UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Abigail Vasconcelos Pereira

“Aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana modificados com polímeros com impressão molecular, na determinação de ácido fólico e diclofenaco”

São Carlos
2015

Abigail Vasconcelos Pereira

“Aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana modificados com polímeros com impressão molecular, na determinação de ácido fólico e diclofenaco”

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

DEDICATÓRIA

À Santíssima Trindade,
Aos meus Pais, Fátima e Edmundo,
Aos meus sogros, Onísia e Sudá,
Ao meu esposo, Onias,
À minha amada filha, Rebeca,

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tenho e o que sou.

Aos meus pais pelo apoio, amor e carinho incondicionais e incomparáveis.

Aos meus irmãos, pelo carinho, afeto e saudade que só eles têm.

Ao meu esposo, Onias, sempre presente em todos os momentos alegres e difíceis desta caminhada com sua cumplicidade, confiança, paciência e companheirismo.

À minha filha, Rebeca, pelo seu amor incondicional, amizade e confiança, pelos momentos alegres que passei e passo ao seu lado e pelas horas difíceis que enfrentamos e vencemos, e que me fizeram amadurecer bastante.

Aos meus sogros Sudá e Onísia e minha cunhada, irmã do coração, Sudanísia, pela ajuda, apoio e incentivo, além da amizade e do amor que ganhei ao conhecê-los.

Ao Prof. Éder pela excelente orientação, experiência de um educador e pesquisador com conselhos importantíssimos para o andamento do trabalho, pela amizade, paciência e pelo apoio desde o nosso primeiro contato,

À Priscila, madrinha e amiga, pela sua amizade e paciência, sinceridade, força e luz ao longo desta pesquisa.

À Thalita, Ana Paula, Adriana, Amanda, Arley, Aline, Beatriz, Carol, Sidney, Eliene, Fernanda, Fellipy, Gabriela, Hellen, Janaína, Lídia, Luiz, Marli, Marco, Pedro, Renata, Rita, Roberta, Salvador, Toninho, Narcísio, Felipe e Caio pela amizade e partilha dos momentos alegres e tristes.

Aos demais professores do IQSC/USP, em especial aos do LATEQS e GQATP que sempre deram contribuições importantes para o projeto.

Às técnicas, Priscila Cervini Assumpção e Ana Paula Garcia Ferreira e aos Técnicos Antonio José Reimer (Toninho) e Salvador Claro Neto (Sasá) por toda a ajuda e paciência nos momentos complicados.

À equipe do CAQI, da oficina mecânica e de vidraria pelo apoio.

Aos casais Victor e Maritza, Edilson e Fernanda, Gustavo e Maria José, Thalita e João, Cida e Claudio pela amizade e apoio. Ao Dr. André Luiz Giusti e a Juçaíra Giusti por toda a dedicação com a saúde da minha filha.

Ao CNPq pelo apoio financeiro (149470/2010-0).

RESUMO

Aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana modificados com polímeros com impressão molecular na determinação de ácido fólico e diclofenaco

Neste trabalho foram preparados eletrodos compósitos grafite-poliuretana modificados com polímeros metacrilatos com impressão molecular (EGPU-MIP) visando a determinação de ácido fólico (FA) e forma ácida do diclofenaco (DCF), os quais foram usados como moléculas molde. O objetivo principal era avaliar o desempenho dos MIPs em relação à seletividade e sensibilidade, além da inovação em relação ao uso dos compósitos como material de eletrodo, relativamente a esses analitos. No caso do FA, os MIP foram preparados com essa molécula, relativamente grande e contendo vários grupos funcionais, para avaliar o efeito dessas características no desempenho do sensor. Inicialmente foram feitos estudos exploratórios usando voltametria cíclica (CV), nos quais o FA apresentou pico irreversível de oxidação em +0,80 V (*vs.* SCE) e picos reversíveis de redução em -0,40 e -0,65 V (*vs.* SCE), com respectivos processos de oxidação em -0,33 e -0,49 V (*vs.* SCE). Foi desenvolvido um procedimento analítico para determinação do fármaco usando voltametria de pulso diferencial (DPV), após otimizar parâmetros tais como composição de MIP no sensor de (2,5%, *m/m*), amplitude de pulso ($a = 50$ mV), velocidade de varredura ($v = 10$ mV s⁻¹) e meio eletrolítico (tampão acetato, pH = 4,5). Nesse procedimento, determinou-se uma mesma região linear de resposta entre 0,6 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os dois picos de redução em -0,52 e -0,58 V (*vs.* SCE), com limites de detecção (LOD) de 0,17 e de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O pico em -0,58 V mostrou-se mais sensível e foi escolhido para determinar o FA nas formulações farmacêuticas Folacin®, Afopic® e Folifolim®, com resultados concordantes com o método oficial baseado na Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em 95% de confiança, segundo o teste *t*-Student. O MIP-FA mostrou-se mais seletivo que o polímero sem impressão molecular (NIP-DCF) frente às interferências do metotrexato (MTX), porém o ácido ascórbico (AA), ácido úrico (UA) e dopamina (DA) mostraram interferências, em relação aos grupos funcionais presentes nessas espécies, com forte influência da rigidez estrutural e da mobilidade rotacional de tais grupos. Outro MIP foi sintetizado com impressão para DCF. A voltametria cíclica mostrou que o DCF apresenta pico irreversível de oxidação em +0,83 V (*vs.* SCE), na primeira varredura e picos reversíveis de redução em +0,40 e +0,65 V (*vs.* SCE), a partir da segunda varredura, com respectivos processos de oxidação em +0,27 e +0,58 V (*vs.* SCE). Foi desenvolvido um procedimento analítico para determinação do fármaco em formulações comerciais, usando DPADSV, após otimização dos parâmetros tais como composição de MIP no sensor (2,5%, *m/m*), tempo de acumulação (300 s) e potencial de pré-concentração (+0,2 V), $a = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹ em ácido perclórico pH condicional ($\text{pH}_{\text{cond}} = 1,6$), com uma região linear entre 0,010 e 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOD de 0,99 nmol L⁻¹ para o pico anódico em +0,8 V (*vs.* SCE). O DCF foi determinado nas formulações farmacêuticas Biofenac®, Medley® e Voltaren® e em urina sintética. O MIP-DCF se mostrou relativamente seletivo ao sinal do DCF, mesmo na presença dos interferentes como ácido meclofenâmico (AMCFN) e ácido mefenâmico (AMFN), os quais apresentam grande semelhança estrutural e funcional em relação ao analito. Deve-se tomar cuidado ao estender o intervalo de potencial operacional para o GPU, neste meio de ácido perclórico, para evitar ativação de grupos funcionais do grafite e/ou da PU.

