μA) com R^2= 0,999. A concentração de Nimes encontrada foi de 6,9 μmol L^{-1}, que corresponde a um fator de recuperação de 99%. O valor determinado para sensibilidade da análise foi 104 nA μmol^{-1} L, ou seja, o método de análise possui boa sensibilidade.

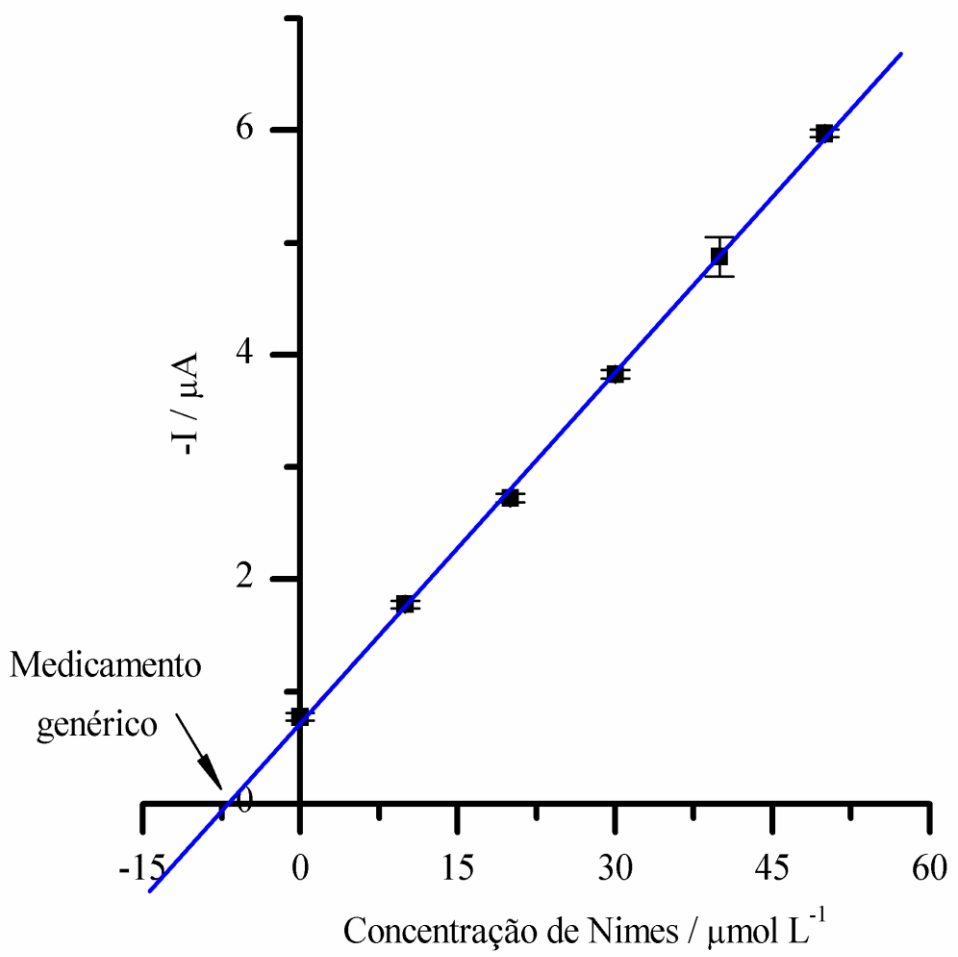


Figura 37. **Curva de adição de padrão**. Gráfico dos valores de corrente obtidos para cada concentração de Nimes adicionada, inclusive para o medicamento genérico. Os pontos apresentados são as médias de duas determinações feitas em dias diferentes com eletrodos CV-PBV diferentes. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

A **figura 38** apresenta o gráfico dos valores de corrente (apresentados na **figura 37**) normalizados pela cobertura de cada um dos eletrodos CV-PBV utilizados nas análises. Os valores obtidos para as coberturas dos eletrodos foram 2,3 nmol cm^{-2} e 2,7 nmol cm^{-2}. Na faixa dos valores de cobertura obtidos pelo método de modificação do eletrodo CV-PBV, o método de análise da Nimes demonstrou-se reprodutível visto que, a linearidade permaneceu nas duas curvas. A curva analítica universal apresentou um coeficiente de correlação entre as três determinações de 0,970, o que significa que a mesma pode ser empregada na padronização de determinações analíticas, devido à boa correlação mantida. Da mesma forma como foi obtido para as análises anteriores, eletrodo CV-PBV deixou de responder linearmente em relação à concentração da Nimes a partir do valor de cobertura de aproximadamente $3,2 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}.

