Sidney Xavier dos Santos

**Aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite
e borracha de silicone na determinação de
substâncias de interesse farmacológico**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo, como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências
(Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

São Carlos

2007

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 26 / 04 / 2007

Sidney Xavier dos Santos

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais OMILTO e CLARICE, aos meus irmãos CLEIDISSON e CLAUDINEI e à minha namorada ANA MARIA. Tenho em vocês meu alicerce e exemplo de vida a ser seguido. Amo muito todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por me ajudar em mais uma etapa.

Agradeço à minha namorada Ana Maria, que mesmo distante esteve sempre junto de mim. Pelo amor, carinho, incentivo e paciência.

Agradeço à minha família por todo o amor, carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Éder T.G. Cavalheiro, primeiramente pela confiança, pela orientação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Gilberto Chierice pela disponibilidade do laboratório e pela amizade.

Aos demais amigos do LATEQS e GQATP: Pri, Milena, Rita, Ivana, Lucinéia, Carol, Amanda, Isabel, Juliana (Bärbie), Luiz (tio Lu), Toni, Geléia (Zoím), Felipe, André, Luciana (tia Lu), Grazi, Érica, Sandra, Braba, Bruno, Júnia, Erik, Paulo, Rafael, Toninho, Marli, Salvador.

Aos amigos da república Glauco, Helton, Marins e demais amigos do IQSC.

Aos amigos de Cássia: Daniel, Danilo, Tom, Tuyr... Valeu pelo incentivo.

Aos professores do IQSC, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos do CAQI, pela disponibilidade e auxílio.

À Andréia, Silvia, Fátima, Eliana, Bernadete, Regina e demais secretárias e bibliotecárias do IQSC, sempre muito prestativas.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

e a todos que contribuíram indiretamente...

Resumo

Este trabalho teve por objetivo realizar estudos sobre as potenciais aplicações do compósito a base de grafite e borracha de silicone como material eletródico. O compósito foi aplicado na determinação de **propranolol**, uma droga antihipertensiva largamente utilizada no Brasil e **rutina**, um flavonóide com propriedades vasodilatadoras e antioxidantes. Os eletrodos foram preparados misturando-se proporções adequadas de pó de grafite e borracha de silicone, de maneira a obter um compósito com 70% de grafite (*m/m*). Dados de voltametria cíclica (CV) foram usados para estimar a região útil de trabalho para o eletrodo em diferentes eletrólitos suporte e pH. Estudos usando CV foram utilizados para avaliar a resposta e o comportamento voltamétrico dos analitos propostos em relação a vários parâmetros. Para a quantificação foi utilizada voltametria de pulso diferencial (DPV), na qual foram obtidas curvas analíticas para definição de intervalos lineares de resposta e limites de detecção. Curvas analíticas também foram obtidas com eletrodo de carbono vítreo para comparação. Posteriormente, os procedimentos foram aplicados na determinação dos analitos em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com procedimentos padrão descritos na literatura. A rutina foi determinada no medicamento Novarrutiva e os resultados obtidos concordaram com o método de comparação com 95% de confiança. O propranolol foi determinado no medicamento Propranolol Ayerst® e os resultados concordaram com o método comparativo com 95% de confiança. Em todos os casos, com o eletrodo compósito foi obtido menor limite de detecção e maior região linear de resposta para os dois analitos, quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo.

Abstract

Studies regarding the applications of a graphite-silicone rubber composite as an electrode material have been performed and the results described in this work. The composite was used in the voltammetric determination of **propranolol**, an anti-hypertensive drug widely used in Brazil and **rutin** a flavonoid that presents both dilatation of blood vessels capabilities and antioxidative actions. The electrodes were prepared by using a suitable amount of graphite powder and silicone rubber in order to reach a 70% (graphite, w/w) composition. Cyclic voltammetric (CV) data were used in order to characterize the electrode material regarding useful potential window in different supporting electrolyte and pH. CV data were also used in order to evaluate the response of the composite electrode to the analytes. The quantitative measurements were performed with differential pulse voltammetry (DPV) with which analytical curves were obtained and used to estimate the detection limits and linear dynamic range. These data guided us towards the determination of the analytes in pharmaceutical formulations. The results were compared with those from standard methods with agreement in the 95% confidence level, according to the Student's t-Test, in both cases. Lower limits of detection and larger linear dynamic ranges were observed for the composite when compared with those from the glassy carbon electrode under the same experimental conditions.

Lista de Figuras

Figura 1.1- Representação estrutural plana da rutina.	10
Figura 1.2: Representação estrutural plana do propranolol.	15
Figura 3.1: Representação esquemática da célula voltamétrica.	23
Figura 3.2: Representação esquemática do eletrodo composto GBS.	25
Figura 4.1: Voltamograma cíclico obtido utilizando eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em solução 5,0 mmol L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆] em KCl 0,5 mol L ⁻¹ com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	32
Figura 4.2: Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies do composto de grafite de borracha de silicone 70% (<i>m/m</i>). (a) fratura (b) após polimento em lixa d'água 600 seguida de polimento em $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 1 μm e tratamento em ultrassom por 5 min em água (c) após lixamento em lixa d'água 600 seguida de polimento em lixa usada. Magnificação 500x (1), 1000x (2).	35
Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos obtidos em velocidades de varredura entre 5 e 200 mV s^{-1} , utilizando eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em solução 5,0 mmol L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆] em KCl 0,5 mol L ⁻¹	36
Figura 4.4: Dependência das correntes de pico anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura entre, entre 5 e 200 mV s^{-1} , para o eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em solução 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹	38
Figura 4.5: Curva analítica obtida com eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em KCl 0,5 mol L ⁻¹ , contendo diferentes concentrações de K ₃ [Fe(CN) ₆]. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	39
Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em: (a) solução H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ (pH 1,0), (b) solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 4,0), (c) solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), (d) solução tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ (pH 11,0), solução NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (pH 13,0), com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	42
Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em tampão BR pH 4,0 (a) comparado ao GC (b). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) em solução contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina (—) branco.	44
Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ rutina em meio de tampão BR, em diferentes pH. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. No detalhe uma curva de I_{pa} em função do pH.	45

Figura 4.9: Relação entre o potencial de pico em voltametria cíclica e pH, em solução tampão BR em diferentes valores de pH, contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina.47

Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de rutina $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1}48

Figura 4.11: Relação linear entre I_{pa} e I_{pc} , com $v^{1/2}$, obtida a partir dos voltamogramas da Figura 4.10.49

Figura 4.12: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução tampão BR pH 4,0 (—), e em solução tampão BR pH 4,0 contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (—). $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.50

Figura 4.13: Efeito da amplitude de pulso na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de rutina $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 utilizando DPV. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$51

Figura 4.14: Efeito da velocidade de varredura na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), em solução de rutina em tampão BR pH 4,0 utilizando DPV, com amplitude de pulso de 50 mV.52

Figura 4.15: Curva analítica obtida para o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução tampão BR pH 4,0, contendo diferentes concentrações de rutina. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV.54

Figura 4.16: Curva analítica obtida para o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR pH 4,0, contendo diferentes concentrações de rutina. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV.55

Figura 4.17: Curva de adição de padrão de rutina, às amostras de comprimido Novarrutina. Condições descritas na Figura 4.15.57

Figura 4.18: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), em tampão BR pH 7,4. (a) comparado ao GC (b). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) em solução contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol (—) branco.58

Figura 4.19: Efeito do pH na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR, com pH variando entre 2 e 9, utilizando voltametria cíclica, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$61

Figura 4.20: Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1}62

Figura 4.21: Dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura, entre 10 e 200 mV s^{-1} , no eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4.....63

Figura 4.22: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução tampão BR pH 7,4 (—), e em solução tampão BR pH 7,4 contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—). $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude 50 mV.64

Figura 4.23: Efeito da amplitude de pulso na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4 utilizando DPV. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ 65

Figura 4.24: Efeito da velocidade de varredura na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), em solução de propranolol em tampão BR pH 7,4 utilizando DPV, com amplitude de pulso de 50 mV.66

Figura 4.25: Curva analítica obtida para eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução tampão BR pH 7,4, contendo diferentes concentrações de propranolol. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.68

Figura 4.26: Curva analítica obtida para eletrodo GC em solução tampão BR pH 7,4, contendo diferentes concentrações de propranolol. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.69

Figura 4.27: Curva de adição de propranolol, à amostra de comprimido Propranolol Ayerst®. Condições descritas na Figura 4.25.70

Figura 4.28: Efeito das concentrações crescentes de hidroclorotiazida, na reposta do propranolol no eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), usando DPV. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso 50 mV.72

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Repetibilidade de resposta por diferentes formas de polimento do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>)	33
Tabela 4.2: Resultados de corrente e potencial de pico anódico e catódico para voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito 70% (grafite, <i>m/m</i>) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura entre 5 e 200 mV s^{-1}	37
Tabela 4.3: Resultados do estudo dos intervalos úteis de potenciais, em diferentes eletrólitos para o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>), para uma corrente máxima de aproximadamente $10 \mu\text{A}$	40
Tabela 4.4: Resultados de corrente e potencial de pico anódico e catódico para voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) em solução de rutina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1}	49
Tabela 4.5: Determinação de rutina em três amostras do medicamento novarrutina, usando DPV e método espectrofotométrico	57
Tabela 4.6: Determinação de propranolol em três amostras do medicamento Propranolol Ayerst®, usando DPV e método espectrofotométrico	71
Tabela 4.7: Resultados obtidos para diferentes analitos com eletrodos compósito GBS 70% (grafite, <i>m/m</i>) e GC utilizando DPV.....	73

Glossário de símbolos e abreviaturas

- b** - Coeficiente angular da reta
- BR** – tampão Britton-Robinson
- CPE**- Eletrodo de pasta de grafite
- CV** - Voltametria cíclica
- DPV** - Voltametria de pulso diferencial
- E** - Potencial
- E_p** - Potencial de pico
- E_{pa}** - Potencial de pico anódico
- E_{pc}** - Potencial de pico catódico
- GBS** - Grafite e borracha de silicone
- GC** - Carbono vítreo
- GPU** - Grafite-poliuretana
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- I_p** - Corrente de pico
- I_{pa}** - Corrente de pico anódica
- I_{pc}** - Corrente de pico catódica
- LD** - Limite de detecção
- LQ** - Limite de quantificação
- LSV** - Voltametria de varredura linear
- MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura
- NPV** - Voltametria de pulso normal
- R** - Coeficiente de correlação linear
- SCE** - Eletrodo de Calomelano Saturado
- S_d** – Desvio padrão do branco
- SWV** - Voltametria de onda quadrada
- ΔE_p** – Diferença de potencial de pico
- φ**- Diâmetro
- v** - Velocidade de varredura

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	IX
GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Apresentação.....	1
1.2 Métodos de preparação de compósitos	3
1.3 Borracha de silicone	4
1.4 Compósitos a base de Grafite e Borracha de Silicone	6
1.5 Compostos estudados.....	9
1.5.1 Rutina.....	9
1.5.2 Propranolol.....	14
2 OBJETIVOS.....	19
3 PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 Reagentes e soluções.....	20
3.1.1 Soluções Tampão	20
3.1.2 Solução de Ferricianeto de Potássio	21
3.1.3 Solução de Rutina.....	21
3.1.4 Solução de Propranolol.....	21
3.1.5 Solução Amostra de Rutina	21
3.1.6 Solução Amostra de Propranolol	22
3.2 Equipamentos.....	22
3.2.1 Medidas Voltamétricas.....	22
3.2.2 Eletrodos	22
3.2.3 Célula Voltamétrica	23
3.2.4 Microscopia eletrônica de Varredura	23
3.2.5 Espectrofotometria	24