ABSTRACT

Application of graphite-polyurethane composite electrodes modified with molecularly imprinted polymers in the determination of folic acid and diclofenac

In this work methacrylate molecularly imprinted polymers (MIP) were prepared using folic acid (FA) as well as diclofenac (DCF) templates. These MIPs were used in the modification of graphite-polyurethane (GPU) composites in order to evaluate the performance of the resulting electrodes in the determination of the templates in pharmaceutical formulations and to estimate the sensitivity and selectivity of the resulting devices joined to the innovation of using the composites in such development regarding these analytes. In the case of FA, MIPs were prepared with this relatively large and containing multiple functional groups, to evaluate the effect of such characteristics in the performance of the sensor. First of all exploratory experiments were performed using cyclic voltammetry (CV) in which the FA presented an irreversible oxidation peak at + 0.80 V (*vs.* SCE) and reversible reductions peaks at -0.40 and -0.65 V (*vs.* SCE) with respective oxidation at -0.33 and -0.49 V (*vs.* SCE). An analytical procedure was developed based on differential pulse voltammetry (DPV), after optimizing parameters such as MIP composition in the sensor (2.5%, *m/m*), pulse amplitude ($a = 50$ mV), scan rate ($v = 10$ mV s⁻¹) and supporting electrolyte (acetate, pH = 4.5). In such procedure was obtained a linear dynamic range from 0.6 to 2.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for both DPV reduction peaks at -0.52 and -0.58 V (*vs.* SCE), with limit of detection (LOD) of 0.17 and 0.03 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. As the second one was more sensitive it was chosen for the determination of FA in the commercial pharmaceutical formulation Folacin®, Afopic® and Folifolim®, with results that agreed with those from the official HPLC procedure within 95% confidence level according to the *t*-Student test. The MIP-FA was more selective than the non-imprinted polymer (NIP-DCF) in relation to the interference of metotrexate (MTX), however ascorbic acid (AA), uric acid (UA) and dopamine (DA) revealed significant interferences regarding the functional groups present in these species, with strong influence from the structural rigidity of the molecule that plays an important role in the rotational mobility of these groups. Another MIP was synthesized with DCF as a template. Cyclic voltammetry demonstrated that the DCF presented a single irreversible oxidation peak at + 0.83 V (*vs.* SCE) in the first scan, and two reversible reduction peaks at +0.40 and +0.65 V (*vs.* SCE) with respective oxidation at +0.27 and +0.58 V (*vs.* SCE), from the second scan. A DPADSV procedure was also developed for the determination of DCF in commercial formulations after optimizing some experimental parameters such as MIP composition in the sensor (2.5%, *m/m*), accumulation time (300 s) and potential (+0.2 V), $a = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹ and supporting electrolyte (perchloric acid pH_{cond} = 1.6). A linear dynamic range from 0.010 to 0.20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a LOD of 0.99 nmol L⁻¹ were observed for the anodic peak at +0.8 V (*vs.* SCE). Then the DCF was determined in the commercial formulations Biofenac®, Medley® and Voltaren® and also in synthetic urine samples. The MIP-DCF sensor showed to be selective regarding the DCF signal even in the presence of meclophenamic acid (AMCFN) and mefenamic acid (AMFN), which present structural and functional similarity when compared with the analyte. Care must be taken when using the GPU in extreme potential windows in the perchloric acid medium, to avoid activation of functional groups in the polymer.

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a – Amplitude de Pulso

AAc – Ácido Acrílico

AC – Cloreto de Acriloíla

ACN – Acetonitrila

AMCFN – Ácido Meclofenâmico

AMFN – Ácido Mefenâmico

Ag / AgCl – Prata / Cloreto de Prata

AIBN - Azobis-(isobutironitrila)

BC – Cloreto de Benzoíla

BET - Braunaer-Emmett-Teller

C – Concentração Molar

C_{DCF} – Concentração da forma ácida do Diclofenaco

C_{FA} – Concentração do Ácido Fólico

CPE – Eletrodo de Pasta de Carbono

CV – Voltametria Cíclica

DCF – Forma ácida do Diclofenaco

DMF – Dimetilformamida

DPAdASV - Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Pulso Diferencial

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial

E₁^a – Erro dos resultados obtidos em DPV vs. Rotulado

E₂^b – Erro dos resultados obtidos em HPLC vs. Rotulado

E₃^c – Erro dos resultados obtidos em DPV vs. HPLC

EGDMA - Dimetacrilato de Etilenoglicol

EGPU – Eletrodo de grafite e poliuretana

EGPU-MIP-FA - Eletrodo de grafite e poliuretana modificado com polímero com Impressão Molecular para ácido fólico

EGPU-MIP-DCF - Eletrodo de grafite e poliuretana modificado com polímero com Impressão Molecular para diclofenaco

EGPU-NIP - Eletrodo de grafite e poliuretana modificado com polímero sem Impressão Molecular

E_{acc} – Potencial de pré-concentração

E_{pa} – Potencial do Pico Anódico

E_{pc} – Potencial do Pico Catódico

FA – Ácido Fólico

GC – Eletrodo de carbono vítreo

GPU – Grafite e Poliuretana

HQ – Hidroquinona

I_p – Corrente de pico

LOD – Limite de Detecção

MAA – Ácido Metacrílico

MEL – Melanina

MIP – Polímero com Impressão Molecular

MIP-FA - Polímero com Impressão Molecular para ácido fólico

MIP-DCF - Polímero com Impressão Molecular para diclofenaco

MTX – Metotrexato

n – número de medidas

NIP – Polímero sem Impressão Molecular

NIP-FA– Polímero sem Impressão Molecular para ácido fólico

NIP-DCF– Polímero sem Impressão Molecular para diclofenaco

R – Coeficiente de Correlação

SCE – Eletrodo de Calomelano Saturado (do inglês, saturated calomel electrode)

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

SPE – Extração em Fase Sólida

TAT - 2,4,6-trisacrilamida-1,3,5-triazina

TEA - Trietanolamina

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

v – Velocidade de Varredura de potencial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido fólico.	24
Figura 2 - Fórmula estrutural do diclofenaco de sódio.....	26
Figura 3 - O esquema representativo da impressão molecular e posterior remoção do FA no MIP e sua inserção no eletrodo compósito GPU.....	42
Figura 4 - Imagens de SEM do MIP-FA (a, c, e) e do NIP-FA (b, d, f) com ampliações de 250x, 5.000x e 200.000x, respectivamente.....	43
Figura 5 - Imagens bidimensionais do TEM do (a) MIP-FA com ampliação de 31000x e (b) NIP-FA com ampliação de 175000x e suas respectivas imagens tridimensionais criadas de um programa de tratamento de dados (c) MIP-FA e (d) NIP-FA apresentadas nas cores verde (plano de fundo), azul claro, azul escuro, rosa, vermelho, laranja e amarelo (mais longe do plano).....	45
Figura 6 - Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L ⁻¹ em solução de fosfato pH 7,8 com velocidade de varredura de potencial $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando os eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (m/m) de MIP e o eletrodo GPU sem modificação.	47
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L ⁻¹ em solução fosfato pH 7,8, com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando os eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5; 5; 7,5 e 10% (m/m) de MIP e o eletrodo GPU sem modificação.	49
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão acetato (pH 4,5), com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando o eletrodo EGPU não modificado e os eletrodos modificados com 2,5, 5,0 e 7,5% (m/m) de MIP-FA.	49
Figura 9 - Mecanismo de oxidação biológica do FA.....	51
Figura 10 - Comportamento eletroquímico do FA.	52
Figura 11 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em (a) solução fosfato pH 4,2 e (b) tampão acetato pH 4,5 dos eletrodos modificados com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (m/m) de MIP, em amplitude de 25 mV e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	54
Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução fosfato com eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5% (m/m) de MIP, com $a = 25 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes valores de pH.....	55

Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução fosfato pH 4,2 e tampão acetato pH 4,5 com eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5% (m/m) de MIP, com amplitude de 25 mV e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	56
Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA em concentrações entre 0,1 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato pH 4,5, $a = 50 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, para os eletrodos: (a) EGPU, (b) EGPU-2,5MIP-FA e (c) EGPU-2,5NIP-FA.....	58
Figura 15- Curvas analíticas para o eletrodo EGPU, EGPU-2,5MIP-FA e EGPU-2,5NIP-FA, usando o pico em (a) -0,52 V (vs. SCE) e (b) -0,58 V (vs. SCE).....	59
Figura 16—Fórmula estrutural do (a) FA, (b) MTX, (c) AA, (d) DA e (e) UA	64
Figura 17 -Micrografias de SEM para o MIP-DCF (a, c, e) e para o NIP-DCF (b, d, f), com ampliações de 250x, 5.000x e 200.000x, respectivamente.....	67
Figura 18 - Imagens bidimensionais do TEM do (a) MIP-DCF com ampliação de 31000x e (b) NIP-DCF com ampliação de 175000x e suas respectivas imagens tridimensionais criadas por um programa de tratamento de dados (c) MIP-DCF e (d) NIP-DCF apresentadas nas cores verde (plano de fundo), azul claro, azul escuro, rosa, vermelho, laranja e amarelo (mais longe do plano).....	68
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos em solução ácido perclórico 25 mmol L^{-1} , $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$, com 10% de ACN (v/v), com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando GC, EGPU e EGPU-2,5MIP-DCF (a) sem analito e (b) com DCF $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$	72
Figura 19 - Mecanismo de oxidação do DCF segundo Razmi e colaboradores (127).	74
Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial para DCF $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando (a) GC e (b) EGPU-2,5MIP-DCF em solução ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), com $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$	76
Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DCF $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de solução fosfato pH 7 com 10% de ACN (v/v) com eletrodos EGPU-2,5MIP-DCF, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	77
Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial da (a) primeira e (b) segunda varredura obtidos para DCF $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de solução fosfato pH 7 com 10% de ACN (v/v), com EGPU sem modificação e modificados com 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10% (m/m) de MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 24 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DCF $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (a) ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), e em solução fosfato	

em pH (b) 2,5; (c) 3,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 e (g) 7,0 com 10% de ACN (v/v), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	83
Figura 25 - Voltamogramas de pulso diferencial da (a) primeira e (b) segunda varredura obtidos para DCF $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em (preto) solução fosfato pH 2,5 com 10% de ACN (v/v) e em (vermelho) ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ...	84
Figura 26- Voltamogramas de DPAdASV com DCF $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), com tempo de acumulação de 60 segundos para diferentes valores de potencial de acumulação, utilizando EGPU-2,5MIP-DCF.....	85
Figura 27 - (a) Voltamogramas de DPAdASV com DCF $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), para diferentes tempos de acumulação, utilizando EGPU-2,5MIP-DCF e $E = 0,2 \text{ V}$, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e (b) relação da corrente de pico I_{DCF} com o tempo de pré-concentração.	87
Figura 28- Voltamogramas de de DPAdASV com redissolução anódica para EGPU-2,5MIP-DCF, $t = 300\text{s}$, $E = 0,2 \text{ V}$ (vs. SCE) em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), com $a = 50\text{mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	87
Figura 29 - Voltamogramas de DPAdASV com CDCF entre 0,01 e $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, tempo de acumulação de 300s e $E_{\text{acc}} = 0,2 \text{ V}$ (vs. SCE) em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1.6 com 10% de ACN (v/v), com $a = 50\text{mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	89
Figura 30 - Curvas analíticas obtidas à partir dos voltamogramas da Figura 21, para DCF, utilizando-se o EGPU, EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF.	91
Figura 31 - Resultados da determinação de 100 nmol L^{-1} DCF em amostra farmacêutica de (a) Biofenac ® , (c) Medley ® e (e) Voltaren ® em condições otimizadas (Tabela 20) e as curvas de adição de padrão para DCF em (b) Biofenac ® , (d) Medley ® e (f) Voltaren ® . Voltamogramas de DPAdASV em meio de ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH _{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), obtidos com EGPU-2,5MIP-DCF.....	93
Figura 32 - (a) Voltamogramas de DPADASV em urina sintética, utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF, na determinação de 100 nmol L^{-1} DCF. (b) Curva de adição de padrão para DCF sob condições otimizadas anteriormente.	95
Figura 33 - Estrutura química do (a) DCF, (b) AMCFN e (c) AMFN.....	96

- Figura 34 - Voltamogramas de DPAdASV para 150 nmol L^{-1} de DCF e com adições sucessivas de 75, 150 e 300 nmol L^{-1} de AMCFN, utilizando (a) EGPU-2,5MIP-DCF e (b) EGPU-2,5NIP-DCF, em condições otimizadas.....97
- Figura 35 - Voltamogramas de DPASV para 150 nmol L^{-1} de DCF e com adições sucessivas de 75, 150 e 300 nmol L^{-1} de AMFN, utilizando (a) EGPU-2,5MIP-DCF e (b) EGPU-2,5NIP-DCF, em condições otimizadas.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compilação das publicações do grupo de pesquisa com EGPU em diferentes geometrias.....	21
Tabela 2 - Compilação das principais publicações com resultados da determinação de diclofenaco em urina e formulações farmacêuticas utilizando voltametria.....	27
Tabela 3-Reagentes utilizados na síntese do MIP-FA e do NIP-FA	33
Tabela 4 - Reagentes utilizados na síntese do MIP-DCF e do NIP-DCF.....	34
Tabela 5 - Massas utilizadas na confecção dos eletrodos.....	35
Tabela 6 - Composição da Urina artificial.....	39
Tabela 7 - Área e diâmetro médio das partículas do MIP-FA.....	45
Tabela 8 - Área e diâmetro médio das cavidades do MIP-FA.....	46
Tabela 9 - Correntes obtidas por CV utilizando diferentes EGPU	48
Tabela 10- Correntes obtidas a partir dos voltamogramas de pulso diferencial para o FA em solução fosfato (pH 4,2) e tampão acetato (pH 4,5)	54
Tabela 11 - Figuras de mérito correspondentes aos picos em -0,52 e em -0,58 V (vs. SCE) .	59
Tabela 12 - Excipiente das formulações farmacêuticas utilizadas neste estudo.....	61
Tabela 13 - Determinação do FA em formulações farmacêuticas pelo método de Adição de Padrão, usando eletrodo de EGPU-2,5MIP-FA por DPV e HPLC	61
Tabela 14 - Valores de recuperação do FA nas três formulações farmacêuticas analisadas	61
Tabela 15 - Relação de interferência do MTX no sinal referente a 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FA.....	62
Tabela 16 - Interferência de AA, DA e UA no sinal obtido para 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FA usando o EGPU-2,5MIP-FA	63
Tabela 17 - Dimensões das partículas de MIP-DCF	69
Tabela 18 - Dimenssões das cavidades das partículas de MIP-DCF.....	69
Tabela 19 - Correntes obtidas em DPV para picos de oxidação do DCF nas duas varreduras	79
Tabela 20 - Valores de corrente e potencial para o pico de oxidação do DCF obtidos a partir dos voltamogramas de pulso diferencial da primeira varredura.....	83
Tabela 21 - Valores de I_{DCF} obtidos nos voltamogramas de DPAdASV com tempo de acumulação de 60 s e diferentes valores de potencial de acumulação	85
Tabela 22 - Otimização dos parâmetros para determinação do DCF em DPCSV	88
Tabela 23 - Região linear, Coeficiente de correlação linear, inclinação e LOD para DCF	91