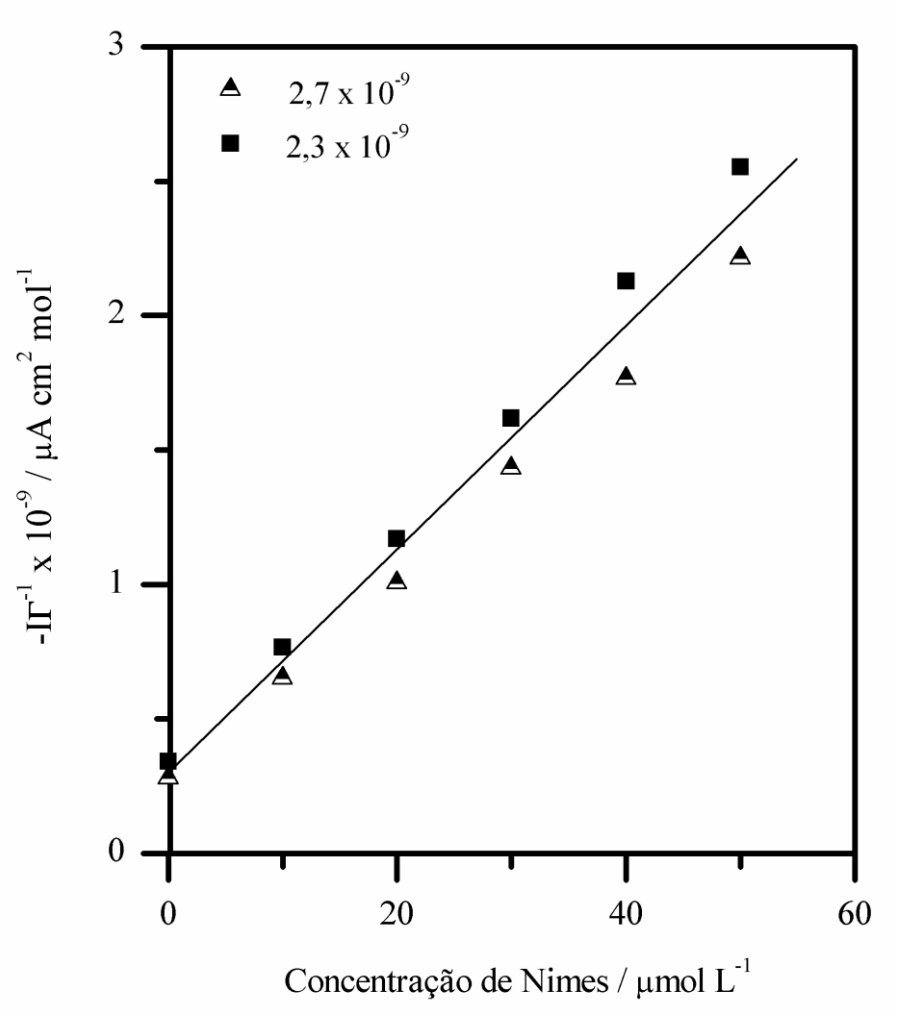


Figura 38. **Curva de adição de padrão normalizada**. Gráfico dos valores de corrente obtidos em relação a cada concentração de Nimes adicionada, inclusive para o medicamento genérico, normalizados pelos valores de cobertura de cada eletrodo de trabalho. Duas análises com diferentes eletrodos CV-PBV foram determinadas. As análises foram desenvolvidas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 10 mV s^{-1}.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

A caracterização por RMN ^1H e espectroeletroquímica do polímero PBV constatou que o mesmo foi sintetizado de maneira efetiva, além de ter apresentado um rendimento de aproximadamente 100%.

O melhor método para a modificação do eletrodo CV foi definido em relação à formação da cobertura, tanto na obtenção, quanto no controle do método. Este, estabeleceu-se com a aplicação de eletrólise por 30 s durante o terceiro ciclo de varredura de 0 a -0,8 V a 50 mV s^{-1}. Imediatamente após a eletrólise, o PBV foi precipitado na superfície do eletrodo com o contraíon PF_6^-. Este método foi capaz de modificar de forma efetiva a superfície do CV e forneceu coberturas de 2,0 a 3,0 nmol cm^{-2}. A solução do polímero a 1 mg mL^{-1} foi feita em KBr 0,1 mol L^{-1} e pode ser reutilizada sem perda significativa na formação da cobertura do eletrodo. Apesar da constante de transferência de carga ter apresentado um valor não elevado (5,2 s^{-1}), o comportamento do polímero na superfície do eletrodo CV sugere que a transferência de carga entre o polímero e a superfície do eletrodo não é fator limitante no processo interfacial.

Com as análises dos fármacos em diferentes pH_s, constatou-se que, os fármacos nitroderivados utilizados neste trabalho seguem a reação geral de redução dos nitroaromáticos. Porém, a interação do fármaco com eletrodo CV-PBV foi maior que a influencia de pH_s altos. Para valores maiores de pH_s, nos quais os fármacos nitroderivados reduziriam em potenciais mais negativos, com a utilização do eletrodo CV-PBV, os mesmos se reduziram em potenciais menos negativos. O polímero, devido à carga positiva, interage fortemente com os fármacos os quais, possuem carga negativa quando submetidos a pH maiores que os valores de seus pk_{as}, respondendo de forma bem sensível à análise.