3.3 Procedimentos experimentais	24
3.3.1 <i>Confecção do Eletrodo Compósito GBS</i>	24
3.3.2 <i>Tratamento Mecânico</i>	25
3.3.3 <i>Estudo do intervalo útil de potencial</i>	25
3.3.4 <i>Estudos Voltamétricos para Ferricianeto</i>	26
3.3.5 <i>Estudos Voltamétricos da Rutina</i>	26
3.3.5.1 <i>Curvas de adição de padrão</i>	27
3.3.5.2 <i>Método comparativo</i>	28
3.3.6 <i>Estudos Voltamétricos para Propranolol</i>	28
3.3.6.1 <i>Determinação de Propranolol em formulação farmacêutica</i>	30
3.3.6.2 <i>Método comparativo</i>	30
3.3.6.3 <i>Estudo de Interferentes</i>	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Estudos Voltamétricos para Ferricianeto	32
4.1.1 <i>Comportamento eletroquímico</i>	32
4.1.2 <i>Repetibilidade de resposta</i>	33
4.1.3 <i>Micrografias eletrônicas de varredura</i>	34
4.1.4 <i>Efeito da velocidade de varredura</i>	36
4.1.5 <i>Curva analítica para ferricianeto</i>	38
4.2 Intervalo útil de potenciais em diferentes eletrólitos suporte	40
4.3 Determinação de Rutina com o eletrodo compósito GBS	43
4.3.1 <i>Repetibilidade da resposta do GBS</i>	44
4.3.2 <i>Efeito do pH na resposta voltamétrica da rutina</i>	45
4.3.3 <i>Efeito da Velocidade de varredura</i>	47
4.3.4 <i>Avaliação do Comportamento do eletrodo compósito GBS em DPV para rutina</i>	50
4.3.4.1 <i>Otimização dos parâmetros</i>	51
4.3.4.2 <i>Curva analítica para rutina com eletrodo compósito GBS</i>	53
4.3.4.3 <i>Determinação de rutina em formulação farmacêutica</i>	56
4.4 Determinação de Propranolol com o eletrodo compósito GBS	58
4.4.1 <i>Repetibilidade de resposta do GBS</i>	60
4.4.2 <i>Efeito do pH na resposta voltamétrica do propranolol</i>	60
4.4.3 <i>Efeito da velocidade de varredura</i>	61
4.4.4 <i>Avaliação do comportamento do eletrodo compósito GBS em DPV para propranolol</i>	63
4.4.4.1 <i>Otimização dos parâmetros</i>	64
4.4.4.2 <i>Curva analítica para propranolol com eletrodo compósito GBS</i>	66
4.4.4.3 <i>Determinação de propranolol em formulação farmacêutica</i>	70
4.4.4.4 <i>Estudo de interferente</i>	71
4.5 Resumo dos resultados obtidos com eletrodos GC e compósito GBS 70% (grafite, m/m) utilizando DPV	73
5 CONCLUSÃO	74
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

A utilização de eletrodos à base de carbono se tornou muito importante na Eletroanalítica devido ao seu desempenho satisfatório na região anódica, na qual o mercúrio não apresenta comportamento adequado. Os eletrodos de carbono podem ser aplicados no estudo de substâncias orgânicas e inorgânicas, tanto em processos de oxidação como de redução, sendo que o maior sucesso é obtido quando aplicados em investigações de oxidações eletroquímicas, devido ao seu largo intervalo de polarização anódica com baixa corrente residual.

A aplicação destes eletrodos também oferece vantagens em relação aos eletrodos metálicos, nos quais, durante o uso, pode ocorrer a formação de filmes de óxido na superfície, causando elevadas correntes residuais e gerando dificuldades na reprodução da área superficial¹.

A literatura apresenta diversas estratégias para preparação de eletrodos à base de carbono, sendo exemplos clássicos os eletrodos de grafite pirolítico, de carbono vítreo (GC) e de fibras de carbono, além dos materiais compósitos que utilizam diversos solventes orgânicos ou polímeros como aglutinantes². De acordo com Tallman e Petersen, os compósitos são constituídos de pelo menos uma fase condutora misturada a pelo menos uma fase isolante³. As vantagens dos eletrodos compósitos são a relativa facilidade de preparação do material, possibilidade de incorporação de modificadores, relativa facilidade de regeneração e repetibilidade de área efetiva⁴.

Adams⁵ propôs o chamado “eletrodo de pasta de carbono” (CPE), formado pela mistura de pó de grafite com um líquido aglutinante não eletroativo. O CPE

oferece propriedades atrativas para a investigação de espécies orgânicas e inorgânicas, além da facilidade de sua preparação e baixo custo. A performance eletroanalítica é interessante com relação a outros eletrodos sólidos, por exemplo a baixa corrente residual com um amplo intervalo útil de potenciais, nenhum efeito de memória, facilidade de modificação e potencialidades em adsorção-extração⁴.

No entanto, vários obstáculos podem ser encontrados no uso de CPE's, tais como, instabilidade em meios não aquosos e em condições hidrodinâmicas, não uniformidade na composição da pasta, cinética lenta de transferência de elétrons, necessidade de renovação manual da superfície, baixa repetibilidade de área superficial, entre outras⁴.

Dentre os materiais eletródicos à base de carbono, pode-se destacar outros compósitos, em que os compostos orgânicos na fase líquida são substituídos por polímeros. A fase polimérica do compósito confere viscosidade à pasta antes da cura, quando os materiais podem ser moldados em diferentes formas e tamanhos. Após a cura da fase polimérica, o compósito apresenta resistência mecânica, além de estabilidade em solventes não aquosos e aplicações em fluxo⁷.

O baixo custo dos compósitos à base de carbono os torna ideais para produção de sensores em massa, especialmente quando são comparados com outros materiais como ouro e platina⁷.

As propriedades elétricas do compósito dependem da natureza de cada componente, de sua quantidade relativa e de sua distribuição. A resistência elétrica é determinada pela conectividade das partículas do condutor no interior do material. Isto significa que, a quantidade de cada componente do compósito deve ser estudada para a determinação da composição ideal⁸.

Algumas das principais vantagens dos eletrodos compósitos sólidos em relação às pastas com aglutinantes líquidos são:

- ♦ melhora da relação sinal/ruído, com conseqüente ganho nos limites de detecção;
- ♦ alta resistência mecânica e estabilidade em aplicações em fluxo;
- ♦ possibilidade de uso em solventes não aquosos;
- ♦ relativa simplicidade de preparação e renovação de superfície;

1.2 Métodos de preparação de compósitos

Os principais métodos de preparação são:

- ✓ Termomoldagem de uma mistura homogênea dos sólidos envolvidos. Mascini *et al.*⁹ produziram um eletrodo de grafite e polímero termoplástico (polietileno), cujo comportamento foi analisado por voltametria.
- ✓ Compressão mecânica de uma mistura de pós para obtenção de pastilhas. Klatt *et al.*¹⁰ desenvolveram um eletrodo de grafite/Teflon para caracterização voltamétrica. Os autores propuseram que com este procedimento o eletrodo poderia conservar a capacidade de moldagem e eliminar problemas de dissolução podendo ser usados em solventes não aquosos.
- ✓ Polimerização “*in situ*” do monômero devidamente misturado com o grafite, usando um outro polímero orgânico suporte. Swofford e Carman¹¹ descreveram este procedimento utilizando eletrodos de carbono-epóxi para aplicações voltamétricas.

- ✓ Liquefação da mistura, homogeneização dos componentes e resfriamento da mistura. Wang e Naser¹² utilizaram este método para preparação de eletrodos compósitos modificados de grafite-parafina. A compatibilidade de diferentes modificadores com o eletrodo foi acompanhada por voltametria cíclica (CV).
- ✓ Dissolução de polímero em solvente orgânico volátil, dispersando-se grafite na solução e evaporando-se o solvente, Stulík *et al.*¹³ desenvolveram eletrodos de pasta de carbono utilizando-se desse método. Os eletrodos foram empregados como detectores voltamétricos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1.3 Borracha de silicone

Os silicones são polímeros, que apresentam estabilidade química, resistência à decomposição pelo calor, água ou agentes oxidantes, além de serem bons isolantes elétricos. Os silicones são apresentados nas formas fluida, resina ou de elastômeros (borrachas sintéticas), sempre com inúmeras aplicações. Servem, por exemplo, como agentes de polimento, vedação e proteção. São, também, impermeabilizantes, lubrificantes e, na medicina, são empregados como material básico de próteses. Atualmente estima-se que os silicones são utilizados em mais de 5.000 produtos⁸.

O silicone é um material amplamente empregado na indústria química, sendo encontrado nos mais variados tipos de produtos e formulações. Pela analogia com as cetonas, em 1901 o nome silicone foi dado por Kipping aos compostos de fórmula genérica R_2SiO . Estes compostos foram rapidamente identificados como sendo

poliméricos e atualmente correspondem aos polidialquilsiloxanos, de acordo com a fórmula representada a seguir¹⁴.

O nome silicone foi adotado pela indústria e, na maioria dos casos, se refere a polímeros nos quais R é o radical metila (polidimetilsiloxano). Os radicais metila da cadeia podem ser substituídos por muitos outros grupos, tais como fenila, vinila ou trifluoropropila. As propriedades do silicone, que o tornam um material de grande importância para os mais diversos setores industriais são: excelente estabilidade térmica; boa resistência à radiação ultravioleta; atividade superficial; boas propriedades umectantes, anti-fricção e lubricidade; inércia hidrofóbica e fisiológica; estabilidade ao cisalhamento; propriedades dielétricas; baixa volatilidade em alta massa molar e alta volatilidade em baixa massa molar¹⁴.

Além dessas propriedades, também não há registro de que tenha provocado algum tipo de reação alérgica no ser humano. Com essas características, o silicone pode ser manipulado com segurança, sem o risco de provocar poluição ou danos à saúde humana. Muitos tipos de silicone são recicláveis e outros são de degradação simples, sem agressão ao meio ambiente⁸.

A borracha de silicone empregada como aglutinante no compósito a ser desenvolvido neste trabalho é um selante de cura acética, puro, mono-componente, desenvolvido para vedações⁶.

1.4 Compósitos a base de grafite e borracha de silicone

A preparação e utilização de eletrodos à base de grafite e borracha de silicone (GBS) foi descrita primeiramente por Pungor e Szepesváry^{1,15}. Os autores apresentaram um breve histórico sobre o desenvolvimento de diversos tipos de eletrodo a base de carbono e propuseram o uso de eletrodos GBS em voltametria.

A magnitude de corrente residual foi investigada, bem como o intervalo útil de potenciais, a relação entre a concentração da espécie eletroativa e a corrente de pico, e finalmente a reprodutibilidade dos valores de corrente de pico. Estudaram, também, o comportamento eletroquímico de vários compostos orgânicos e inorgânicos^{1,15}.

A partir daí, o grupo húngaro apresentou vários trabalhos sobre a utilização destes eletrodos compósitos em voltametria.

Pungor *et al.*¹⁶ determinaram alguns fármacos tais como α -metildopa, fenotiazina, fenacetina, por voltametria usando uma mistura vulcanizada de grafite e borracha de silicone como eletrodo em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Pungor *et al.*¹⁷ utilizaram eletrodos feitos de misturas vulcanizadas de grafite e borracha de silicone em análises em fluxo contínuo com detecção amperométrica. Em condição hidrodinâmica, a intensidade de corrente aumentou linearmente com a concentração do eletrólito, e com a raiz quadrada da velocidade.

Feher *et al.*¹⁸ usaram um eletrodo compósito GBS continuamente por várias horas em sistemas em fluxo, sem renovação da superfície do eletrodo, assim sugerindo seu uso em medidas “*in vivo*”, em que a razão de fluxo da circulação de sangue e a distribuição de drogas, em organismos vivos podem ser estudadas.

Niegreisz *et al.*¹⁹ compararam eletrodos compósitos GBS com GC. O eletrodo compósito GBS apresentou correntes residuais idênticas às do GC, porém com

sensibilidade várias vezes maior. Os autores mostraram que o eletrodo compósito GBS pode ser usado como detector em sistemas de injeção em fluxo. Os resultados também mostraram que esta técnica pode ser usada na determinação de compostos em intervalos de concentrações muito baixos, com boa precisão.

Contudo, surpreendentemente, o uso deste material interessante de eletrodo foi interrompido e somente estudos potenciométricos foram apresentados. Talvez pela limitação do eletrodo na região catódica.

Pungor *et al.*²⁰⁻²² aplicaram um eletrodo compósito GBS como indicador em titulações potenciométricas ácido-base. A sensibilidade do eletrodo ao pH foi aumentada pelo pré-tratamento com vários oxidantes, sendo as soluções de permanganato acidificadas as mais adequadas. Quando esses eletrodos ativados eram utilizados, os saltos de potencial no ponto final foram maiores do que aqueles obtidos com eletrodos convencionais, o que é favorável para a titulação de ácidos e bases fracas. Os eletrodos, mostraram um deslocamento de pH de aproximadamente 30 mV/pH, que pode ser aumentado para 70-90 mV/pH pela “ativação” em uma solução contendo H_2SO_4 e KMnO_4 por 1-3 minutos. O efeito da ativação decai em aproximadamente 30 dias. Titulações de vários ácidos em meio aquoso e não aquoso foram realizados com sucesso.

Kazarjan e Pungor²³ descreveram o comportamento de eletrodos íon-seletivos com membrana de GBS em solventes não aquosos. Os autores estudaram como as aplicações destes solventes alteram as correlações válidas para os eletrodos íon-seletivos em meio aquoso e como estas alterações podem ser usadas para propósitos analíticos. Parâmetros como limite de detecção (LD) e constantes de seletividade para um eletrodo iodeto-seletivo em meios aquoso e não aquoso, além do produto de solubilidade para vários sais de prata foram determinados. Uma curva

analítica para o iodeto em solução de metanol 90% (v/v) foi obtida com resposta entre 10^{-8} a 10^{-9} mol L⁻¹.