Tabela 24- Determinação do DCF em formulações usando EGPU-2,5MIP-DCF em DPASV	93
Tabela 25- Coeficiente de recuperação de DCF em formulações farmacêuticas	94
Tabela 26 - Coeficiente de recuperação do DCF na amostra de urina sintética	95
Tabela 27 - Interferência do ácido meclofenâmico na resposta voltamétrica de soluções de 150 nmol L ⁻¹ de DCF, utilizando o eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF	98
Tabela 28 - Efeito do ácido meclofenâmico na resposta voltamétrica de soluções de 150 nmol L ⁻¹ de DCF utilizando o eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF	101

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1. Tipos de Eletrodos.....	19
1.1.1. Eletrodos Compósitos	19
1.2. Polímero com Impressão Molecular (MIP).....	22
1.3. Ácido Fólico e Algumas de Suas Aplicações	23
1.4. Diclofenaco	26
1.5. Objetivos	29
2. Parte Experimental.....	31
2.1. Equipamentos.....	31
2.2. Eletrodos	31
2.2.1. Síntese dos polímeros com impressão molecular para FA (MIP-FA) e sem impressão molecular para FA (NIP-FA).....	31
2.2.1.1. Reagentes e Soluções	31
2.2.1.2. Síntese do MIP-FA e do NIP-FA	32
2.2.2. Síntese dos polímeros com impressão molecular para DCF (MIP-DCF) e sem impressão molecular para DCF (NIP-DCF)	33
2.2.2.1. Reagentes de Soluções	33
2.2.2.2. Síntese do MIP-DCF e NIP-DCF	34
2.2.3. Confeção dos Eletrodos Modificados	34
2.2.4. Tratamento Mecânico	35
2.3. Caracterização físico-química dos polímeros sem e com impressão molecular para o analito.....	35
2.4. Procedimentos empregados para a avaliação dos eletrodos compósitos modificados com MIP-FA	36
2.4.1. Determinação do FA em formulações farmacêuticas comerciais.....	36
2.4.2. Método oficial de análise do FA.....	36

2.4.3. Teste de Interferentes na determinação do FA	37
2.5. Procedimentos empregados para a avaliação dos eletrodos compósitos modificados com MIP-DCF	37
2.5.1. Determinação do DCF em formulações farmacêuticas	38
2.5.2. Método oficial de análise do DCF	38
2.5.3. Determinação do DCF em Urina sintética.....	39
2.5.4. Teste de interferentes na determinação do DCF	39
3. Resultados e Discussão	42
3.1. Ácido Fólico.....	42
3.1.1. Síntese do MIP e Confeção dos Eletrodos Compósitos de GPU Modificados.....	42
3.1.2. Caracterização do MIP-FA e NIP-FA	43
3.1.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	43
3.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	44
3.1.2.3. BET	46
3.1.3. Estudos Voltamétricos dos Eletrodos EGPU-MIP-FA.....	46
3.1.4. Otimização da porcentagem do modificador	53
3.1.5. Escolha do eletrólito suporte	55
3.1.6. Curva Analítica	56
3.1.7. Determinação do FA em formulações farmacêuticas	60
3.1.8. Estudo de seletividade	62
3.2. Diclofenaco	67
3.2.1. Caracterização do MIP-DCF	67
3.2.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	67
3.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	68
3.2.1.3. BET	70
3.2.2. Estudo voltamétrico dos eletrodos EGPU-MIP-DCF.....	70
3.2.3. Otimização da porcentagem do modificador	77

3.2.4. Escolha do meio eletrolítico e pH.....	79
3.2.5. Otimização do potencial e tempo de acumulação.....	85
3.2.6. Curva Analítica.....	88
3.2.7. Determinação do DCF em formulações farmacêuticas	92
3.2.8. Determinação do DCF em Urina Sintética	94
3.2.9. Estudo de seletividade	96
3.2.9.1. Ácido meclofenâmico.....	96
3.2.9.2. Ácido mefenâmico	99
4. Conclusão.....	103
5. Trabalhos Futuros	106
6. Referências.....	108

Capítulo 1 - Introdução

1. Introdução

1.1. Tipos de Eletrodos

O eletrodo de trabalho desempenha papel fundamental na qualidade da resposta voltamétrica e assume importância fundamental no seu desempenho, pois é na superfície deste eletrodo que se ocorrem os processos de transferência de carga.

O eletrodo gotejante de mercúrio, depois de proposto por Kučera (1) em 1903 e com o surgimento da polarografia, desenvolvida por Heyrovsky (2) na década de 20, se tornou muito popular devido às suas características, principalmente à facilidade de renovação de superfície e reprodutibilidade da área. Entretanto, em potenciais mais positivos o mercúrio é oxidado, limitando sua aplicação, além do mesmo apresentar toxicidade, o que restringe suas aplicações. Com isso, abriu-se uma frente de pesquisa promissora na área de eletroquímica e eletroanalítica, que é o desenvolvimento de novos materiais eletródicos (3). Dentre esses, o eletrodo de pasta de carbono (CPE), proposto por Adams (4), pode ser utilizado em um intervalo mais amplo de potenciais, sendo útil nos estudos de espécies orgânicas de interesse biológico. Os eletrodos de carbono apresentam vantagens em relação aos metálicos, pois nestes, pode haver formação de filme de óxido na superfície, que provocam problemas na reprodução da área superficial (5).

Diversos eletrodos à base de carbono são descritos na literatura (6), incluindo sua construção, vantagens e desvantagens (7), entre eles, os eletrodos de grafite pirolítico, carbono vítreo, fibras de carbono, bem como as pastas de carbono.

Dentre os eletrodos à base de carbono, destacam-se os eletrodos compósitos sólidos a base de polímeros em sua composição, pois ao substituir os aglutinantes líquidos, oferecem vantagens como estabilidade, resistência mecânica, melhor relação sinal/ruído, menores limites de detecção, facilidade na confecção do eletrodo e na renovação da superfície, possibilidade de incorporação de modificadores, baixo custo na preparação e relativa repetibilidade de área ativa (8).