Os eletrodos modificados, de forma geral, foram capazes de reduzir os fármacos em potenciais menos negativos, comparados com os eletrodos polidos. Essa diminuição no potencial de redução dos fármacos, quando analisados com o eletrodo modificado, variou de 80 a 170 mV, em relação à mesma análise com o eletrodo polido. A exceção foi o fármaco Nimes, quando analisado com o eletrodo de Au-PBV, devido à própria característica da superfície do eletrodo de Au, a redução aconteceu em potenciais menos negativos que para o

eletrodo Au-PBV. Todos os eletrodos modificados responderam de forma linear à concentração de cada fármaco, em até aproximadamente 120 μmol L^{-1}. Além do que, as análises desenvolvidas (em pH 7,0) com os eletrodos modificados apresentaram maior sensibilidade. A exceção foi a análise do NTZ, que apresentou praticamente a mesma sensibilidade com a utilização do eletrodo CV modificado ou polido.

O emprego do eletrodo modificado CV-PBV apresentou ótimos resultados nas análises de amostras comerciais. A recuperação do método foi, de modo geral, igual a 100%. A normalização (I/Γ) indicou a possibilidade de aplicar uma única curva analítica para a análise de cada fármaco. Isso foi possível pois, todas as retas traçadas (em relação às curvas de cada fármaco) determinaram uma equação de reta geral, padronizando assim o método de análise. Além disso, o trabalho contribuiu para o desenvolvimento de um eletrodo (CV-PBV) que pode ser aplicado em análises em meio aquoso de três fármacos utilizados pela população, sem que as amostras necessitem de purificação anterior às análises.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rabbany, S.Y.; Marganski, W.A.; Kusterbeck, A.W.; Ligler, F.S. A membrane-based displacement flow immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13 (9), 939-944.

2. Charles, P.T.; Gauger, P.; Patterson Jr., C.H.; Kusterbeck, A. On-Site Immunoanalysis of Nitrate and Nitroaromatic Compounds in Groundwater. *Environmental Science and Technology* **2000**, 34 (21), 4641-4650.

3. Bakaltcheva, I.B.; Ligler, F.S.; Patterson, C.H.; Shriver-Lake, L.C. Multi-analyte explosive detection using a fiber optic biosensor. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 399 (1-2), 13-20.

4. Proença, P.; Teixeira, H.; Pinheiro, J.; Marques, E.P.; Vieira, D.N. Forensic intoxication with Clobazam: HPLC/DAD/MSD analysis. *Forensic Science International* **2004**, 143 (2-3), 205-209.

5. Salomone, A.; Gerace, E.; Brizio, P.; Gennaro, C.; Vincenti, M. A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, 56 (3), 582-591.

6. Bishop, S. C.; Lerch, M.; McCord, B. R. Detection of nitrated benzodiazepines by indirect laser-induced fluorescence detection on a microfluidic device. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1154 (1-2), 481–484.

7. Ribeiro, D.S.M.; Prior, J.A.V.; Santos, J.L.M.; Lima, J.L.F.C. Automated determination of diazepam in spiked alcoholic beverages associated with drug-facilitated crimes. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 668 (1), 67–73.

8. Salem, A.A.; Barsoum, B.N.; Izake, E.L. Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 498, 79-91.

9. Glover, S.J.; Allen; K.R. Measurement of benzodiazepines in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: confirmation of samples screened by immunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry* **2010**, 47 (2) 111-117.

10. Skurtveita, S.; Abotnesa, B.; Christophersena, A.S. Drugged drivers in Norway with benzodiazepine detections. *Forensic Science International* **2002**, 125 (1), 75-82.

11. Ming, D.S.; Heathcote, J. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine. *Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2011**, 879 (5-6), 421-428.

12. Bassan, D.M.; Erdmann, F.; Krüll, R. Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical* Chemistry **2011**, 400 (1), 43-50.

13. Gunn, J.; Kriger, S.; Terrell, A.R. Simultaneous determination and quantification of 12 benzodiazepines in serum or whole blood using UPLC/MS/MS. *Methods in Molecular Biology* **2010**, 603 (Clinical Applications of Mass Spectrometry), 107-119.

14. West, A.; Köhler-Schmidt, H.; Baudner, S.; Blaschke, G. A specific immunoassay for the detection of flunitrazepam. *International Journal* of *Legal Medicine* **1995**, 108 (2), 105-109.

15. Upadhyay, K.; Asthana, A.; Tiwari, N.; Mathew, S.B. Determination of Nimesulide in pharmaceutical and biological samples by a spectrophotometric method assisted with the partial least square method. *Research on Chemical Intermediates, Ahead of Print* **2012**.

16. Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, **1996**, 9ª ed., Goodman and Gilman's, McGraw-Hill.

17. Ghavami, R.; Navaee, A. Determination of nimesulide in human serum using a glassy carbon electrode modified with SiC nanoparticles. *Microchimica Acta* **2012**, 176 (3-4), 493–499.

18. Núñez-Vergara, L.J.; Farias, D.; Bollo, S.; Squella, J.A. An electrochemical evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endo/xenobiotics of pharmacological relevance. *Bioelectrochemistry* **2000**, 53 (1), 103-110.

19. Laviron, E.; Roullier, L. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part I. Reduction to dihydroxylamines between pH 0 and 5. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1990**, 288 (1-2), 165-175.