Siska²⁴ utilizou um eletrodo compósito GBS como eletrodo indicador para determinação potenciométrica e amperométrica de prata, mercúrio, paládio e iodo.

El Taras *et al.*²⁵ estudaram a influência de alguns agentes complexantes no comportamento de eletrodos compósitos GBS sensíveis a cobre(II). Com base nos resultados experimentais encontrados, os eletrodos foram aplicados na determinação do íon citrato e 8-hidroxiquinolina com titulação potenciométrica.

Pastor *et al.*²⁶ compararam o desempenho de um eletrodo de platina, eletrodo Radelkis OP-C-7111D e um eletrodo de membrana de grafite e borracha de silicone preparado em laboratório em titulações potenciométricas de substâncias redutoras com Br₂ em ácido acético. Em determinações de hidroquinona, 2-metilhidroquinona, 2-clorohidroquinona e ácido ascórbico, o eletrodo Radelkis apresentou maior sensibilidade. A vantagem do eletrodo de membrana de grafite e borracha de silicone é a rapidez na estabilização da resposta.

Recentemente, Oliveira⁶ desenvolveu um trabalho, em que preparou eletrodos compósitos GBS em diferentes composições. Avaliou estes eletrodos quanto as suas características físicas e à sua resposta em diferentes técnicas eletroanalíticas e os aplicou na determinação de substâncias de interesse farmacológico tais como, catecolaminas e compostos fenólicos. A melhor resposta voltamétrica foi obtida com o eletrodo compósito GBS contendo 70% de grafite (*m/m*), esta composição apresentou-se reprodutível quanto à renovação da superfície, além do desempenho satisfatório em voltametria de pulso diferencial (DPV), com fins quantitativos.

1.5 Compostos estudados

1.5.1 Rutina

Os flavonóides são substâncias polifenólicas importantes na definição da cor, sabor, aroma e estabilidade de alimentos de origem vegetal²⁷. As principais fontes são frutas, especialmente as cítricas; nozes, sementes, flores e cascas de vegetais²⁸. Essa ampla classe de substâncias de origem natural possui importantes propriedades bioquímicas e farmacológicas que atuam de forma benéfica sobre a saúde humana.

Dentre as diversas atividades farmacológicas atribuídas aos flavonóides, destacam-se a capacidade antioxidante, atividades antiinflamatórias e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade anticarcinogênica, anti-hepatóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária, antimicrobiana e antiviral²⁹.

Sabe-se, também, que os flavonóides podem inibir vários estágios dos processos que estão relacionados com o início da aterosclerose, como a ativação de leucócitos, adesão, agregação e secreção de plaquetas²⁸, além de atividades hipolipidêmicas³⁰ e aumento de atividades de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL)³¹.

A rutina ou 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona-3 β -D-rutinosida, é um flavonóide glicosídico muito comum na dieta alimentar, é conhecida também como vitamina P³². Cujas estrutura é apresentada na Figura 1.1.

A rutina apresenta a capacidade de promover o fortalecimento capilar, melhorar a permeabilidade, sendo essencial para uma melhor absorção de vitamina C pelo organismo.

A rutina combate a fragilidade capilar, age fortalecendo a estrutura da parede dos vasos sangüíneos; assim, é muito usada no tratamento e prevenção de pequenas varizes. É extraída de frutos da *Dimorphandra mollis*, conhecido como barbatimão-da-folha-miúda, o qual contém uma quantidade excepcional de rutina³³.

Figura 1.1- Representação estrutural plana da rutina.

A rutina é também encontrada no Sabugueiro, *Sambucus nigra*, árvore originária da Europa, África e Ásia Ocidental. Presente nas folhas e frutos, a rutina atua na permeabilidade capilar, tonificando os vasos capilares. É um produto natural obtido de plantas que ocorrem comumente no Brasil, notadamente na Região Nordeste³³.

A aplicação de detectores eletroquímicos como o eletrodo de pasta de carbono e o eletrodo de GC têm mostrado bons resultados no estudo voltamétrico de determinação de rutina. Alguns trabalhos encontrados na literatura estão relatados a seguir³⁴.

Kang *et al.*³⁵ investigaram o comportamento eletroquímico da rutina em eletrodo de GC e apresentaram um novo método eletroquímico para sua determinação. A cobertura máxima da superfície do eletrodo é $5,09 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Esta área corresponde a um anel benzênico com o 3',4'-dihidroxidos adsorvidos; sendo que as outras partes da rutina mantêm-se afastadas da superfície. Em meio de solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,46), uma onda adsortiva polarográfica muito sensível foi observada em aproximadamente 290 mV (vs. Ag/AgCl), usando DPV. A relação linear entre a corrente de pico e a concentração da rutina existe em um intervalo de $3,28 \cdot 10^{-7}$ e $3,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O LD da rutina é abaixo de $2,51 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Este método foi aplicado para determinar rutina em diversas amostras de medicamentos chineses e os resultados são satisfatórios.

Song *et al.*³⁶ estudaram uma onda catalítica polarográfica da vitamina P na presença de persulfato através de polarografia de varredura linear e CV. Em solução tampão ácido tartárico/ tartarato de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,3) contendo $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, o potencial de pico da onda catalítica foi -1420 mV (vs.SCE) e a relação linear entre a corrente de pico e a concentração da rutina se deu no intervalo de $8 \cdot 10^{-9}$ e $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de 0,9994 ($n=13$). Uma onda catalítica de $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de vitamina P aumentou em 70 vezes a corrente polarográfica quando comparada com a correspondente onda da redução. O LD obtido foi $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, e o desvio padrão relativo para níveis de $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foi 0,7% para 15 medidas. O método proposto foi usado para a determinação do índice da vitamina P na preparação de medicamentos e da planta medicinal *Sophora japonica L.*

Volikakis e Efstathiou³⁴ determinaram rutina e outros flavonóides por injeção em fluxo/voltametria de redissolução adsortiva, usando eletrodos de pasta de grafite-

nujol e grafite-difenileter. O efeito dos parâmetros experimentais tais como pH, potencial de acumulação, tempo de acumulação e a presença de vários compostos foram examinados. A sensibilidade instrumental e os menores limites de detecção foram calculados para todos os flavonóides em todos os casos.

Zoulis e Efstathiou³² estudaram o comportamento não faradaico da preconcentração de nove flavonóides (seis flavonas: fisetina, galangina, morina, quercetina, rhamnetina, rutina e três flavanonas: hesperidina, hesperitina, naringina) no eletrodo de pasta de carbono e também otimizaram os parâmetros: pH, potencial de acumulação, presença de surfactantes. Todas as flavonas testadas foram facilmente acumuladas no eletrodo de pasta de grafite resultando em considerável aumento de sinal, fazendo determinações em concentrações abaixo de 10^{-8} a 10^{-7} mol L⁻¹ depois de preconcentração de 1 a 4 min. Flavanonas não são preconcentradas, por isso seus limites de detecção são maiores, da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹. Um procedimento simples voltamétrico para a determinação de rutina em um preparação de multivitaminas foi apresentado.

Yang *et al.*³⁷ investigaram o comportamento voltamétrico da rutina por voltametria de varredura linear (LSV), DPV e CV em um eletrodo de GC. Os efeitos da concentração do etanol e do valor de pH no potencial de pico e na corrente de pico foram estudados em detalhe. Em meio de 0,059 mol L⁻¹ NaH₂PO₄ (pH 4,70), a rutina mostrou um pico anódico bem definido. O LD foi 0,01 mg L⁻¹. O método foi usado para a determinação direta da rutina nos fármacos. O desvio padrão relativo obtido foi 2,7% (n = 10). Sua recuperação está na escala de 99 a 104%. O mecanismo da reação do eletrodo também foi discutido.

Malagutti *et al.*³⁸ estudaram o comportamento do flavonóide rutina em eletrodo compósito grafite-poliuretana (GPU) e GC. Os autores determinaram rutina

em chá verde usando voltametria de onda quadrada (SWV) com eletrodo GPU e GC. O LD encontrado foi $7,1 \text{ nmol L}^{-1}$ com o eletrodo GPU e 17 nmol L^{-1} usando o eletrodo GC e a média de repetibilidade para 5 determinações foi de 3,5%.

Ghica e Brett³⁹ investigaram a oxidação eletroquímica da rutina em eletrodo GC usando CV, DPV e SWV sobre um amplo intervalo de potenciais. A oxidação eletroquímica é um processo complexo, relacionado com os grupos hidroxila na molécula de rutina. Um processo de adsorção foi observado com os produtos de oxidação bloqueando a superfície.

1.5.2 Propranolol

Os β -bloqueadores, ou antagonistas adrenérgicos, são drogas largamente utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares tais como hipertensão arterial, arritmias cardíacas, e angina pectoris, bem como para outros tipos de patologias como ansiedade e glaucoma⁴⁰.

O efeito terapêutico dos β -bloqueadores, embora não se compreendam completamente os mecanismos, são normalmente explicados por sua capacidade de bloquear os receptores β -adrenérgicos impedindo o acesso de agonistas endógenos como a noradrenalina e a adrenalina, levando-as a concentrações no sangue que não causam efeitos indesejáveis⁴¹.

A ativação dos receptores β leva a um maior influxo de cálcio às células cardíacas. Isto tem conseqüências tanto elétricas, quanto mecânicas. Há um aumento na atividade dos marca-passos do ritmo (efeito cronotrópico positivo). A contratilidade intrínseca aumenta (efeito inotrópico positivo) e o relaxamento é acelerado. Em conseqüência disto, a resposta contrátil do músculo cardíaco isolado tem sua tensão aumentada, mas sua duração reduzida. Estes efeitos diretos são facilmente demonstrados na ausência de reflexos, provocados por alterações de pressão arterial⁴².

Na insuficiência cardíaca, os β -bloqueadores aumentam o número de receptores miocárdicos e a sensibilidade às catecolaminas, permitindo melhora cronotrópica e inotrópica no exercício. Com a diminuição da freqüência cardíaca há melhora da função diastólica e da perfusão miocárdica, e diminuição do consumo de oxigênio miocárdico, o que pode levar à melhora da função sistólica. Além disso, possui efeitos antiisquêmicos e antiarrítmicos⁴¹.

O propranolol ou 1-isopropilamino-3-(naftiloxi)-2-propanol, é um β -bloqueador não seletivo. É muito útil na redução da pressão arterial em caso de hipertensão leve e moderada. Na hipertensão grave o propranolol é particularmente útil para impedir a taquicardia reflexa que ocorre com frequência em consequência do tratamento com vasodilatadores diretos⁴².

Figura 1.2: Representação estrutural plana do propranolol.

O propranolol é lipossolúvel, e em consequência, é absorvido (90%) quase que completamente pelo trato gastrointestinal, apresentando maior absorção quando ingerido juntamente com alimentos. O propranolol compete especificamente com estimulantes de receptores β -adrenérgicos pelos sítios disponíveis. Quando o acesso aos sítios receptores β -adrenérgicos é bloqueado pelo propranolol, as respostas cronotrópicas, inotrópicas e vasodilatadoras do estímulo β -adrenérgico são proporcionalmente diminuídas⁴².

O mecanismo de efeito anti-hipertensivo do propranolol não está totalmente elucidado. Entre os fatores que podem estar envolvidos, contribuindo para a ação anti-hipertensiva, estão a diminuição do débito cardíaco, inibição da secreção de renina pelos rins e a diminuição do tônus simpático, provenientes dos centros vasomotores do cérebro. Na *angina pectoris*, o propranolol geralmente reduz a necessidade de oxigênio do coração, impedindo o aumento da frequência cardíaca

induzida pelas catecolaminas, reduzindo a pressão arterial sistólica e o ritmo cardíaco⁴².

A determinação de propranolol é importante do ponto de vista fisiológico, bem como para propósitos de controle de qualidade. Várias técnicas instrumentais têm sido utilizadas para este fim, incluindo espectrofotometria^{43,44}, quimiluminescência⁴⁵ e cromatografia (HPLC)^{46,47} entre outros.

Técnicas voltamétricas/polarográficas são caracterizadas pela simplicidade, rapidez e baixo custo e também tem sido usados na determinação de propranolol. A seguir, estão relacionados alguns trabalhos sobre determinação de propranolol por técnicas voltamétricas/polarográficas:

Belal *et al.*⁴⁸ propuseram um método voltamétrico altamente sensível e simples para determinação de N-nitroatenolol (NA) e N-nitropropranolol (NP) em uma simulação de suco gástrico. O método utilizado foi polarografia de pulso diferencial, que se baseia na medida de corrente de pico produzida por NA e NP em soluções tampão BR de pH 3 e 4 para NA e NP respectivamente. A curva analítica foi linear no intervalo de 0,16 a 9,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com LD de 0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) para NA. Para NP o intervalo linear foi de 0,08 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com LD de 0,009 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($3,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). O método é caracterizado pela simplicidade e alta sensibilidade quando comparado com o método HPLC.