1.1.1. Eletrodos Compósitos

Tallman e Petersen (9) definiram um eletrodo compósito como *“um material consistindo de pelo menos uma fase condutora misturada a pelo menos uma fase isolante”* que tenha também a função de aglutinante, como as pastas de carbono e os compósitos

sólidos. Também classificaram os eletrodos compósitos de acordo com a distribuição do material condutor e isolante dentro do compósito. Assim, as partículas condutoras e isolantes podem estar distribuídas de forma ordenada ou aleatória. Se a distribuição for ordenada, o componente condutor pode ficar confinado na superfície do componente isolante e vice-versa, ou o componente condutor ordenado atravessa o corpo do material.

Ruschau e colaboradores (10) afirmaram ainda que, cada material componente do compósito mantém sua natureza original, dando ao eletrodo compósito qualidades física, química e mecânica, diferentes das de cada componente, individualmente.

Se a distribuição for aleatória, as partículas do componente condutor podem se encontrar dispersas ou agrupadas em zonas claramente definidas na matriz do compósito, classificando o compósito aleatório em disperso ou consolidado, respectivamente (11).

Os eletrodos compósitos dispersos podem se apresentar na forma de pasta, quando se mistura um material condutor com aglutinante como no caso do CPE. Há também os eletrodos compósitos sólidos, quando o material condutor é preparado com polímeros: grafite-epóxi, fibra de carbono-epóxi, negro de fumo-polietileno ou grafite-poliuretana.

Os compósitos consolidados podem ser classificados em impregnados, quando envolve a impregnação de um material condutor poroso com o material isolante e vice-versa, ou segregados, quando se mistura o pó de um condutor com um polímero em pó e faz-se a moldagem por compressão da mistura, como grafite-polietileno.

As propriedades elétricas dos compósitos dependem da natureza de cada componente, suas quantidades e distribuição. A resistência elétrica é determinada pela ligação entre as partículas condutoras dentro da matriz polimérica.

Materiais à base de carbono como grafite, negro de fumo, fibra de carbono, têm sido muito utilizados como fase condutora na fabricação de compósitos.

A facilidade de preparação desses materiais eletródicos permite preparar sensores de tamanhos e formas diferentes, e a incorporação de uma variedade de modificadores, os quais podem aumentar a seletividade e sensibilidade dos eletrodos.

Mascini *et al.*, Klatt *et al.*, Swofford e Carman, Wang e Naser e Stulík *et al.* (12–16) descrevem vários procedimentos para preparação dos eletrodos compósitos, conforme descreveu Cervini (17).

O grupo vem desenvolvendo pesquisas utilizando a resina poliuretana derivada do óleo da mamona ou óleo de rícino (em inglês, *castor oil*) (17,18). A Tabela 1 mostra um

resumo das publicações do Grupo LATEQS, utilizando eletrodo compósito de grafite e poliuretana (EGPU) em diferentes geometrias na determinação de fármacos e metais.

Tabela 1 – Compilação das publicações do grupo de pesquisa com EGPU em diferentes geometrias

Eletrodo	Analito	Técnica	LOD / mol L⁻¹	Ref.
GPU	Ferricianeto	CV;DPV	-	(19)
	Hidroquinona		-	
	Catecol		-	
	Cd(II)		-	
GPU	Hidroquinona	DPV	$9,3 \times 10^{-7}$	(20)
GPU	Hidroquinona	SWV	$2,8 \times 10^{-7}$	(21)
GPU	Hidroquinona	FIA	$1,0 \times 10^{-4}$	(22)
GPU	Rutina	SWV	$7,1 \times 10^{-9}$	(23)
GPU	Atenolol	DPV	$3,2 \times 10^{-6}$	(24)
GPU	Paracetamol	FIA	$1,9 \times 10^{-5}$	(25)
GPU	Atenolol	FIA	$1,8 \times 10^{-5}$	(26)
GPU	Furosemida	DPV;	$1,5 \times 10^{-7}$	(27)
		SWV	$9,6 \times 10^{-7}$	
GPU	Verapamil	DPV;	$7,0 \times 10^{-7}$	(28)
		SWV	Dpv ou outra?	
GPU-MIP	Paracetamol	DPV	$6,7 \times 10^{-8}$	(29)
GPU-BTSBA^a	Cd(II)	DPASV;	$1,0 \times 10^{-8}$; $6,0 \times 10^{-9}$	(30)
	Pb(II)	SWASV	$3,0 \times 10^{-10}$; $9,0 \times 10^{-11}$	
	Cu(II)		$5,0 \times 10^{-9}$; $1,0 \times 10^{-9}$	
	Hg(II)		$1,8 \times 10^{-9}$; $6,0 \times 10^{-10}$	
GPU-BTPSA	Cu(II)	DPASV	$3,9 \times 10^{-8}$	(31)
GPU-BiF^b	Zn(II)	SWASV	$6,0 \times 10^{-10}$	(32)
	Cd(II)		$2,2 \times 10^{-9}$	
	Pb(II)		$1,1 \times 10^{-9}$	
	Cu(II)		$2,7 \times 10^{-9}$	
	Hg(II)		$2,5 \times 10^{-9}$	
GPU-BTSBA	Cd(II)	SWASV	-	(33)
	Pb(II)	EIS	-	
	Cu(II)		-	
	Hg(II)		-	
GPU	Tetraciclina	DPV	$2,8 \times 10^{-6}$	(34)
EIGPU^c	Paracetamol	CV	$8,2 \times 10^{-7}$	(35)
EIGPU	Paracetamol	DPV	$8,4 \times 10^{-7}$	(36)
	Caféina		$1,6 \times 10^{-6}$	
GPUE	Minoxidil	CV	$1,5 \times 10^{-5}$	(37)
		DPV	$4,0 \times 10^{-6}$	
		SWV	$5,0 \times 10^{-6}$	
GPU-MIP	Ácido fólico	DPV	$1,7 \times 10^{-7}$	(38)
EIGPU-MO^e	Zn(II)	DPASV	$3,4 \times 10^{-8}$	(39)
	Pb(II)		$3,0 \times 10^{-7}$	
	Cu(II)		$6,5 \times 10^{-8}$	
	Hg(II)		$3,0 \times 10^{-8}$	
MGPU^d	Dopamina	DPV	$4,6 \times 10^{-8}$	(40)
			$3,8 \times 10^{-7}$	

^aEletrodo compósito à base de GPU modificado com sílica SBA-15 funcionalizada com benzotiazol-2-tiol

^bEletrodo compósito à base de GPU modificado com filme de Bismuto

^cEletrodo compósito impresso à base de GPU

^d Eletrodo compósito à base de GPU modificado com Cu(II) Salen

^e Eletrodo compósito impresso à base de GPU modificado com sílica SBA-15 organofuncionalizada com benzotiazol-2-tiol

Cervini e Saciloto (17,18) citaram várias vantagens do uso desta resina na confecção de eletrodos, sendo elas: sustentabilidade ambiental, processo de cura à temperatura ambiente, bicomponente, facilidade de preparação e estocagem, alta hidrofobicidade, facilidade de renovação da superfície, possibilidade de agregar modificadores ao compósito, modelar eletrodos com várias geometrias, resistência a solventes não aquosos, além da redução do custo.