20. Laviron, E.; Meunier-Prest, R.; Vallat, A.; Roullier, L.; Lacasse, R. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part II. The reduction of 4-nitropyridine between H0 = -6 and pH 9.6. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1992**, 341 (1-2), 227-255.

21. Lacasse, R.; Meunier-Prest, R.; Laviron, E.; Vallat, A. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part 3. The reduction of 4-nitropyridine N-oxide between H0 = -6 and pH 9. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 359 (1-2), 223-239.

22. Laviron, E.; Vallat, A.; Meunier-Prest, R. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0.4 and 13. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 379 (1-2), 427-435.

23. Laviron, E.; Meunier-Prest, R.; Lacasse, R. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part IV. The reduction of p-nitrobenzophenone between H0 = -5 and pH 14. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 375 (1-2), 263-274.

24. Yañez, C.; Pezoa, J.; Rodríguez, M.; Núñez-Vergara, L.J.; Squellaz, J.A. Voltammetric behavior of a 4-nitroimidazole derivative. Nitro radical anion formation and stability. *Journal of the Electrochemical Society* **2005**, 152 (5), J46-J51.

25. Núñez-Vergara, L.J.; Santander, P.; Navarrete-Encina, P.A.; Squella, J.A. Electrochemical reduction of C-4 nitrosophenyl 1,4-dihydropyridines and their parent C-4-nitrophenyl derivatives in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 580 (1), 135-144.

26. Bollo, S.; Gunckel, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Chauviere, G.; Squella, J.A. Electrochemical study of 4-substituted analogues of megazol. *Electroanalysis* **2005**, 17 (2), 134-139.

27. Núñez-Vergara, L.J.; Bollo, S.; Atria, A.M.; Carbajo, J.; Gunckel, S.; Squella, J.A. Free Radical Formation and Characterization of Nitroanisole Isomer Reduction in Different Media. *Journal of the Electrochemical Society* **2002**, 149 (10), E374-E382.

28. Carbajo, J.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Campero, A.; Squella, J.A. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, 531 (2), 187-194.

29. Núñez-Vergara, L.J.; Bontá, M.; Sturm, J.C.; Navarrete, P.A.; Bollo, S.; Squella, J.A. 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.

30. Liu, H.; Liu, Y.; Zhang, C.; Shen, R. Electrocatalytic oxidation of nitrophenols in aqueous solution using modified PbO2 electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry* **2008**, 38 (1), 101-108.

31. Hrapovic, S.; Majid, E.; Liu, Y.; Male, K.; Luong, J.H.T. Metallic Nanoparticle-Carbon Nanotube Composites for Electrochemical Determination of Explosive Nitroaromatic Compounds. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (15), 5504-5512.

32. Peckov, K.; Barek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.; Zima, J. Voltammetric Determination of Nitronaphthalenes at a Silver Solid Amalgam. *Electrode.Analytical Letters* **2009**, 42 (15), 2339-2363.

33. Jiranek, I.; Peckova, K.; Kralova, Z.; Moreira, J.C.; Barek, J. The use of silver solid amalgam electrode for voltammetric and amperometric determination of nitroquinolines. *Electrochimica Acta* **2009**, 54 (7), 1939-1947.

34. Hasiotis, C.; Kokkindis, G. Use of platinum/metal(underpotential deposited) (metal = lead, thallium, bismuth) modified electrodes to the catalytic electroreduction of heterocyclic nitro compounds. II. 2-Nitro and 4-nitroimidazole. *Electrochimica Acta* **1992**, 37 (7), 123-127.

35. Kokkindis. G.; Hasiotis, C.; Sazou, D. Use of platinum/metal(underpotential deposited) (metal=lead, thallium, bismuth) modified electrodes to the catalytic electroreduction of heterocyclic nitro compounds. I. 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole. *Electrochimica Acta* **1990**, 35 (11-12), 1957-1964.

36. Deylov, D.; Yosypchuk, B.; Vyskocil, V.; Barek, J. Voltammetric Determination of 4-Nitrophenol and 5-Nitrobenzimidazole Using Different Types of Silver Solid Amalgam Electrodes - A Comparative Study. *Electroanalysis* **2011**, 23 (7), 1548-1557.

37. Vyskocil, V.; Navratil, T.; Polaskova, P.; Barek, J. Voltammetric Determination of Genotoxic Nitro Derivatives of Fluorene and 9-Fluorenone Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *Electroanalysis* **2010**, 22 (17-18), 2034-2242.

38. Jara-Ulloa, P.; Cañete-Rosales, P.; Núñez-Vergara, L.J.; Squell, J.A. Adsorptive stripping voltammetric determination of nitroimidazole derivative on multiwalled carbon nanotube modified electrodes: influence of size and functionalization of nanotubes. *Journal of the Brazilian* Chemical Society **2011**, 22 (7), 1271-1278.

39. Ghalkhani, M.; Shahrokhian, S. Application of carbon nanoparticle/chitosan modified electrode for the square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of Niclosamide. *Electrochemistry Communications* **2010**, 12 (1), 66-69.

40. Song, F-Y.; Lee, F.S.C.; Shiu, K.-K. Preconcentration and electrochemical determination of nitropyrene at electrochemically activated glassy carbon electrodes. *Electroanalysis* **2000**, 12 (2), 128-133.