Ghoneim *et al.*⁴⁹ determinaram indiretamente propranolol por voltametria de redissolução adsorptiva. O propranolol é um composto eletro-inativo no eletrodo de mercúrio (Hg), contudo após reação com ácido nítrico (HNO_3) é produzido um derivado eletro-ativo, o nitropropranolol. Um procedimento altamente sensível para determinação de propranolol baseado na adsorção do derivado nitrado foi descrito. Após extração da droga artificialmente adicionada em amostras de urina humana e

plasma sanguíneo, seguido de nitração, o presente método otimizado foi aplicado para determinação de traços da droga. A curva analítica obtida foi linear no intervalo de 5 a 200 ng mL⁻¹ para urina e 10 a 150 ng mL⁻¹ para plasma. Os limites de detecção foram 2 e 5 ng mL⁻¹ em urina e plasma, respectivamente.

El-Ries *et al.*⁵⁰ determinaram indiretamente propranolol por polarografia. Propranolol reagiu com HNO₃ para obtenção de nitropropranolol e foi então medido em solução tampão BR no intervalo de pH de 2,0 a 12,0 por DPV. Um pico bem resolvido foi obtido em pH 2,0. Uma curva analítica no intervalo de 5,0.10⁻⁷ a 5,0.10⁻⁵ mol L⁻¹ e um LD de 5 nmol L⁻¹ foram obtidos. O desvio padrão relativo foi de 1,95% (n=10) em solução 5,0.10⁻⁶ mol L⁻¹ de propranolol. O efeito de interferentes na altura do pico foram avaliados. O método foi aplicado na determinação da droga em comprimidos.

Radi *et al.*⁵¹ estudaram a oxidação eletroquímica do propranolol com eletrodo de pasta de grafite em meio de tampão BR, no intervalo de pH entre 2,0 e 11,0 usando CV, LSV e DPV. Um pico anódico bem definido foi obtido em 918 mV (vs. Ag/AgCl) em pH 2,0. Uma curva analítica com intervalo linear entre 6,0.10⁻⁷ e 5,0.10⁻⁵ mol L⁻¹ e um LD de 2,0.10⁻⁷ mol L⁻¹ foram obtidos, usando voltametria de redissolução anódica adsortiva. O método foi aplicado na dosagem de propranolol na forma de comprimidos. Os resultados foram estatisticamente consistentes com aqueles obtidos com métodos espectrofotométricos-UV.

Ambrosi *et al.*⁵² determinaram eletroquimicamente propranolol e outros fármacos, em amostras de água às quais os compostos foram artificialmente adicionados. O comportamento eletroquímico de compostos farmacêuticos ativos em meio ácido e neutro foi estudado por CV e técnicas voltamétricas de pulso em eletrodos de Hg, pasta de nanotubos de carbono, pasta de grafite e ouro. Os

melhores resultados em termos de sensibilidade, intervalo de linearidade e limites de detecção foram obtidos com voltametria de pulso normal (NPV) para propranolol. Uma etapa de enriquecimento de 2 ordens de magnitude foi realizada por extração em fase sólida para concentrar as amostras. O método foi otimizado e testado em amostras de água de rio às quais o analito foi artificialmente adicionado.

Campanella *et al.*⁵³ compararam métodos voltamétricos com métodos espectrofotométricos para análise de fármacos. A possibilidade de quantificação de princípios farmacêuticos ativos (propranolol e outros) em água e em formulações comerciais por métodos voltamétricos-polarográficos foi investigada. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por espectrofotometria UV.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo principal dar continuidade aos estudos voltamétricos usando eletrodos compósitos GBS, já iniciados por nosso grupo.

Nesta etapa, pretende-se aplicar o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) na determinação de espécies eletroativas de interesse farmacológico, usando DPV.

As espécies a serem determinadas serão:

- 1) o flavonóide *rutina* que possui propriedades vasodilatadoras e antioxidantes;
- 2) e o *propranolol*, um anti-hipertensivo bastante utilizado no Brasil.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A.) e usados sem purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas em água purificada em sistema Milli-Q (Millipore).

3.1.1 Soluções tampão

A solução tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,00 foi preparada dissolvendo-se 1,3801 g de acetato de sódio (Merck) e 280 μL de ácido acético (Mallinckrodt) em água, completando-se o volume em balão volumétrico de 100,0 mL.

A solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00 foi preparada dissolvendo-se 1,57 g de fosfato dibásico de sódio (Merck) e 0,94 g de fosfato monobásico de sódio (Mallinckrodt) em água, completando-se o volume para 200,0 mL em um balão volumétrico.

A solução tampão amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 11,0 foi preparada dissolvendo-se 17,52 g de cloreto de amônio (Merck) e 142 mL de hidróxido de amônio 28 % (Merck), ajustando-se o volume em balão volumétrico de 250,0 mL.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) foi preparada dissolvendo-se 2,47 g de ácido bórico (Merck), 12,25 g de perclorato de sódio (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover), 2,31 mL de ácido fosfórico (Mallinckrodt) e 2,28 mL de ácido acético (Mallinckrodt) e completando-se o volume em balão volumétrico de 1000,0 mL. Foram preparadas soluções no intervalo de pH entre 2 e 10, sendo o pH ajustado pela adição de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.2 Solução de ferricianeto de potássio

A solução de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) foi preparada dissolvendo-se 0,0412 g de $K_3[Fe(CN)_6]$ (Merck) e 0,9320 g de cloreto de potássio (KCl) (Mallinckrodt) em 25,0 mL de água para preparar um solução 5,0 mmol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹, respectivamente.

3.1.3 Solução de rutina

A solução estoque de rutina foi preparada dissolvendo-se 0,0083 g de rutina (Natural Pharma® 98,8% pureza) em etanol P.A. (Synth) obtendo-se uma solução de 0,50 mmol L⁻¹. A partir desta solução foram obtidas as soluções de trabalho, por diluição em tampão BR pH 4,0.

3.1.4 Solução de propranolol

A solução estoque de propranolol foi preparada dissolvendo-se 0,0158 g de propranolol (Natural Pharma® 99,8 % pureza) em solução tampão BR pH 7,4 obtendo-se uma solução de 0,534 mmol L⁻¹. A partir desta solução foram obtidas as soluções de trabalho, por diluição em tampão BR pH 7,4.

3.1.5 Solução amostra de rutina

Foram triturados 20 comprimidos de Novarrutina em almofariz de vidro com pistilo. Uma solução foi, então, preparada dissolvendo-se 0,1078g do material macerado, equivalente a 4,1 mg de rutina, em 25,0 mL de uma mistura de etanol e

ácido acético $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ (11:1 v/v), obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final igual a $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito, de acordo com o rótulo. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi diluída para 25,0 mL, obtendo-se uma solução de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.6 Solução amostra de propranolol

Foram triturados 20 comprimidos de Propranolol Ayerst® em almofariz de vidro com pistilo. A solução foi preparada dissolvendo-se uma massa de 0,0743 g do comprimido, equivalente a 14,7 mg de propranolol, em 50,0 mL de uma solução tampão BR pH 7,4, obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final igual a $9,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, de acordo com o rótulo.

3.2 Equipamentos

3.2.1 Medidas voltamétricas

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se um potenciostato BAS CV-50W, acoplado a um microcomputador e controlado pelo software BAS 2.3.

3.2.2 Eletrodos

Como eletrodos de trabalho, foram utilizados os eletrodos compósitos a base de grafite e borracha de silicone ($\phi = 3,0 \text{ mm}$), e para estudos de comparação, um eletrodo de carbono vítreo ($\phi = 3,0 \text{ mm}$).

Como eletrodo auxiliar, foi utilizado uma placa de platina de 2 mm largura e 5 mm de comprimento, fixada em um tubo de vidro. O contato elétrico foi feito conectando-se um fio de cobre à platina.

Um eletrodo de calomelano saturado (SCE) foi utilizado como eletrodo de referência.

3.2.3 Célula voltamétrica

Todas as medidas voltamétricas foram feitas em uma célula de vidro com capacidade total para 25,0 mL, contendo o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência, ligados ao potenciostato. Uma representação da célula pode ser observada na Figura 3.1.

Figura 3.1: Representação esquemática da célula voltamétrica.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas em um equipamento Zeiss DSM 940-A, operado a 20 kV em diferentes magnificações.

As amostras foram obtidas a partir de um bastão do compósito fraturado ou polindo-se a superfície de outros bastões de diferentes maneiras, como descrito na sessão 3.3.2, abaixo.

3.2.5 Espectrofotometria

Para os métodos comparativos foi utilizado um espectrofotômetro modelo Multispec-1501 da marca Shimadzu, acoplado a um microcomputador e controlado pelo software Multispec 15,01 Hyper-UV.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Confeção do eletrodo compósito GBS

Os eletrodos foram preparados misturando-se grafite em pó (1-2 μm , Aldrich) e borracha de silicone comercial (Pulvitec), de maneira a obter um compósito na proporção de 70% (grafite, m/m). A mistura foi homogeneizada por 10 minutos em almofariz de vidro, inserida em tubos de vidro ($\phi = 3,0 \text{ mm}$). Uma vez inserido no tubo de vidro o compósito foi comprimido com o auxílio de uma barra de cobre ($\phi = 3,0 \text{ mm}$), em uma prensa hidráulica com pressão de aproximadamente 5 Kgf por 24 h. Após a cura, o contato elétrico foi estabelecido conectando-se um fio de cobre ao compósito com o auxílio de cola de prata (EPO-TEK 410E, Epoxy Technology). Uma representação do eletrodo compósito é dada na Figura 3.2.

Figura 3.2: Representação esquemática do eletrodo composto GBS.

3.3.2 Tratamento mecânico

A superfície do compósito foi exposta por abrasão em lixa d'água 600 em uma politriz motorizada modelo APL-02 (Arotec), seguido de polimento com suspensão de alumina ($\phi = 1\mu\text{m}$, Arotec) em feltro na politriz.

Após polimento o eletrodo foi submetido a ultrassom em um banho USC 1400 (Unique) por 5 min em isopropanol e 5 min em água destilada.

Quando foi necessário renovar a superfície do eletrodo entre cada determinação, a superfície foi tratada por polimento com uma lixa 600 bastante usada, na politriz. Após abrasão, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel absorvente.

3.3.3 Estudo do intervalo útil de potencial

O estudo do intervalo útil de potencial foi feito em diferentes valores de pH nos seguintes eletrólitos: solução de H_2SO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0; solução tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0; solução tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; solução tampão amônio $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 11,0 e solução de NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 13,0.

3.3.4 Estudos voltamétricos para ferricianeto

Voltamogramas cíclicos foram obtidos com solução $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ para avaliar a resposta voltamétrica do eletrodo a 5, 10, 25, 50, 100 e 200 mV s⁻¹ entre -200 e +650 mV (vs. SCE).

Voltamogramas sucessivos após polimento em $\gamma-Al_2O_3$ (1 μm) e tratamento em ultrassom foram obtidos e comparados com aqueles obtidos após abrasão do eletrodo com lixa 600 usada.

Voltamogramas cíclicos também foram obtidos para solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ em diferentes concentrações entre $5,0 \cdot 10^{-5}$ e $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, usando $v = 50$ mV s⁻¹ entre -200 e +700 V (vs. SCE). Mediram-se os potenciais de pico anódico e construiu-se uma curva analítica para demonstrar a resposta linear do eletrodo.

3.3.5 Estudos voltamétricos da rutina

As medidas voltamétricas para a determinação de rutina foram realizadas com desaeração da solução após borbulhamento com nitrogênio por 10 minutos. A superfície do eletrodo foi renovada entre cada determinação com lixa 600 usada.

Foram realizadas medidas de CV para verificar o comportamento eletroquímico da rutina, os potenciais de oxidação e redução. As medidas foram feitas com rutina na concentração de $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão BR com valores de pH entre 2 e 8 e com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, entre 0 e +700 mV (vs. SCE).

Também foi feito um estudo do efeito da velocidade de varredura de potenciais em CV, com velocidades entre 10 e 200 mV s⁻¹ para $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de rutina em tampão BR pH 4,0.

O estudo de repetibilidade de resposta para o eletrodo compósito GBS 70% (*m/m*) foi realizado em tampão BR pH 4,0, contendo $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de rutina com $v = 50$ mV s⁻¹. No qual foram realizadas 10 medidas em CV, sempre com renovação da superfície.

Na otimização dos parâmetros da DPV, foram obtidos voltamogramas em tampão BR pH 4,0 contendo $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de rutina, no intervalo de 100 a 600 mV. A amplitude foi variada entre 10 e 100 mV e a velocidade de varredura entre 10 e 100 mV s⁻¹.