1.2. Polímero com Impressão Molecular (MIP)

O reconhecimento de moléculas biologicamente importantes governa muitas interações, essencialmente biológicas. Já a mimetização dos processos com receptores artificiais, por exemplo, proteínas, peptídeos, dentre outros, permanece um grande desafio em química e biologia.

A impressão molecular oferece várias vantagens sobre outros processos utilizados para preparar receptores sintéticos (41) como estabilidade química, térmica, mecânica do material resultante, robustez, afinidade e seletividade para o analito impresso semelhante ao dos receptores naturais (42,43).

A impressão molecular começou a se desenvolver em 1931 quando uma quantidade de sílica gel foi preparada por Polyakov (44) e este observou que, preparada com um solvente aditivo (molde), a sílica final mostrava afinidade de ligação a este solvente.

O conceito de impressão molecular surgiu com a teoria de Pauling em relação à formação dos anticorpos, na qual um antígeno era usado como uma molécula modelo para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos (45). Surgiu então a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional, um polímero, ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular. Esses polímeros são chamados polímeros com impressão molecular, (do inglês, *Molecular Imprinted Polymers*, *MIP*) e também designados de materiais biomiméticos (46,47).

Os MIPs são amplamente empregados em química analítica e podem ser aplicados a uma ampla variedade de analitos, como moléculas orgânicas pequenas, por exemplo, fármacos, pesticidas, aminoácidos, açúcares, e em compostos orgânicos maiores, como peptídeos, sendo estes últimos ainda um grande desafio (48).

Portanto, a formação de impressões moleculares na superfície do substrato eletródico é uma solução viável aos problemas de acessibilidade e transferência de massa para

moléculas grandes. Além disso, impressões moleculares na superfície fornecem maior controle na orientação e densidade de sítios ligados, fornecendo rapidez e exatidão na detecção do analito. Entretanto, um protocolo genérico para impressão molecular ainda não está muito bem estabelecido, requerendo adaptação aos protocolos convencionais, de acordo com o analito utilizado.

As aplicações dos MIPs em química analítica são muito amplas. Alguns exemplos ocorrem em extração em fase sólida (SPE) (49,50), microextração em fase sólida (51,52), técnicas cromatográficas (53,54), eletroforese capilar (55) e eletrocromatografia capilar (56,57). Se o analito de interesse exibe uma propriedade especial como fluorescência ou atividade eletroquímica, pode ser explorado como sensor em MIP.

Sensores eletroquímicos MIP (58,59) foram relatados inicialmente em 1990, quando pesquisas do grupo de Mosbach descreveram a integração do polímero impresso anilida fenilalanina em um sensor de capacitância e relatou uma redução significativa na capacitância total do sistema quando o sensor foi exposto ao “*template*”(60).

Kriz e Mosbach (61) desenvolveram um sensor amperométrico para morfina, em que a morfina foi seletivamente enriquecida sobre um MIP e em seguida, quantificada por eletrooxidação.

Dentre os trabalhos do grupo sobre MIP, está o de Cervini & Cavaleiro (29) que desenvolveram um eletrodo composto de GPU modificado com polímero com impressão molecular para o paracetamol para a determinação deste fármaco (Tabela 1), que também publicaram uma revisão (62) sobre as características gerais de preparação dos MIPs, incluindo a descrição dos eletrodos modificados com MIPs por diferentes abordagens.

Pereira, Cervini e Cavaleiro (38) utilizaram o ácido fólico, uma molécula relativamente grande, como “analito” para sintetizar um polímero com impressão molecular a fim de modificar o EGPU com este MIP para avaliar sua sensibilidade e seletividade na determinação do FA. Os detalhes desta pesquisa estão no presente trabalho.

1.3. Ácido Fólico e Algumas de Suas Aplicações

Detalhes como o tamanho da molécula e o número de grupos funcionais são importantes para selecionar um analito como molde para a síntese de um MIP, pois isto pode diminuir sua sensibilidade e seletividade em relação aos interferentes e excipientes que possam estar na solução a ser analisada devido a grande cavidade formada pela impressão da molécula e os sítios de ligações formados para diversos grupos funcionais.

Um exemplo destas moléculas é o ácido fólico (FA), ou ácido pteroilglutâmico, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 1 e, é a forma mais estável de folato. Este folato faz parte do grupo de vitaminas essenciais, uma vez que precisa ser adquirido pela dieta (63). Auxilia no tratamento da anemia megaloblástica e macrocítica, estimulando a produção de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. É essencial para a síntese de nucleoproteínas e formação das hemácias e, na presença do ácido ascórbico, é convertido em ácido tetraidrofólico, sua forma metabólica (64).

Figura 1-Fórmula estrutural do ácido fólico.

Seu consumo é necessário, principalmente, entre mulheres gestantes, pois sua deficiência está relacionada à má formação do tubo neural da criança (65). Outros estudos ainda sugerem que a carência de FA pode contribuir para o aparecimento de câncer no trato digestivo (66,67). Dada à importância, faz-se necessário garantir a qualidade dessa vitamina nos alimentos e nas formulações farmacêuticas.

Os maiores desafios na análise de vitaminas se devem à baixa concentração em que se encontram nas amostras biológicas, da presença de interferentes, da complexidade da matriz e da baixa estabilidade desses nutrientes.

Os principais métodos para determinação de vitaminas hidrossolúveis, como o FA, incluem a espectrofotometria, titulação, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC). Já para a análise quantitativa em preparações farmacêuticas e suplementos multivitamínicos alimentares, estão em destaque os métodos espectrofotométricos de UV-visível (68–71) e HPLC com diferentes detectores como: UV-Visível (72–75), fluorescência (76), espectrometria de massa (77,78), e arranjo de diodos (79).

Dentre os métodos eletroanalíticos, destacam-se os trabalhos de El-Maali (80,81), porém, apenas dois trabalhos foram encontrados utilizando MIP-FA como modificador de eletrodos (82,83) para a determinação de FA.

El-Maali (80) desenvolveu um CPE modificado com ácido palmítico e esteárico para determinar FA em soluções aquosas e biológicas. Foram obtidos limites de detecção de 5; 80 e 500 nmol L⁻¹ para as respectivas amostras aquosa, de urina e de soro.

Le Gall e Van Den Berg (81) determinaram FA em amostras de água de mar, utilizando um eletrodo gotejante de mercúrio em voltametria de redissolução catódica (CSV) em um intervalo de potencial entre -0,2 e -1,2 V, após etapa de pré-concentração. Três picos catódicos foram encontrados, em -0,5, -0,8 e -1,2 V (vs. Ag/AgCl) em água de mar em pH 5, enquanto nenhum pico anódico foi observado, indicando que os processos de redução foram electroquimicamente irreversíveis. Um único pico foi obtido em -0,8 V, em pH 8,5, correspondente ao pico em -0,5 V em pH 5, mas deslocado para um potencial mais negativo, como um resultado da alteração do pH. Um pico anódico em -0,8 V foi observado no sentido inverso, indicando processo de redução reversível, em pH 8,5.