41. Sapel'nikova, S.V.; Kuz'mina, N.V.; Maistrenko, V.N.; Kudasheva, F.K. Preconcentration and voltammetric determination of nitro compounds on carbon-paste electrodes. *Journal of Analytical Chemistry* **2002**, 57 (5), 443-447.

42. Cordero-Rando, d-M.M.; Naranjo-Rodroguez, I.; Hidalgo Hidalgo, J.L.C. Voltammetric study of 2-methyl-4,6-dinitrophenol at a modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta* **1998**, 370 (2-3), 231-238.

43. Pereira, A.C.; Santos, A.S.; Kubota, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova* **2002**, 25, 1012-1021.

44. Bockris, J.O'M.; Khan, S.U.M. *Surface Electrochemistry: A molecular level Approach*, **1923**, Plenium Press, NY.

45. Naal, Z.; Park, J.-H.; Bemhard, S.; Shapleigh, J.P.; Batt, C.A.; Abruña, H.D. Amperometric TNT Biosensor Based on the Oriented Immobilization of Nitroreductase Maltose Binding Protein Fusion. *Analytical Chemistry* **2002**, 74 (1), 140-148.

46. Deronzier, A.; Moutet, J.C. Functionalized polypyrroles. New molecular materials for electrocatalysis and related applications. *Accounts of Chemical Research* **1989**, 22 (7), 249-255.

47. Kondratiev, V.V.; Pogulaichenko, N.A.; Tolstopjatova, E.G.; Malev, V.V. Hydrogen peroxide electroreduction on composite PEDOT films with included gold nanoparticles. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2011**, 15 (11-12), 2383-2393.

48. Quan, D.; Shim, J.H.; Kim, J.D.; Park, H.S.; Cha, G.S.; Nam, H. Electrochemical determination of nitrate with nitrate reductase-immobilized electrodes under ambient air. *Analytical* Chemistry **2005**, 77 (14), 4467-4473.

49. Takada, K.; Naal, Z.; Park, J.; Shapleigh, J.P.; Bernhard, S.; Batt, C.A.; Abruña, H.D. Study of specific binding of maltose binding protein to pyrrole-derived bipyridinium film by quartz crystal microbalance. *Langmuir* **2002**, 18 (12), 4892-4897.

50. Komura, T.; Kijima, K.; Yamaguchi, T.; Takahashi, K. Electrostatic binding and release: incorporation of IrCl63- into polypyrrole containing viologen groups. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2000**, 486 (2), 166-174.

51. Wang, X.; Naka, K.; Wang, C.; Itoh, H.; Uemura, T.; Chujo, Y. Layer-by-layer films based on charge transfer interaction of π-conjugated poly(dithiafulvene) and incorporation of gold nanoparticles into the films. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 103 (3), 1608-1615.

52. Lee, D.-Y.; Kang, H.-W.; Park, S.-H.; Kwon, Y.-S. Edited by Iwamoto, M.; Kwon, Y.-S.; Lee, T. Electrochemical properties of self-assembled viologen derivatives and its application to hydrogen peroxide detecting sensor. *Nanoscale Interface for Organic Electronics* **2001**, 79, 49-68.

53. Monk, P.M.S.; Mortimer, R.J.; Rosseinsky, D.R. *Electrochromism: Fundamentals and Applications*, **1995**, VCH, Weinheim.

54. Monk P.M.S. *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine*, **1998**, Wiley, NY.

55. Gutov, A.V.; Rusanov, E.B.; Chepeleva, L.V.; Garasevich, S.G.; Ryabitskii, A.B.; Chernega, A.N. New viologen analogs: 1,4-bis[2-(pyridin-4-yl)ethenyl]benzene quaternary salts. *Russian Journal of General Chemistry* **2009**, 79 (7), 1513-1518.

56. Malmqvist, M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* **1993**, 361 (6408), 186-187.

57. Cosnier, S.; Innocent, C.; Moutet, J.C.; Tennah, F. Electrochemically controlled release of chemicals from redox-active polymer films. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 375 (1-2), 233-241.

58. Karan, H.I.; Lan, H.L.; Okamoto, Y. Viologen derivative containing polysiloxane as an electron-transfer mediator in amperometric glucose sensors. *ACS Symposium Series* **1994**, 556 (Diagnostic Biosensor Polymers), 169-179.

59. Cosnier, S.; Galland, B.; Innocent, C. New electropolymerizable amphiphilic viologens for the immobilization and electrical wiring of a nitrate reductase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, 433 (1-2), 113-119.

60. Qian, D.-J.; Nakamura, C.; Wenk, S.-O.; Ishikawa, H.; Zorin, N.; Miyake, J. A hydrogen biosensor made of clay, poly(butylviologen), and hydrogenase sandwiched on a glass carbon electrode. *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, 17 (9), 789-796.

61. Wu, Q.; Storrier, G.D.; Pariente, F.; Wang, Y.; Shapleigh, J.P.; Abrunã, H.D. A Nitrite Biosensor Based on a Maltose Binding Protein Nitrite Reductase Fusion Immobilized on an Electropolymerized Film of a Pyrrole-Derived Bipyridinium. *Analytical Chemistry* **1997**, 69 (23), 4856-4863.