Usando as condições otimizadas, curvas analíticas foram obtidas com o eletrodo compósito 70% (*m/m*) em DPV, nas melhores condições de amplitude de pulso e velocidade de varredura. Inicialmente, adicionou-se 20,0 mL de solução tampão BR pH 4,0 na célula eletroquímica e adições sucessivas de solução estoque de rutina na concentração $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ foram feitas com o auxílio de uma micropipeta Eppendorff de volume regulável (100 e 1000 µL).

Após cada adição, traçaram-se três voltamogramas e a corrente de pico foi medida para cada um, obtendo-se um valor médio. Finalmente uma curva analítica de corrente média de pico em função da concentração de rutina foi obtida.

3.3.5.1 Curvas de adição de padrão

Para a determinação de rutina no medicamento, foram obtidas curvas de adição de padrão em triplicata. A concentração inicial de rutina foi ajustada para aproximadamente $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ a partir de informações do rótulo. Foram feitas adições sucessivas de 150 µL de uma solução estoque de concentração $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para cada adição foram obtidos três voltamogramas de pulso

diferencial. Um gráfico dos valores médios de corrente de pico encontrados em função da concentração de padrão adicionado foi obtido.

3.3.5.2 Método comparativo

Como método comparativo foi utilizado o método oficial descrito na AOAC, que consiste de um método espectrofotométrico⁵⁴, baseado na medida de absorbância das soluções de amostra e de padrão nos comprimentos de onda 338,5; 352,5 e 366,5 nm, usando água como branco.

A solução padrão foi preparada dissolvendo-se 100 mg de rutina em 250,0 mL de uma solução de etanol e ácido acético 0,9 mol L⁻¹ (11:1 v/v), da qual se retirou uma alíquota de 5,0 mL e diluiu-se com água para 100,0 mL, obtendo uma solução padrão de concentração 0,02 mg mL⁻¹.

A solução da amostra foi preparada pesando-se uma massa do comprimido correspondente a uma massa de rutina entre 0,05 - 0,5 g e dissolvendo-a em solução de etanol e ácido acético 0,9 mol L⁻¹ (11:1 v/v). Obtendo-se uma solução de concentração de aproximadamente 0,02 mg mL⁻¹.

3.3.6 Estudos voltamétricos para propranolol

As medidas voltamétricas para a determinação de propranolol foram realizadas com desaeração da solução após borbulhamento com nitrogênio por 10 min. A superfície do eletrodo foi renovada entre cada determinação com lixa 600 usada.

Foram realizadas medidas de CV para verificar o comportamento eletroquímico do propranolol, os potenciais de oxidação e redução. As medidas foram feitas com propranolol na concentração de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR com valores de pH entre 2 e 9 e com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , entre 500 e +1300 mV (vs. SCE).

Também foi feito um estudo do efeito da velocidade de varredura de potenciais em CV, com velocidades entre 10 e 200 mV s^{-1} para $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol em tampão BR pH 7,4.

O estudo de repetibilidade de resposta para o eletrodo compósito GBS 70% (*m/m*) foi realizado em tampão BR pH 7,4, contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. No qual foram realizadas 10 medidas em CV, sempre com renovação da superfície.

Na otimização dos parâmetros da DPV, foram obtidos voltamogramas em tampão BR pH 7,4 contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol, no intervalo de 500 a 1300 mV. A amplitude foi variada entre 10 e 100 mV e a velocidade de varredura entre 5 e 50 mV s^{-1} .

Usando as condições otimizadas, curvas analíticas foram obtidas com o eletrodo compósito GBS 70% (*m/m*) em DPV, nas melhores condições de amplitude de pulso e velocidade de varredura. Inicialmente, adicionou-se 15,0 mL de solução tampão BR pH 7,4 na célula eletroquímica e adições sucessivas de solução estoque de propranolol na concentração $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram feitas com o auxílio de uma micropipeta Eppendorff de volume regulável (100 e $1000 \mu\text{L}$).

Após cada adição, traçaram-se três voltamogramas e a corrente de pico foi medida. Finalmente uma curva analítica de corrente de pico em função da concentração de propranolol foi obtida.

3.3.6.1 Determinação de propranolol em formulação farmacêutica

Para a determinação de propranolol no medicamento Propranolol Ayerst® do laboratório Sigma Farma LTDA, foram realizadas curvas de adição de padrão em triplicata. A concentração inicial de propranolol foi ajustada para aproximadamente $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a partir de informações do rótulo. Foram feitas adições sucessivas de 350, 250 e 200 μL de uma solução estoque de concentração $6,69 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para cada adição foram obtidos três voltamogramas de pulso diferencial. Um gráfico dos valores médios de corrente de pico encontrados em função da concentração de padrão adicionado foi obtido.

3.3.6.2 Método comparativo

O método comparativo utilizado para determinação de propranolol foi aquele recomendado pela farmacopéia americana (USP XXI)⁵⁵, no qual se mede a absorbância da amostra e do padrão no comprimento de onda 293 nm.

A solução padrão foi preparada dissolvendo-se 0,0098g de propranolol em 50,0 mL de água, obtendo-se uma solução de concentração $196 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A solução da amostra foi obtida triturando-se 20 comprimidos e dissolvendo-se uma massa do pó obtido, equivalente a 100 mg de propranolol, em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Alíquotas de 5,0 mL de ambos, amostra e padrão foram colocadas em funis de separação, uma em cada, adicionou-se 10,0 mL de água, 1,0 mL de NaOH $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ e 25,0 mL de heptano. Após a separação das fases, determinou-se a

absorbância da amostra e do padrão contidas na fase orgânica, usando heptano como branco.

3.3.6.3 Estudo de interferentes

Para o estudo de interferentes, foram preparadas soluções contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de propranolol, na presença de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Para cada concentração, foram obtidos três voltamogramas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos voltamétricos para ferricianeto

4.1.1 Comportamento eletroquímico

Um voltamograma cíclico típico para uma solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, obtido com o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) é mostrado na Figura 4.1.

Figura 4.1: Voltamograma cíclico obtido utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.2 Repetibilidade de resposta

Os estudos de repetibilidade de resposta para o eletrodo GBS 70% (grafite, *m/m*) foram realizados em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ para dez replicatas com velocidade de 100 mV s⁻¹. Para cada medida voltamétrica a superfície do eletrodo foi renovada, usando-se dois procedimentos de renovação, para comparação. Uma delas foi lixar o eletrodo em lixa d'água 600 seguido de polimento em $\gamma-Al_2O_3$ 1 μm e tratamento em ultrassom⁶. A outra maneira foi lixar o eletrodo em lixa 600 seguido de polimento em uma lixa 600 usada. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Repetibilidade de resposta por diferentes formas de polimento do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*)

Corrente / μA	Tipo de polimento	
	$\gamma-Al_2O_3$ / ultrassom	lixa usada
I_{pa}	77 ± 4	81 ± 3
I_{pc}	-80 ± 5	-85 ± 2

$n = 10$, para $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹, voltametria cíclica, $v = 100$ mV s⁻¹

Dos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se concluir que o polimento em lixa 600, seguido de lixa 600 usada é suficiente para obter uma superfície reprodutível e com sensibilidade próxima àquela obtida com o outro tratamento. Assim optou-se pelo uso da lixa usada nos estudos subseqüentes, considerando a simplicidade do procedimento.

4.1.3 Micrografias eletrônicas de varredura

As micrografias das superfícies do compósito 70% (grafite, *m/m*) são apresentadas nas Figuras 4.2. Observando-se as micrografias pode-se dizer que a superfície do compósito sem tratamento apresenta-se homogênea, com escamas e vales, sendo semelhante nas duas magnificações usadas.

Após polimento com $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, seguido de ultrassom (Figuras 4.2. b, 1 e 2), a superfície se torna mais lisa, mantendo-se homogênea e, aparentemente, escamada, com pequenos poros. Estes poros são melhor visualizados na magnificação de 1000x.

Após polimento com a lixa 600 usada, a superfície também se apresenta homogênea, mas visivelmente mais lisa, com escamas menos aparentes. Talvez pela menor rugosidade, os poros são visíveis mesmo a 500 x. Pode-se também visualizar grânulos, provavelmente vindos da lixa.

Figura 4.2: Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies do compósito de grafite de borracha de silicone 70% (m/m). (a) fratura (b) após polimento em lixa d'água 600 seguida de polimento em $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 1 μm e tratamento em ultrassom por 5 min em água (c) após lixamento em lixa d'água 600 seguida de polimento em lixa usada. Magnificação 500x (1), 1000x (2).

4.1.4 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo GBS 70 % (grafite, *m/m*) foi investigado em solução 5,0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] em KCl 0,5 mol L⁻¹. Os resultados obtidos variando a velocidade de varredura entre 5 e 200 mV s⁻¹ são representados na Figura 4.3. Os voltamogramas cíclicos mostram um aumento na intensidade de corrente de pico e um deslocamento dos picos anódico e catódico com o aumento da velocidade de varredura.

Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos obtidos em velocidades de varredura entre 5 e 200 mV s⁻¹, utilizando eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução 5,0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] em KCl 0,5 mol L⁻¹.

Na Tabela 4.2 são apresentados os valores de ΔE_p que mostram uma tendência de aumento com a velocidade de varredura, sugerindo que a transferência de elétrons é dificultada em valores de v mais elevados.

Tabela 4.2: Resultados de corrente e potencial de pico anódico e catódico para voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo composto 70% (grafite, m/m) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} em diferentes velocidades de varredura entre 5 e 200 $mV s^{-1}$

$v / mV s^{-1}$	$I_{pa} / \mu A$	$I_{pc} / \mu A$	E_{pa} / mV	E_{pc} / mV	$\Delta E_p / mV$
5	18,2	-19,1	252	175	77
10	27,3	-26,8	258	169	89
25	42,8	-42,1	258	163	95
50	58,8	-59,3	270	157	113
100	81,2	-81,0	276	151	125
200	109	-109	288	139	149

A corrente de pico para um sistema reversível é descrita pela equação de Randles-Sevcik^{56,57}:

$$I_p = \pm 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (4.1)$$

Na qual, I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração ($mol cm^{-3}$), D é o coeficiente difusional ($cm^2 s^{-1}$) e v é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$). O sinal positivo (+) ou negativo (-) representa os processos de oxidação e redução, respectivamente. De acordo com a Equação 4.1, I_p aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, quando todas as outras condições forem mantidas constantes.

A análise da dependência das correntes de pico anódico (A) e catódico (B), com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Fig. 4.4), indica uma transferência de carga controlada por difusão no eletrodo composto.

Figura 4.4: Dependência das correntes de pico anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura entre, entre 5 e 200 mV s^{-1} , para o eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m) em solução 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} .

4.1.5 Curva analítica para ferricianeto

A fim de observar a dependência da corrente de pico com a concentração da espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, medidas voltamétricas foram realizadas no intervalo de potenciais entre -200 e 650 mV em solução KCl 0,5 mol L^{-1} , para concentrações de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ entre $4,97 \cdot 10^{-5}$ e $1,53 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} , com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Figura 4.5: Curva analítica obtida com eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em KCl 0,5 mol L⁻¹, contendo diferentes concentrações de K₃[Fe(CN)₆]. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O sistema apresentou resposta linear no intervalo de concentrações estudado, obedecendo à Equação 4.2

$$I_{pa} (\mu A) = -0,112 (\mu A) + 1,29 \cdot 10^4 [Fe(CN)_6^{3-}] (\mu A \text{ mol}^{-1} L) \quad (4.2)$$

com coeficiente de correlação linear igual a 0,9999. A resposta linear foi observada, mesmo em um amplo intervalo de potenciais, mostrando que o material eletródico tem potencialidades para aplicações analíticas.

4.2 Intervalo útil de potenciais em diferentes eletrólitos suporte

O desempenho do eletrodo compósito GBS 70% (*m/m*) foi avaliado em diferentes eletrólitos suporte para verificar o intervalo útil de potenciais sob diferentes condições. Os resultados são apresentados na Figura 4.6.

Os diferentes eletrólitos suporte foram H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} pH 1,0; tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,0; tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0; tampão amônio 0,1 mol L^{-1} pH 11,0 e NaOH 0,1 mol L^{-1} pH 13,0. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.3. Para todos os eletrólitos, foram observados baixa corrente residual e estabilidade de resposta entre ciclos sucessivos.

Tabela 4.3: Resultados do estudo dos intervalos úteis de potenciais, em diferentes eletrólitos para o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), para uma corrente máxima de aproximadamente 10 μA

Eletrólito Suporte	Intervalo de potenciais / mV (vs SCE)
H_2SO_4 , 1,0 mol L^{-1}	-500 a +1400
Tampão Acetato pH 4,0	-500 a +1400
Tampão Fosfato pH 7,0	-300 a +1300
Tampão Amônio pH 11,0	-300 a +900
NaOH, 0,1 mol L^{-1}	-300 a +800

A região mais estreita foi encontrada quando o GBS é usado em meio básico, na qual o eletrodo é limitado em ambas regiões anódica e catódica, entre -300 e +800/+900 mV, dependendo do meio. Observações semelhantes foram descritas por Pungor e Szepesváry¹, sugerindo que o compósito é limitado, principalmente na região catódica.