Prasad e colaboradores (82) desenvolveram um sensor eletroquímico para reconhecimento seletivo e quantitativo do FA, utilizando um eletrodo de grafite de lápis grau 2B modificado com filme de sol-gel pré-anodizado com MIP imobilizado. A solução de FA (1,00-100 µg mL⁻¹) foi adicionada à célula com eletrólito KCl-HCl em pH 2,5, com tempo de acumulação de 120 s, a 0,8 V (vs. Ag/AgCl) em condições ambiente. Os voltamogramas obtidos por voltametria cíclica CV e voltametria de pulso diferencial de redissolução catódica (DPCSV) foram registrados no intervalo de potencial de 0,1 a -1,1 V e de -0,2 a -0,95 V (vs. Ag/AgCl), respectivamente, utilizando velocidade de varredura de potencial (v) 10 mV s⁻¹, amplitude (a) de 25 mV e tempo de equilíbrio de 15 s, tendo sido obtido um pico catódico em -0,55 V. Uma região linear entre 7 e 156 ng mL⁻¹ de FA com limite de detecção (LOD) de 0,002 µg mL⁻¹ de FA foi encontrada ao determinar o FA em amostra aquosa.

Em outro trabalho, Prasad e colaboradores (83) desenvolveram um eletrodo compósito consolidado de fibra de carbono modificado com um MIP para a determinação de FA em amostras comerciais, entre outras, utilizando DPCSV e CV. Voltamogramas cíclicos (CV) em modo de redissolução catódica foram obtidos em um intervalo de potencial entre 0,1 e -1,4 V (vs. Ag/AgCl) e mostraram dois picos de um par redox para o FA: E_{pc} = - 0,70 V (vs. Ag/AgCl) e E_{pa} = - 0,50 V (vs. Ag/AgCl) em 10 mV s⁻¹. O eletrodo de fibra foi submetido a um tempo de acumulação otimizado de 180 s. Os voltamogramas de DPCSV foram obtidos

em um intervalo de potencial entre -0,4 e -1,0 V (vs. Ag/AgCl), com amplitude de pulso 25 mV, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ e 15 s de tempo de equilíbrio. Em amostra aquosa foi encontrada uma região linear entre 0,595 e 3,83 ng mL^{-1} com LOD de 0,192 ng mL^{-1} .

1.4. Diclofenaco

A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural do diclofenaco de sódio. Um anti-inflamatório não esteroidal, que também apresenta atividade analgésica e antipirética (84).

Figura 2-Fórmula estrutural do diclofenaco de sódio.

Quimicamente, é um derivado do ácido fenilacético. Têm indicações em vários processos inflamatórios, ou não, como artrite reumatóide, osteoartrose, espondilite anquilosante, cólica renal, cirurgias menores, trauma e dismenorréia (85). Tem sido utilizado em 94 países, no tratamento de 115 milhões de pessoas por mês, ocupando a 8ª posição dos anti-inflamatórios mais comercializados do mundo (85,86). Sua ação se deve, principalmente, à inibição da atividade da *ciclooxigenase*, o que vai causar intensa redução da formação de prostaglandina, prostaciclina e tromboxano, todos mediadores da resposta inflamatória (87).

Segundo receituário de um dos fabricantes, aproximadamente, 60% da dose administrada é excretada na urina como conjugado glicurônico da molécula intacta e como metabólitos, a maioria dos quais são também convertidos a conjugados glicurônicos e menos de 1% é excretado como substância inalterada. O restante da dose é eliminado como metabólitos, através da bile e nas fezes (88).

Portanto, analisando o consumo mundial e a quantidade da substância que não é metabolizada pelo organismo, justifica-se a preocupação tanto no controle de qualidade como da sua presença no meio ambiente.

A contaminação de águas e solos por fármacos tem sua importância devido ao impacto sobre a saúde humana e o meio ambiente mesmo em baixas concentrações (89–91). O desenvolvimento de métodos de tratamento de águas mais eficientes, por exemplo, tem em comum o foco na degradação de fármacos, incluindo o diclofenaco como um dos mais preocupantes devido ao grande consumo (91–93).

Os principais métodos analíticos para determinar diclofenaco são cromatografia gasosa (94,95), eletroforese capilar (96), HPLC (97–99) e voltametria (99,100). Alguns trabalhos utilizando eletrodos na determinação de DCF em urina e em formulações farmacêuticas estão apresentados na Tabela 2, os quais envolvem métodos eletroanalíticos.

Tabela 2 - Compilação das principais publicações com resultados da determinação de diclofenaco em urina e formulações farmacêuticas utilizando voltametria.

Eletrodo	Modificação	Técnica	Aplicação	LOD / nmol L ⁻¹	Ref.
EDDB		SWV	urina	115	(99)
		CV		600	
EDDB		DPV		300	(100)
		SWV		60	
GCE	MWCNT ^a	CV	urina	80	(101)
Grafite pirolítico	-	SWV	Urina e comprimidos	6,2	(102)
CarGCEbono vítreo	MWCNT/Cu(OH) ₂	DPV	Comprimido	40	(103)
CPE	Tirosina	CV / DPV	Comprimidos e urina	3380	(104)
CerâmicoCE	MWCNT/IL ^b	DPV	Comprimido	18	(105)
BDDE ^c	-	SWV	Comprimido e urina	150	(99)
GCE	Óxido de grafeno funcionalizado	LSV/CV	urina	90	(106)
Pasta de carbono	MWCNT/IL ^d	DPV	Urina e comprimido	200	(107)
GCE	Filme-MIP	CV		-	(108)
GE		DPV		50	(109)
GCE	MWCNT-COOH ^e	SWV		13000	(110)
		FIA		17000	

^a Nanotubo de carbono com paredes múltiplas

^b Líquido iônico : 1-butil-3-metilimidazólio-hexafluorofosfato

^c Eletrodo de diamante dopado com boro

^d Líquido iônico: n-hexil – 3- metilimidazólio – hexafluorofosfato

^e Eletrodo de carbono vítreo modificado com complexo 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi-29H,31H-ftalocianina de cobre(II) e nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados

Os únicos trabalhos da literatura em que foram preparados MIP's para determinação do diclofenaco são os de Blanco-López e colaboradores (108,109). Nesse trabalho foram preparados eletrodos de grafite-Teflon®, grafite-epóxi e epóxi/negro de fumo. Foi avaliada a melhor composição dos eletrodos para a determinação do diclofenaco. Sobre os eletrodos modificados com MIP e NIP, não há dados sobre LOD ou eficiência quanto à

seletividade. Para o eletrodo de grafite pirolítico, o único para o qual os autores descrevem figuras de mérito em DPV, nota-se maior limite de detecção (Tabela 2) que o determinado no presente trabalho.