62. Yamaguchi, T.; Yokono, Y.; Takahashi, K.; Komura, T. Electrostatic incorporation of alizarin red S into poly[1-methyl-3-(pyrrol-1-ylmethyl)pyridinium] films. *Electrochimica Acta* **2002**, 47 (11), 1713-1719.

63. Abruña, H.D.; Bard, A.J. Semiconductor Electrodes. 40. Photoassisted hydrogen evolution at Poly (benzyl viologen) – Coated p-Type Silicon electrodes. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103 (23), 6898-6901.

64. Masunaga, K.; Hayama, K.; Onodera, T.; Hayashi, K.; Miura, N.; Matsumoto, K.; Toko, K. Detection of aromatic nitro compounds with electrode polarization controlling sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 108 (1-2), 427-434.

65. Grigoriants, I.; Markovsky, B.; Persky, R.; Perelshtein, I.; Gedanken, A.; Aurbach, D.; Filanovsky, B.; Bourenko, T.; Felner, I. Electrochemical reduction of trinitrotoluene on core-shell tin-carbon electrodes. *Electrochimica Acta* **2008**, 54 (2), 690-697.

66. Almirall, E.; Fragoso, A.; Cao, R.; Gonzalez-Jonte, R. Molecular Recognition of Aromatic Nitro Compounds at Cyclodextrin Dithiocarbamate-modified Electrodes. *Supramolecular Chemistry* **2003**, 15 (6), 417-423.

67. Reddy, T.M.; Reddy, S.J. Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Nifedipine and Nimodipine in Pharmaceutical Formulations, Urine, and Serum Samples by Using a Clay-Modified Carbon-Paste Electrode. *Analytical Letters* **2004**, 37 (10), 2079-2098.

68. Dibyendu, D.; Englehardt, J.D.; Kalu, E.E. Electroreduction of nitrate and nitrite ion on a platinum-group-metal catalyst-modified carbon fiber electrode. Chronoamperometry and mechanism studies. *Journal of the Electrochemical Society* **2000**, 147 (12), 4573-4579.

69. Lozano-Chaves, M.E.; Palacios-Santander, J.M.; Cubillana-Aguilera, L.M.; Naranjo-Rodriguez, I.; Hidalgo-Hidalgo, J.L C. Modified carbon-paste electrodes as sensors for the determination of 1,4-benzodiazepines: Application to the determination of diazepam

and oxazepam in biological fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 115 (2), 575-583.

70. Brett, O.A.M.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R.; La-Scalea, M.A. Comparison of the voltammetric behavior of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film electrode, and a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **1997**, 9 (2), 110-114.

71. Merino, M.; Núñez-Vergara, L.J.; Squella, J.A. Reduction of different nitro-compounds on electroenzymatic system. Cytochrome c reductase-NAD(P)H modified carbon paste electrode. *Electroanalysis* **1999**, 11 (17), 1285-1292.

72. Diab N.; AbuZuhri, A.; Schuhmann, W. Sequential-injection stripping analysis of nifuroxime using DNA-modified glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* **2003**, 61 (1-2), 57-63.

73. Chen, S.-M.; Chen, Sz-V. The interaction of water-soluble iron porphyrins with DNA films and the electrocatalytic properties for inorganic and organic nitro compounds. *Electrochimica Acta* **2003**, 48 (27), 4049-4060.

74. Zhang, D.; Wu, W.; Long, H.; Liu, Y.; Yang, Z. Voltammetric Behavior of o-Nitrophenol and Damage to DNA. *International Journal of* Molecular Sciences **2008**, 9 (3), 316-326.

75. Chen, X.; Cheng, X.; Gooding, J. J. Detection of Trace Nitroaromatic Isomers Using Indium Tin Oxide Electrodes Modified Using β-Cyclodextrin and Silver Nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (20), 8557-8563.

76. Veerakumara, P.; Velayudhamb, M.; Lub, K.-L.; Rajagopala, S. Polyelectrolyte encapsulated gold nanoparticles as efficient active catalyst for reduction of nitro compounds by kinetic method. *Applied Catalysis A: General* **2012**, 439– 440, 197– 205.

77. Wang, H.; Xu, X.; Lee, C.; Johnson, C.; Sohlberg, K.; Ji, H.-F. Highly Selective Sensing of Nitroaromatics Using Nanomaterials of Ellagic Acid. *Journal Physical Chemistry C* **2012**, 116 (7), 4442–4448.

78. Dai, H.; Lin, Y.; Wu, X.; Chen, G. A new electrochemiluminescent sensing interface for clonazepam based on titanate nanotubes self-assembled film. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, 145 (1), 320–326.

79. Ruiz, E.; Blanco, M.H.; Abad, E.L.; Hernandez, L. Determination of Nitrazepam and Flunitrazepam by Flow Injection Analysis Using a Voltammetric Detector. *Analyst* **1987**, 112 (5), 197-199.

80. Bishop, E.; Hussein, W. Electroanalytical Studies of Certain Nitro and Benzodiazepine Drugs at Rotating Disc Electrodes. *Analyst* **1984**, 109 (6), 759-764.