Entretanto, ele continua sendo uma alternativa para o mercúrio, considerando a região anódica, especialmente em meio neutro ou ácido, no qual a região útil é bastante extensa, chegando a 1400 mV (vs. SCE), com ganho também no ramo catódico, chegando a 500 mV (vs. SCE), para uma corrente residual máxima em torno de 10 μ A (Figura 4.6).

Ainda não há uma explicação clara para esta limitação anódica em meio básico, mas pode-se supor que os grupos funcionais presentes no polímero, possam apresentar reações redox, causando aumento na corrente residual ou mesmo favorecendo a descarga do eletrólito suporte.

Estes processos parecem ser pH-dependentes. Estudos desta natureza não haviam sido feitos anteriormente, inclusive por Pungor e seus colaboradores.

Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em: (a) solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0), (b) solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), (c) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), (d) solução tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 11,0), (e) solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 13,0), com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3 Determinação de rutina com o eletrodo compósito GBS

A reação de oxidação dos flavonóides está fortemente relacionada à sua estrutura, que contem diversos grupos fenólicos livres, particularmente grupos hidroxila orto-fenólicos³⁹. De acordo com os voltamogramas cíclicos da rutina em solução tampão BR pH 4,0, apresentados na Figura 4.7, somente um par de picos de oxidação-redução reversível aparece, quando o intervalo de potenciais é variado de 0 a 600 mV.

Os potenciais de pico de oxidação e de redução da rutina são, respectivamente, 410 e 390 mV (vs. SCE), que correspondem à oxidação do substituinte 3',4'-dihidroxi no anel B da rutina e à redução do 3',4'-diquinona, respectivamente. O valor de $\Delta E_p = 21$ mV sugere um processo reversível envolvendo dois elétrons da rutina na superfície do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*)³⁵.

Varrendo-se em potenciais ainda mais anódicos outros processos redox podem ser observados, porém de caráter irreversível³⁹, relacionados à oxidação de outros grupos hidroxila fenólicos, presentes no anel A da estrutura representada a seguir, que é a mesma da Figura 1.1.

Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m) em tampão BR pH 4,0 (a) comparado ao GC (b). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) em solução contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina(—) branco.

4.3.1 Repetibilidade da resposta do GBS

Foi feito um estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m), usando-se solução $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de rutina em tampão BR pH 4,0, no qual 10 voltamogramas cíclicos foram obtidos com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Entre cada medida voltamétrica a superfície do composto foi renovada

por polimento em lixa 600 usada. Neste caso a corrente medida foi $1,09 \pm 0,06 \mu\text{A}$ (média $\pm$ desvio padrão).

4.3.2 Efeito do pH na resposta voltamétrica da rutina

A dependência da oxidação eletroquímica da rutina com o pH foi avaliada usando CV, variando-se o pH do eletrólito suporte de 2 a 8. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.8. Verifica-se um aumento da corrente de pico e um deslocamento dos picos para potenciais mais catódicos com o aumento do pH.

Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ rutina em meio de tampão BR, em diferentes pH. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. No detalhe uma curva de I_{pa} em função do pH.

A maior sensibilidade sugeriria o uso de pH's menores em determinações quantitativas. Entretanto, a repetibilidade é menor neste meio, como pode ser visto

pelas barras de erro na inserção da Figura 4.8. Assim, para obter menor dispersão nos resultados, optou-se por usar o pH 4,0 nas determinações quantitativas.

O deslocamento de potenciais por unidade de pH é aproximadamente -60 mV, que é similar ao comportamento das antraquinonas, e é razoável para a esperada oxidação envolvendo um mesmo número de prótons e elétrons no processo redox. De fato Kang *et al.*³⁵ Bao *et al.*⁵⁸ sugerem a reação reversível com perda de 2 prótons e 2 elétrons do grupo catecol 3'4'- dihidroxil na molécula de rutina, para a forma quinona.

Uma relação linear entre o potencial de pico (E_p) e os valores de pH pode ser observada nos voltamogramas cíclicos para ambos potenciais de pico anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc}). Os resultados são apresentados na Figura 4.9. Esta relação linear pode ser representada pelas equações:

$$E_{pa} \text{ (mV)} = 649 \text{ mV} - 61,0 \text{ pH} \quad (R = 0,999, n = 4) \quad (4.3)$$

$$E_{pc} \text{ (mV)} = 604 \text{ mV} - 56,4 \text{ pH} \quad (R = 0,998, n = 4) \quad (4.4)$$

Figura 4.9: Relação entre o potencial de pico em voltametria cíclica e pH, em solução tampão BR em diferentes valores de pH, contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina.

Isto concorda com a proposta de Ghica e Brett³⁹ para a reação redox da rutina, já comentada acima.

4.3.3 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do compósito 70% (grafite, *m/m*) na oxidação da rutina foi investigado em solução tampão BR pH 4,0 contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito. Os resultados obtidos variando a velocidade de varredura de 10 a 200 mV s^{-1} são apresentados na Figura 4.10.

Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução de rutina $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão BR pH 4,0 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s⁻¹.

Os voltamogramas cíclicos registrados mostram que, com o aumento da velocidade de varredura, ocorre um aumento na intensidade de corrente e um ligeiro deslocamento dos potenciais de pico anódicos e catódicos. Isso sugere que o processo é reversível.

Tabela 4.4: Resultados de corrente e potencial de pico anódico e catódico para voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m) em solução de rutina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1}

$v / \text{mV s}^{-1}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$	E_{pa} / mV	E_{pc} / mV	$\Delta E_p / \text{mV}$
10	0,30	-0,25	404	385	25
25	0,75	-0,58	408	386	22
50	1,13	-0,93	411	390	21
100	1,54	-1,26	409	393	16
200	2,37	-2,04	411	392	19

A análise dos voltamogramas da Figura 4.10 mostra uma dependência linear das correntes de pico anódico (A) e catódico (B) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 4.11), representando que o processo é provavelmente controlado por difusão⁵⁷.

Figura 4.11: Relação linear entre I_{pa} e I_{pc} , com $v^{1/2}$, obtida a partir dos voltamogramas da Figura 4.10.

4.3.4 Avaliação do comportamento do eletrodo composto GBS em DPV para rutina

A CV é considerada uma técnica com potencialidades para investigação de mecanismos, porém com aplicabilidade limitada em determinações quantitativas, devido à corrente residual que a limita em termos de sensibilidade.

Assim, decidiu-se avaliar o comportamento da rutina no eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em DPV. Um voltamograma típico obtido está apresentado na Figura 4.12 para solução de rutina $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão BR, pH 4,0.

Figura 4.12: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução tampão BR pH 4,0 (—), e em solução tampão BR pH 4,0 contendo $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (—). $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.

Pode-se observar que a varredura no sentido anódico apresenta um pico de oxidação para rutina em 382 mV (vs. SCE), sem correspondente no branco.

4.3.4.1 Otimização dos parâmetros

Na DPV, é necessário a otimização de alguns parâmetros, um deles é o valor de amplitude de pulso a ser utilizado. A escolha da amplitude deve ter uma relação com o aumento de sensibilidade e a perda de resolução. Outro parâmetro importante é a velocidade de varredura. Velocidades muito elevadas podem levar a má definição do pico, havendo perda de resolução. Estudos foram realizados com a proposta de obter as melhores intensidades de corrente para rutina em DPV, com boa resolução de pico.

Assim, inicialmente foi feito um estudo variando-se a amplitude de pulso de 10 a 100 mV a fim de avaliar o efeito deste parâmetro sobre a resposta voltamétrica do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), em solução tampão BR pH 4,0 contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de rutina. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.13.

Figura 4.13: Efeito da amplitude de pulso na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução de rutina $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0 utilizando DPV. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Após este estudo, a amplitude de pulso escolhida foi de 50 mV, por apresentar um perfil voltamétrico mais definido, com pico de corrente bem pronunciado.

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) utilizando DPV foi investigado em solução de rutina 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 4,0. Os resultados obtidos variando-se a velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} são apresentados na Figura 4.14. Com o aumento na velocidade de varredura ocorre uma diminuição da corrente de pico. Assim a velocidade escolhida foi de 10 mV s^{-1} por apresentar uma maior intensidade de corrente de pico.

Figura 4.14: Efeito da velocidade de varredura na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), em solução de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de rutina em tampão BR pH 4,0 utilizando DPV, com amplitude de pulso de 50 mV.

4.3.4.2 Curva analítica para rutina com eletrodo compósito GBS

Após a otimização dos parâmetros experimentais para o uso do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em DPV, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude = 50 mV, deu-se início às determinações quantitativas. Medidas voltamétricas foram realizadas em solução tampão BR pH 4,0 com diferentes concentrações de rutina.

A curva analítica foi obtida medindo-se as correntes de pico obtidas de voltamogramas para 13 concentrações diferentes, medidas em triplicata. A curva foi linear no intervalo de concentrações de 0,05 a 0,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear (*R*) de 0,9945 (*n*=7), obedecendo a seguinte equação:

$$I_p \text{ (A)} = -3,54 \cdot 10^{-9} \text{ (A)} + 0,2855 [\text{rutina}] \text{ (A mol}^{-1}\text{L)} \quad (4.5)$$

na qual I_p é a corrente de pico em A e [rutina] é a concentração de rutina em mol L^{-1} .

A curva pode ser observada Figura 4.15.

Acima 0,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresenta-se uma nova região linear entre 0,56 e 0,98 mol L^{-1} , com coeficiente de correlação linear (*R*) de 0,9987 (*n*=5), representada pela equação

$$I_p \text{ (A)} = -8,84 \cdot 10^{-8} \text{ (A)} + 0,453 [\text{rutina}] \text{ (A mol}^{-1}\text{L)} \quad (4.6)$$

Apesar de linear os pontos obtidos nesta região apresentam uma dispersão relativamente maior, que pode ser vista claramente na Figura 4.15. Após esta região a curva deixa de ser linear, apresentando uma saturação dos sítios ativos do eletrodo. Apesar de que o processo não é controlado por adsorção, esta ocorre causando aumento de corrente, caso a superfície do eletrodo não seja regenerado após cada medida.

Figura 4.15: Curva analítica obtida para o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução tampão BR pH 4,0, contendo diferentes concentrações de rutina. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV.

A partir da primeira região linear da curva analítica foi determinado um Limite de detecção (LD) para a rutina de $17,64 \text{ nmol L}^{-1}$. O LD obtido foi calculado como três vezes o desvio padrão do branco (S_d) dividido pelo coeficiente angular da reta (b), conforme a Equação 4.7⁵⁹:

$$\text{LD} = 3 S_d / b \quad (4.7)$$

O limite de quantificação (LQ) encontrado foi de $58,8 \text{ nmol L}^{-1}$, determinado como dez vezes o desvio padrão do branco (S_d) dividido pelo coeficiente angular da reta (b), conforme a Equação 4.8⁵⁹:

$$LD = 10 S_d / b \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Curvas analíticas também foram obtidas utilizando um eletrodo de carbono vítreo para comparação. As condições empregadas foram as mesmas dos experimentos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*).

O intervalo foi linear de 0,24 a 0,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (*R*) de 0,9984 para 6 determinações, obedecendo a equação:

$$I_p (\text{A}) = 17,667 \cdot 10^{-9} (\text{A}) + 0,06163 [\text{rutina}] (\text{A mol}^{-1}\text{L}) \quad (4.9)$$

sendo I_p a corrente de pico em A e [rutina] a concentração de rutina em mol L^{-1} . A curva pode ser observada na Figura 4.16.

Figura 4.16: Curva analítica obtida para o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão BR pH 4,0, contendo diferentes concentrações de rutina. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV.

O LD encontrado foi de $47,7 \text{ nmol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.7. Aproximadamente 3 vezes maior que o medido com GBS, com perfil da curva e intervalo de região linear semelhantes aos descritos para o GBS.

O LQ encontrado foi de 159 nmol L^{-1} , conforme a Equação 4.8. Comparando-se o eletrodo GBS com o carbono vítreo foi observado que GBS apresentou maior sensibilidade e menor LD.

4.3.4.3 Determinação de rutina em formulação farmacêutica

O método da adição de padrão foi utilizado na determinação do teor de rutina no medicamento Novarrutina, usando as condições experimentais otimizadas previamente. Foram realizadas três adições sucessivas de $150 \text{ }\mu\text{L}$ de solução padrão $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução da amostra do comprimido contendo inicialmente $2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina de acordo com o valor do rótulo. A curva de adição de padrão foi obtida em triplicata e pode ser observada na Figura 4.17.

Como método comparativo para a determinação de rutina em comprimidos foi utilizado o método espectrofotométrico, que é o método padrão da AOAC Official Methods⁵⁴. Os resultados obtidos para a determinação de rutina (em triplicata) utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em DPV e o método padrão são apresentados na Tabela 4.5.

Figura 4.17: Curva de adição de padrão de rutina, às amostras de comprimido Novarrutina. Condições descritas na Figura 4.15.

Tabela 4.5: Determinação de rutina em três amostras do medicamento Novarrutina, usando DPV e método espectrofotométrico

Amostra	Rutina (mg/comprimido)		Erro Relativo ^b (%)
	DPV	Espectrofotométrico	
1	28,0	27,0	3,7
2	28,2	27,0	4,4
3	27,0	27,0	0

^a valor rotulado: 20 mg/comprimido.

^b DPV vs. Espectrofotométrico. $[(\text{DPV} - \text{Espectrofotométrico}) / \text{Espectrofotométrico} \times 100\%]$.

Os resultados concordam entre si com intervalo de confiança de 95%, de acordo com o teste t-Student.

4.4 Determinação de propranolol com o eletrodo compósito GBS

O eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) foi usado em CV para investigar o mecanismo de oxidação do propranolol e o resultado obtido foi comparado àquele obtido com eletrodo GC, nas mesmas condições. Como pode ser observado na Figura 4.18.

Figura 4.18: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), em tampão BR pH 7,4. (a) comparado ao GC (b). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (—) em solução contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol (—) branco.

De acordo com os voltamogramas obtidos, o composto apresenta um único processo irreversível, nas condições usadas, com pico de oxidação em torno de 800 mV para o eletrodo compósito GBS e 1000 mV para o eletrodo GC.

Pode se observar uma maior definição do pico para os voltamogramas obtidos com eletrodo compósito GBS, apesar de um aumento da corrente residual. Isto demonstra uma maior atividade superficial para o eletrodo compósito GBS.

O mecanismo de oxidação do propranolol não é descrito na literatura. Porém, Mulla *et al.*⁶⁰ descreveram a oxidação do atenolol com permanganato de potássio, na presença de Ru(III) em meio básico. O atenolol apresenta estrutura semelhante ao propranolol e pertence à mesma classe das substâncias antihipertensivas com ação β -bloqueadora. A equação pode ser representada pelo esquema a seguir:

Por analogia, a oxidação eletroquímica do propranolol poderia ocorrer na amina secundária da cadeia alifática, formando produtos semelhantes. Entretanto, deve-se destacar que a molécula do atenolol contém um grupo acetamida na

posição *para* do anel aromático, que é oxidado a um grupo acético, destacados em vermelho na representação da reação. Este grupo não aparece na molécula do propranolol e, portanto, esta reação não deve ocorrer.

4.4.1 Repetibilidade de resposta do GBS

Foi feito um estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) usando-se solução $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol em tampão BR pH 7,4. Neste estudo 10 voltamogramas cíclicos foram obtidos, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Entre cada medida voltamétrica a superfície do composto foi renovada por polimento em lixa 600 usada. A média das correntes medidas foi $4,5 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{A}$ (média $\pm$ desvio padrão).

4.4.2 Efeito do pH na resposta voltamétrica do propranolol

A dependência da oxidação eletroquímica do propranolol com o pH foi avaliada usando CV, o pH foi variado entre 2 e 9. Os voltamogramas são apresentados na Figura 4.19.

Nota-se que a oxidação do propranolol é extremamente dependente do pH do meio. Em pH 2, 3 e 4 a resposta é muito mal definida e representada por duas ondas voltamétricas. A partir de pH 4 até pH 9 surge um único processo que se desloca para potenciais mais catódicos e com menor corrente de pico até que em $\text{pH} > 9$, não foi observada nenhuma resposta voltamétrica. Sinais dos brancos registrados para cada um destes pH's não apresentaram picos no intervalo investigado.

A atribuição destes picos é difícil, pois como já foi dito, ainda não está claro o mecanismo de oxidação do propranolol.

Optou-se por utilizar o pH 7,4, nas medidas quantitativas, pois é mais próximo do meio fisiológico e há melhor definição do pico de corrente.

Figura 4.19: Efeito do pH na resposta do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m), em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR, com pH variando entre 2 e 9, utilizando voltametria cíclica, com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.4.3 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol em tampão BR pH 7,4, foi avaliado entre 10 e 200 mV s^{-1} , e os resultados estão apresentados na Figura 4.20.

Figura 4.20: Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de propranolol $5,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4 em diferentes velocidades de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1} .

Os voltamogramas cíclicos registrados mostram um aumento na intensidade de corrente de pico anódico, com melhor definição do processo. O deslocamento de pico para potenciais menores com o aumento da velocidade de varredura, observado pode estar associado à adsorção do analito sobre o eletrodo, que poderia ocorrer com maior intensidade sob menores velocidades de varredura, porém sem influência no controle do processo faradáico. Como pode ser observado na Figura 4.21, a análise da dependência da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, indica uma transferência de carga controlada por difusão.

Figura 4.21: Dependência da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura, entre 10 e 200 mV s^{-1} , no eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4

4.4.4 Avaliação do comportamento do eletrodo compósito GBS em DPV para propranolol

O comportamento do eletrodo compósito GBS 70% (grafite, m/m) foi avaliado em DPV, visando a determinação do propranolol. Um voltamograma típico obtido está apresentado na Figura 4.22 para solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4.

Figura 4.22: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m) em solução tampão BR pH 7,4 (—), e em solução tampão BR pH 7,4 contendo $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol (—). $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude 50 mV.

A varredura no sentido anódico apresenta um pico de oxidação do propranolol em 855 mV (vs. SCE), sem correspondente no branco.

4.4.4.1 Otimização dos parâmetros

O efeito da amplitude de pulso sobre a resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m), utilizando DPV também foi investigado em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão BR pH 7,4. Os resultados obtidos variando as amplitudes de pulso de 10 a 100 mV são apresentados na Figura 4.23. Após este estudo optou-se por usar amplitude de pulso de 50 mV, por apresentar um perfil voltamétrico melhor definido, com maior corrente de pico.

Figura 4.23: Efeito da amplitude de pulso na resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4 utilizando DPV. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Também foi realizado um estudo variando-se a velocidade de varredura entre 5 e 25 mV s^{-1} a fim de avaliar o efeito deste parâmetro sobre a resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*), como é apresentado na Figura 4.24.

Figura 4.24: Efeito da velocidade de varredura na resposta do eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m), em solução de propranolol $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,4 utilizando DPV, com amplitude de pulso de 50 mV.

Como pode ser observado, há um aumento na corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura, assim a velocidade escolhida para os outros estudos foi 25 mV s^{-1} , por apresentar a mais alta corrente de pico com definição do perfil voltamétrico.

4.4.4.2 Curva analítica para propranolol com eletrodo composto GBS

Após otimizar as condições experimentais para o eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m) utilizando DPV, foi obtida uma curva analítica para o sistema, adicionando diferentes concentrações de propranolol em tampão BR pH 7,4. O

intervalo de concentração estudado foi de 5,0 a 103,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas voltamétricas foram realizadas com renovação de superfície do eletrodo entre cada determinação.

A curva foi linear no intervalo de 5,0 a 80,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (R) de 0,9997 (n=6), obedecendo a seguinte equação:

$$I_{pa} \text{ (A)} = 6,64 \cdot 10^{-7} \text{ (A)} + 0,0733 [\text{propranolol}] \text{ (A mol}^{-1}\text{L)} \quad (4.10)$$

sendo I_{pa} a corrente de pico em A e [propranolol] a concentração de propranolol em mol L^{-1} . A curva pode ser observada na Figura 4.25, apresentando uma curvatura após a região linear típica de saturação de sítios ativos da superfície do eletrodo.

Figura 4.25: Curva analítica obtida para eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*) em solução tampão BR pH 7,4, contendo diferentes concentrações de propranolol. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.

A partir da curva analítica foi determinado um LD de $1,10 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.7, e o LQ encontrado foi de $3,67 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.8.

Uma curva analítica também foi obtida utilizando um eletrodo GC para comparação. As condições empregadas foram as mesmas dos experimentos com eletrodo composto GBS 70% (grafite, *m/m*).

O intervalo de concentração estudado foi de 5,0 a $103,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva foi linear de 5,0 a $50,74 \mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (*R*) de 0,9977 (*n*=5), obedecendo a equação:

$$I_{pa} (\text{A}) = 6,81 \cdot 10^{-7} (\text{A}) + 0,0453 [\text{propranolol}] (\text{A mol}^{-1}\text{L}) \quad (4.11)$$

na qual I_{pa} é a corrente de pico anódico em A e $[propranolol]$ é a concentração de propranolol em mol L^{-1} . A curva pode ser observada Figura 4.26, que apresenta perfil semelhante ao observado no eletrodo compósito.

O LD encontrado foi de $4,27 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.7. Aproximadamente 4 vezes maior que o medido com GBS, além de uma região linear mais curta.

O LQ encontrado foi de $14,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.8.

Comparando-se o eletrodo GBS com o carbono vítreo foi observado que GBS apresentou maior sensibilidade e menor LD.

Figura 4.26: Curva analítica obtida para eletrodo GC em solução tampão BR pH 7,4, contendo diferentes concentrações de propranolol. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de 50 mV.

4.4.4.3 Determinação de propranolol em formulação farmacêutica

O método da adição de padrão foi utilizado na determinação do teor de propranolol no medicamento Propranolol Ayerst®, usando as condições experimentais otimizadas previamente. Foram realizadas adições sucessivas de 350, 250, 200 μL de solução padrão $6,69 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de propranolol em solução da amostra do comprimido contendo inicialmente $2,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de acordo com o valor do rótulo. A curva de adição de padrão foi obtida em triplicata e pode ser observada na Figura 4.27.

Figura 4.27: Curva de adição de propranolol, às amostra de comprimido Propranolol Ayerst®. Condições descritas na Figura 4.25.

Como método comparativo para a determinação de propranolol em comprimidos foi utilizado o método espectrofotométrico, que é o método padrão da farmacopéia americana (USP XXI). Os resultados obtidos para a determinação de propranolol (em triplicata), utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) em DPV e o método padrão são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Determinação de propranolol em três amostras do medicamento Propranolol Ayerst®, usando DPV e método espectrofotométrico

Amostra	Propranolol (mg/comprimido)		Erro Relativo ^b (%)
	DPV	Espectrofotométrico	
1	44,6	46,0	-3,0
2	45,9	45,6	0,65
3	45,2	45,4	-0,44

^a valor rotulado: 40 mg/comprimido.

^b DPV vs. Espectrofotométrico [(DPV – Espectrofotométrico) / Espectrofotométrico × 100%].

Os resultados concordam entre si com intervalo de confiança de 95%, de acordo com o teste t-Student.

4.4.4.4 Estudo de interferente

Um estudo de interferentes foi realizado para avaliar o efeito do diurético hidroclorotiazida, um composto que costuma ser usado em conjunto com o propranolol em formulações de antihipertensivo, na resposta voltamétrica do propranolol.

Experimentos em DPV foram feitos para solução 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de propranolol na presença de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroclorotiazida (Fig. 4.28). Foi observada

interferência, com uma diminuição do pico referente ao propranolol e surgimento de um pico de oxidação do interferente em 800 mV. Entretanto, o procedimento de adição de padrão poderia ser usado para eliminar o efeito.

Figura 4.28: Efeito das concentrações crescentes de hidroclorotiazida, na resposta do propranolol no eletrodo composto GBS 70% (grafite, m/m), usando DPV. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso 50 mV.

4.5 Resumo dos resultados obtidos com eletrodos GC e compósito GBS 70% (grafite, m/m) utilizando DPV

A Tabela 4.7 apresenta um resumo da resposta linear, dos limites de detecção e sensibilidade obtidos com eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), comparando-os com aqueles obtidos com eletrodo GC.

Tabela 4.7: Resultados obtidos para diferentes analitos com eletrodos compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) e GC utilizando DPV

Analito	Eletrodo	Resposta Linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade / $\text{A mol}^{-1} \text{L}$
Rutina	GBS	0,05 a 0,56	0,017	0,285
	GC	0,25 a 0,82	0,046	0,062
Propranolol	GBS	5,0 a 80,6	1,1	0,073
	GC	5,0 a 49,7	4,3	0,045

Dos resultados apresentados pode-se observar que o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*), apresentou melhor desempenho que o GC, apesar dos problemas de adsorção. Limites de detecção da ordem de nmol L^{-1} puderam ser obtidos para a rutina.