81. Jain, R.; Mishra, R.; Dwivedi, A. Voltammetric behavior of nitrazepam in solubilized system, *Journal of Scientific & Industrial Research* **2009**, 68 (6), 540-547.

82. Smyth, W.F.; lvaska, A. A Study of the Electrochemical Oxidation of Some 1,4-Benzodiazepines. *Analyst* **1985**, 110 (11), 1377-1379.

83. Ellaithy, M.M.; Volke, J.; Manousek, O. Differential pulse polarography of some benzodiazepines and their determination in urine. *Talanta* **1977**, 24 (2), 137-140.

84. Kalvoda, R. Adsorptive stripping voltammetry of electroactive organic compounds. *Analytica Chimica Acta* **1984**, 162, 197-205.

85. Zhang, J.; Tan, X.; Zhao, D.; Tan, S.; Huang, Z.; Mi, Y.; Huang, Z. Study of Nimesulide and its determination using multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. *Electrochimica Acta* **2010**, 55 (7), 2522–2526.

86. 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) 237–244.

87. Zhang, Jin-lei; Tan, Xue-cai; Zhao, Dan-dan; Tan, Sheng-wei; Liu, L.; Wang, L.; Huang, Zeng-wei. Fe3O4 magnetic nanoparticles modified electrode as a sensor for determination of Nimesulide. *Chemical Research in Chinese Universities* **2011**, 27 (4), 566-569.

88. Factor, A.; Heinsohn, G.E. Polyviologens - a novel class of cationic polyelectrolyte redox polymers. *Journal of Polymer Science* **1971**, 9 (4), 289-295.

89. Harris, D.C. *Quantitative Chemical Analysis*, **2003**, 6ª ed., W.H. Freeman and Company, NY.

90. Eng, L.H.; Elmmen, M.; Komlos, P.; Nordling, M.; Lindquist, S.; Neujahrt, H.Y. Viologen-Based Redox Polymer for Contacting the Low-Potential Redox Enzyme

Hydrogenase at an Electrode Surface. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98 (28), 7068-7072.

91. Van Dam, H.T.; Ponje, J.J. Electrochemically generated colored films of insoluble viologen radical compounds. *Journal of the Electrochemical Society* **1974**, 121 (12), 1555-1558.

92. Lin, F.; Cheng, S.Z.D.; Harris, F.W. Aromatic poly (pyridinium salt)s. Part 3. Photoreduction in amide solvents. Polymer **2002**, 43 (12), 3421-3430.

93. Akahoshi, H.; Toshima, S.; Itaya, K. Electrochimical and Spectroelectrochemical Properties of Polyviologen Complex Modified Electrodes. *Journal of Physical Chemistry* **1981**, 85, 818-822.

94. Greager, S.E.; Fox, M.A. Electrode modification by irreversible polyelectrolyte adsorption – Static and dynamic coating of poly-(p-xylyl viologen) on solid electrodes. *Journal Electroanalytical Chemistry* **1989**, 358, 431-450.

95. Park, S.; Ko, H.C.; Paik, W.; Lee, H. Assignments of cyclic voltammetric peaks during electrochemical polymerization of pyrrole with viologen pendant. *Synthetic Metals* **2003**, 139 (2), 439-443.

96. Wu, Q.; Storrier, G.D.; Wu, K. R.; Shapleigh, J.P.; Abruna, H.D. Electrocatalytic reduction of S-nitrosoglutathione at electrodes modified with an electropolymerized film of a pyrrole-derived viologen system and their application to cellular S-nitrosoglutathione determinations. *Analytical Biochemistry* **1998**, 263 (1), 102-112.

97. Santhiago, M.; Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Oliveira, B.A.; Kubota, L.T. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. *Electrochimica Acta* **2009**, 54 (26), 6609-6616.

98. Laviron, E.; Roullier, L. General expression of the linear potential sweep voltammogram for a surface redox reaction with interactions between the adsorbed molecules. Applications to modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1980**, 115 (1), 65-74.

99. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, **2001**, 2ª ed., John Wiley & Sons, INC., NY.

100. Laviron, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1979**, 101 (1), 19-28.

101. Unguresan, M.L.; Gligor, D.; Dulf, F. Numerical modelling and simulation of Laviron treatment for poly-phenothiazine derivative-modified glassy carbon electrodes. *Journal of Mathematical Chemistry* **2010**, 47 (4), 1476-1482.

102. Santhiago, M.; Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Kubota, L.T. An amperometric sensor for L-cysteine based on nanostructured platform modified with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2010**, 146 (1), 213-220.

103. Sharma, S.; Rajpurohit, H.; Sonwal, C.; Sharma, P.; Bhandari, A. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Escitolopram Oxalate and Clonazepam Using Multi-Component Mode of Analysis. *Journal of Pharmacy Research* **2010**, 3 (9), 2303-2305.

104. *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Bilogicals* **1996**, 12ª ed., Merck & Co., Inc. NJ.