Malagutti *et al.*³⁸ descreveram limites de detecção menores que os aqui observados para rutina, usando um eletrodo compósito GPU. Entretanto, naquele trabalho os autores usaram voltametria de onda quadrada.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos permitem concluir que os eletrodos compósitos GBS 70% (grafite, *m/m*), utilizados neste trabalho, são uma alternativa promissora como material eletródico. Eles apresentam facilidade de construção, baixo custo, sensibilidade e facilidade de renovação de superfície.
- ✓ Foi necessário a renovação da superfície entre as medidas, tanto para rutina quanto para propranolol, sugerindo processos de adsorção no eletrodo, porém a repetibilidade obtida entre cada renovação foi aceitável.
- ✓ Em todos os casos o eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) apresentou sensibilidades maiores do que aquelas obtidas com eletrodo de carbono vítreo, talvez pela sua maior área superficial ativa.
- ✓ Nos estudos voltamétricos com rutina utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) foi obtido um limite de detecção de 17 nmol L^{-1} , três vezes menor que o obtido com eletrodo de carbono vítreo. Foi possível a determinação de rutina no medicamento Novarrutiva com resultados concordantes com o método comparativo.
- ✓ Nos estudos voltamétricos com o propranolol utilizando eletrodo compósito GBS 70% (grafite, *m/m*) foi obtido um limite de detecção de $1,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, três vezes menor que o obtido com eletrodo de carbono vítreo. Foi possível a determinação no medicamento Propranolol Ayerst® com resultados concordantes com o método comparativo.

- ✓ O eletrodo compósito GBS apresentou resposta voltamétrica com baixa corrente residual, em intervalo de potenciais, que depende do pH do meio. Em meio ácido e neutro foi possível obter resultados satisfatórios em amplo intervalo de potenciais. Já em meio básico, há forte limitação anódica e catódica para este compósito.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- PUNGOR, E.; SZEPESVÁRY, É. Voltammetric studies with silicone rubber-based graphite electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 43, p. 289-296, 1968.
- 2- KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W.R. **Laboratory techniques in Electroanalytical Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 986.
- 3- TALLMAN, D.E.; PETERSEN, S.L. Composite electrodes for electroanalysis- principles and applications. **Electroanalysis**, v. 2, p. 499-510, 1990.
- 4- KALCHER, K.; KAUFFMAN, J.M.; WANG, J.; SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electroanalytical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v. 7, n. 1, p. 5-22, 1995.
- 5- ADAMS, R.N. Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.
- 6- OLIVEIRA, A.C. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos a base de grafite e borracha de silicone**. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- 7- CÉSPEDES, F.; MARTINEZ-FÁBREGAS, E; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 296-304, 1996.
- 8- SILICONES. Disponível em :<<http://www.abiquim.org.br/setorial/silicones.asp>> Acesso em: 15 mar.2005.
- 9- MASCINI, M.; PALLOZZI, F.; LIBERTI, A. A polythene graphite electrode for voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v.43, p. 126-131, 1973.
- 10- KLATT, L. N.; CONNEL, D.R.; ADAMS, R.E. Voltammetric characterization of a graphite-teflon electrode. **Analytical Chemistry**, v.47, p. 2470-2472, 1975.
- 11- SWOFFORD, H.S.; CARMAN, R.L. Voltammetric applications of rotating and stationary carbon-epoxy electrodes. **Analytical Chemistry**, v.38, p. 966-969, 1966.
- 12- WANG, J.; NASER, N. Modified carbon-wax composite electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, p. 253-259, 1995.
- 13- STULÍK, K.; PACÁKOVA, V.; STÁRTOVA, B. Carbon paste for voltammetric detectors in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 213, p. 41-46, 1981.
- 14- GARCIA, M.F.G.; FARIAS, S.B. e FERREIRA, B.G. Determinação quantitativa da concentração de silicone em antiespumantes por espectroscopia FT-IR/ATR e calibração multivariada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 5, p. 322-325, 2004.
- 15- PUNGOR, E.; SZEPESVÁRY, É.; HAVAS, J. Voltammetric studies on grafite impregnated silicone rubber electrodes. **Analytical Letters**, v.1, n. 4, p. 213-220, 1968.
- 16- PUNGOR, E.; FEHER, Z.; NAGY, G. Voltammetric determination of some drugs using silicone rubber-based graphite electrodes. **Magyar Kemiai Folyoirat**, v. 77, n.6-7, p. 298-302, 1971.

- 17- PUNGOR, E.; NAGY, G.; FEHER, Z. Use of silicone rubber-based graphite in flowing media. II. Voltammetric determination of electroactive materials injected into a flowing supporting electrolyte. **Magyar Kemiai Folyóirat**, v. 77, n. 6-7, p. 294-298, 1971.
- 18- FEHÉR, Z.; NAGY, G.; TÓTH, K.; PUNGOR, E. The use of precipitate based silicone rubber ion-selective electrodes and silicone rubber-based graphite voltametric electrodes in continuous analysis. **Analyst**, v. 99, p. 699-708, 1974.
- 19- Z. NIEGREISZ, G. HORVAI, K. TOTH; E. PUNGOR, Silicone rubber wall-jet electrode in hydrodynamic voltammetry. (Comparison of various carbon electrodes). **Symposia Biologica Hungarica**, v. 31, p. 83-95, 1986.
- 20- SZEPESVÁRY, E. R.; PUNGOR, E. Potentiometric titration of acids and bases with a silicone rubber-graphite electrode. **Magyar Kemiai Folyóirat**, v. 77, n. 10, p. 502-507, 1971.
- 21- SZEPESVÁRY, E.; PUNGOR, E. Potentiometric titration of acids and bases with a silicone rubber-graphite electrode as indicator electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 54, n. 2, p. 199-206, 1971.
- 22- SZEPESVÁRY, E. R.; PUNGOR, E. Potentiometric titration of acids and bases using a silicone rubber-graphite electrode. **Analytical Letters**, v. 3, n. 12, p. 603-611, 1970.
- 23- KAZARJAN, N.A.; PUNGOR, E. The behavior of ion-selective silicone rubber membrane electrodes in some non-aqueous solvent. **Analytica Chimica Acta**, v. 51, p. 213-220, 1970.
- 24- SISKÁ, E. Amperometric and nonzero current potentiometric determination of silver, mercury(II), palladium(II), and iodine. **Hungarian Scientific Instruments**, v. 33, p. 13-17, 1975.
- 25- EL-TARAS, M. F.; PUNGOR, E.; NAGY, G. The influence of some organic complexing agents on the potential of copper(II)-selective electrodes. Application of the silicone rubber-based electrode to the determination of citrate ion and 8-hydroxyquinoline. **Analytica Chimica Acta**, v. 82, n. 2, p. 285-292, 1976.
- 26- PASTOR, T. J.; PASTOR, M.M.; SIMONOVIC, Z.; SZEPESVÁRY, E. Behavior of membrane graphite electrodes in potentiometric titration of reducing substances with bromine in acetic acid. **Talanta**, v. 29, n. 6, p. 521-524, 1982.
- 27- REICHART, E.; OBENDORF, D. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 360, n. 1-3, p. 179-187, 1998.
- 28- COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- 29- OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LOPES, R.M.; MORAES, G.H.K.; FERREIRA JUNIOR, D.B.; SILVA, R.R.; MAIA, J.R.S. Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas. **RBAC**, v. 36, n. 4, p. 213-215, 1986.
- 30- LIN, F.S.D.; WARNER, C.R.; DANIELS, D.H.; JOE, F.L.; FAZIO, T. Fate of antioxidants and antioxidant-derived products in deep-fat frying and cookie baking. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 1986.

- 31- FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 834-838, 1998.
- 32- ZOULIS, N.E.; EFSTATHIOU, C.E. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, v. 320, n. 2-3, p. 255-261, 1996.
- 33-BARBATIMÃO da folha miúda. Disponível em:
<<http://inventabrasilnet.t5.com.br/bartim.htm>> acesso em mai.2005.
- 34- VOLIKAKIS, G.J.; EFSTATHIOU, C.E. Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes. **Talanta**, v. 51, n. 4, p. 775-785, 2000.
- 35- KANG, J.W.; LU, X.Q.; ZENG, H.J.; LIU, H.D.; LU, B.Q. Investigation on the electrochemistry of rutin and its analytical application. **Analytical Letters**, v. 35, n. 4, p. 677-686, 2002.
- 36- SONG, G.F.; HE, P.; GUO, W. Study on the polarographic catalytic wave of vitamin P in the presence of persulfate and its application. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 2, p. 212-219, 2002.
- 37- YANG, Y. Voltammetric behavior of rutin on glassy carbon electrode and its determination. **Fenxi Huaxue**, v. 24, n. 11, p. 1277-1290, 1996.
- 38- MALAGUTTI, A.R.; ZUIN, V.G.; CAVALHEIRO, E.T.G.; MAZO, L.H. Determination of rutin in green tea infusions using Square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite. **Electroanalysis**, v. 18, n. 10, p. 1028-1034, 2006.
- 39- GHICA, M.A.; BRETT, A.M.O. Electrochemical oxidation of rutin, **Electroanalysis**, v. 17, n. 4, p. 313-318, 2005.
- 40- GOMES, A.; COSTA, D.; LIMA, J.L.F.; FERNANDES, E. Antioxydant activity of β -blockers: An effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 4568-4577, 2006.
- 41- MADY, C.; SALEMI, V.M.C. Bloqueadores β -adrenérgicos no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade Cardiologista do Estado de São Paulo**, v. 7. n. 2, p. 200-206, 1997.
- 42- BERTRAM, G.K.; SILVA, P. **Farmacologia**: básica e clínica. Tradução de Fernando Diniz Mundim e Patrícia Josephine Voeux. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 854 p.
- 43- AL-ATTAS, A.S. Utility of redox reaction for spectrophotometric determination of propranolol and isoxsuprine hydrochlorides in pure and dosage forms. **Asian Journal of Chemistry**, v.18, n. 4, p. 3003-3039, 2006.
- 44- EL-EMAM, A.A.; BELAL, F.; FATHALLA, M.; MOUSTAFA, M.A.; EL-ASHRY, S.M.; EL-SHERBINY, D.T.; DINA, T.; HANSEN, S.H. Spectrophotometric determination of propranolol in formulations via oxidative coupling with 3-methylbenzothiazoline-2-one hydrazone. **Farmaco**, v. 58, n. 11, p. 1179-1186, 2003.
- 45- RAO, Z.; WU, Q.; XIE, G.; XU, H.; ZHANG, X. Determination of propranolol hydrochloride by flow injection chemiluminescence. **Fenxi Huaxue**, v. 32, n. 12, p. 116-1662, 2004.

- 46- MA, C. Determination of propranolol hydrochloride tablets by HPLC. **Zhongguo Yaoshi**, v. 8, n. 8, p. 637-638, 2005.
- 47- ZHAO, L.; ZHONG, G.; HUANG, M. LC/MS/MS determination of propranolol and its metabolites 4-hydroxypropranolol and N-desisopropylpropranolol in rat plasma. **Yahwu fenxi Zazhi**, v. 15, n. 10, p. 11203-1206, 2005.
- 48- BELAL, F.; AL-DEEB, O.A.; AL-MAJED, A.A.; GAD-KARIEM, E.A.R. Voltammetric determination of N-nitrosaderivates of atenolol and propranolol uin simulated gastric juice. **Farmaco**, v. 54, n. 10, p. 700-704, 1999.
- 49- GHONEIM, M.M.; BELTAGI, A.; RADI, A. Indirect determination of propranolol by cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Quimica Analitica**, v. 20, n. 4, p. 237-241, 2002.
- 50- EL-RIES, M.A.; ABOU-SEKKINA; M.M.; WASSEL, A.A. Polarographic determination of propranolol in pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 837-842, 2002.
- 51- RADI, A.; WASSEL, A.A.; EL-RIES, M.A. Adsorptive behavior and voltammetric analysis of propranolol at carbon paste electrode. **Chemia Analityczna**, v. 49, n. 1, p. 51-58, 2004.
- 52- AMBROSI, A.; ANTIOCHIA, R.; CAMPANELLA, L.; DRAGONE, R.; LAVAGNINI, I. Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 219-225, 2005.
- 53- CAMPANELLA, L.; AMBROSI, A.; BELLANTI, F.; TOMASSETTI, M. Comparisson between voltammetric and spectrophotometric methods for drug analysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 229-241, 2006.
- 54- RUTIN in Drugs. In: CUNNIF, P. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1, p. 29.
- 55- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 16 ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 1984. p. 908
- 56- KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W.R. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702-706, 1983.
- 57- BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A. **Electroquímica**. Coimbra: Oxford University Press. 1996.
- 58- BAO, X.; ZHU, Z.; LI, N.; CHEN, J. Electrochemical studies of rutin interacting with hemoglobin and determination of hemoglobin. **Talanta**, v.54, p. 591-596, 2001.
- 59- LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of deteccion. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 712A-724A, 1983.
- 60- MULLA, R.M.; HIREMATH, G.C.; NANDIBEWOOR, S.T. Kinetic, mechanistic and spectral investigation of ruthenium (III) – catalysed oxidation at atenolol by alkaline permanganate (stopped-flow technique). **Journal of Chemical Science**, v. 117, p. 33-42, 2005.