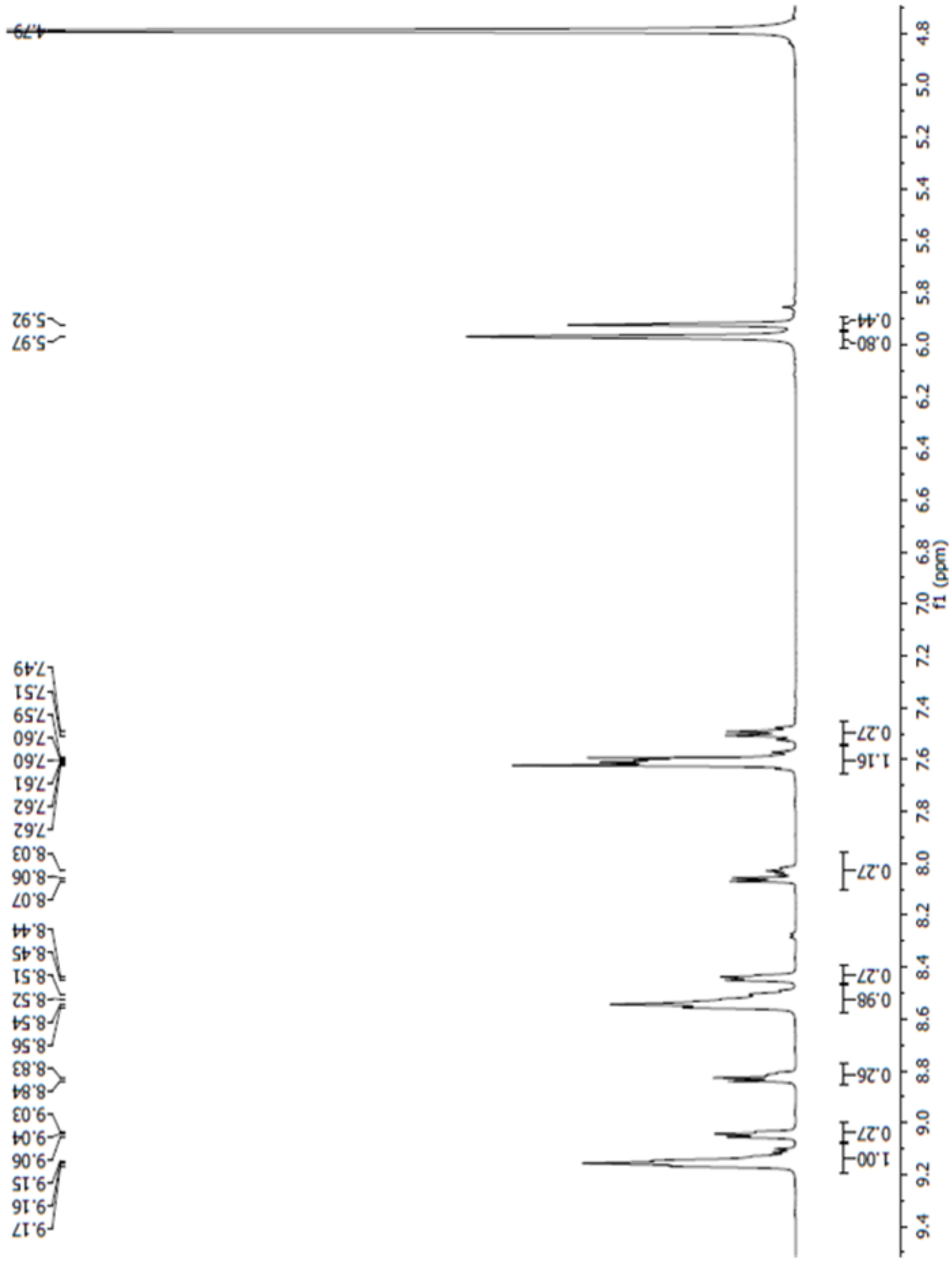
105. Salem, A.A.; Barsoum, B.N.; Izake, E.L. Spectrophotometric and fluorimetric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam in pharmaceutical and urine samples. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **2004**, 60 (4), 771-80.

106. Kumar, P.C.R.; Balaji, K.; Pushpalatha, M.; Sridevi, C.; Reddy, C.S. Electrochemical study and polarographic assay of clonazepam formulations. *Pharmacia Lettre* **2011**, 3 (3), 311-319.

107. Castro, B.; Gameiro, P.; Guimaraes, C.; Lima, J.L.F.C.; Reis, S. Acid/base properties of β-blockers and benzodiazepines in sodium dodecyl sulfate micelles. A spectrophotometric and potentiometric study. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 87 (3), 356-359.

108. Pereira, A.V.; Garabeli, A.A.; Schunemann, G.D.; Borck, P.C. Determination of dissociation constant (Ka) of captopril and nimesulide as analytical chemistry experiment for pharmacy course. *Quimica Nova* **2011**, 34 (9), 1656-1660.

109. Silva, R.L.; Volpato, N.M. Meios para dissolução de comprimidos de Nimesulida: ação dos tensoativos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2002**, 38 (2), 163-172.

Anexos

A. Espectro de RMN ^{1}H do [PBV]Br_2, solubilizado em D_2O, 500 MHz.