1.5. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar MIP's a serem usados na modificação de eletrodos compósitos à base de grafite e poliuretana, utilizando ácido fólico e diclofenaco como “moldes”;
- Avaliar o desempenho desses eletrodos compósitos na determinação eletroquímica de substâncias de interesse farmacêutico como o FA e DCF;
- Contribuir para o desenvolvimento de materiais eletródicos com maior seletividade e sensibilidade para a determinação destas substâncias;
- Avaliar o efeito do tamanho do molde e do número e natureza dos grupos funcionais na seletividade dos dispositivos.

Capítulo 2 – Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato-galvanostato μ AUTOLAB TIPE III (Ecochemie), acoplado a um microcomputador e controlado pelo software GPES 4.9 (Eco chemie). Todas as medidas foram realizadas em uma célula de vidro com capacidade total de 25 mL em arranjo de três eletrodos.

2.2. Eletrodos

Um eletrodo de calomelano saturado (SCE) com $1,57 \text{ mm}^2$ de área foi utilizado como referência e um fio de platina de 1 cm de comprimento e $7,85 \text{ mm}^2$ de área como eletrodo auxiliar.

Dois eletrodos de trabalho com áreas de $28,3 \text{ mm}^2$, cada um, foram confeccionados e utilizados neste trabalho, um para determinação do FA: eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPU) modificado com polímero com impressão molecular para FA (EGPU-MIP-FA) e modificado com polímero sem impressão molecular para FA (EGPU-NIP-FA). O outro conjunto foi confeccionado para a determinação do DCF: eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPU) modificado com polímero com impressão molecular para DCF (EGPU-MIP-DCF) e modificado com polímero sem impressão molecular para DCF (EGPU-NIP-DCF). Para comparação foi utilizado o carbono vítreo (GC) e confeccionado um eletrodo compósito de grafite-poliuretana sem modificação (EGPU).

2.2.1. Síntese dos polímeros com impressão molecular para FA (MIP-FA) e sem impressão molecular para FA (NIP-FA)

2.2.1.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados na síntese do MIP-FA foram de grau analítico e usados sem purificação prévia; sendo eles ácido acrílico (AAc, Aldrich), hidroquinona (HQ, Vetec), cloreto de benzoíla (BC, Aldrich), melanina (MEL, Aldrich) e dimetilformamida (DMF, Vetec). O cloreto de acrilóila (AC) foi sintetizado no laboratório. Foram utilizados também o 2,4,6-trisacrilamida-1,3,5-triazina (TAT), que foi sintetizado no laboratório, Azobis-

(isobutironitrila) (AIBN, AcrösOrganics), dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, Polysciencis, Inc.), acetonitrila (ACN, Vetec) e trietanolamina (TEA, Vetec).

A solução de FA (Sigma-Aldrich) foi preparada diariamente pela dissolução deste composto em meio de solução fosfato e tampão acetato com diferentes valores de pH.

As amostras comerciais, que contém o FA, utilizadas na aplicação do eletrodo foram Afopic® (Teuto Brasileiro S/A), Folifolin® (EMS S/A) e Folacin® (Arese), adquiridos em farmácias locais.

2.2.1.2. Síntese do MIP-FA e do NIP-FA

Inicialmente, foi preciso sintetizar AC, necessário para a síntese do MIP, seguindo a metodologia de Stempel (111), segundo a qual uma mistura de 31,53 g de AAc com 105,40 g de BC e 0,225 g de HQ foi destilada à vácuo. A temperatura no topo da coluna de destilação variou entre 60 e 70 °C e a destilação terminou quando a temperatura atingiu 85 °C. O destilado coletado em um balão volumétrico contendo HQ, para inibir a polimerização, foi imerso em banho de gelo e redistilado, com temperatura variando entre 72 e 74 °C e pressão de 740 mmHg.

A síntese do monômero TAT, precursor da síntese do MIP, foi feita seguindo a metodologia de Prasa de colaboradores (83), na qual 38,45 mmol de MEL foi dissolvido em 25 mL de DMF em um balão volumétrico com septo e sob agitação. Em seguida, 125 mmol de AC foram adicionados gradualmente por meio de uma seringa com agulha, através do septo. A mistura reacional foi submetida à agitação por 12 h. O monômero 2,4,6-trisacrilamida-1,3,5-triazina (TAT) foi filtrado e lavado com uma mistura de água-DMF, a quente, para retirar qualquer resíduo.

A síntese do MIP-FA foi realizada conforme descrito na literatura, por Prasad e colaboradores (82), utilizando o método convencional de polimerização em batelada. O polímero sem impressão molecular para FA (NIP-FA) foi sintetizado da mesma forma que o MIP-FA, mas sem a adição do analito. O MIP-FA e o NIP-FA foram preparados com reagentes descritos na Tabela 3.

Tabela 3-Reagentes utilizados na síntese do MIP-FA e do NIP-FA

	Reagentes (mmol)			Solvente (mL)	
	TAT	EGDMA	AIBN	FA	DMSO
MIP-FA	0,5	20	0,45	0,165	24,0
NIP-FA	0,5	20	0,45	0,000	24,0

Primeiramente, 0,50 mmol de monômero TAT e 20 mmol do agente reacional de ligação inter-cruzada EGDMA foram adicionados a uma ampola de vidro. Em seguida, 0,16 mmol de FA e 0,45 mmol do iniciador AIBN foram pesados, adicionados ao meio reacional e a mistura dissolvida em 24 mL de DMSO. Logo após, a ampola foi fechada com um septo de borracha e nitrogênio foi purgado por 30 minutos, usando uma agulha hipodérmica. A ampola foi mantida em um banho ultratermostatizado MA-184 (Marconi) a 50 °C por 24 horas.

Após a síntese do MIP, o FA foi extraído, lavando-se três vezes o material com mistura de ACN/TEA (4/1, v/v) em uma placa de funil sinterizado. O polímero resultante foi triturado em almofariz de vidro e passado em peneiras para a separação do MIP em diferentes granulometrias (1180; 500; 355; 250 e 150 µm). A granulometria de 150 µm foi escolhida para a confecção dos eletrodos, pois foi a melhor segundo Cervini (29).

2.2.2. Síntese dos polímeros com impressão molecular para DCF (MIP-DCF) e sem impressão molecular para DCF (NIP-DCF)

2.2.2.1. Reagentes de Soluções

Os reagentes utilizados para a síntese do MIP-DCF foram de grau analítico e usados sem purificação prévia, sendo esses o ácido metacrílico (MAA), Azobis-(isobutironitrila) (AIBN, AcrösOrganics), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, Polysciencis, Inc.), acetonitrila (ACN), metanol (Tedia) e Ácido Acético (Macro Erba). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

A partir do diclofenaco de sódio (Sigma-Aldrich) foi obtida a forma ácida do diclofenaco (DCF) seguindo a literatura (112). Foi preparada diariamente uma solução concentrada de DCF (Sigma-Aldrich) pela dissolução deste composto em ACN e adicionada uma determinada alíquota em solução fosfato com 10% de ACN (v/v) ou em solução de ácido perclórico com 10% de ACN (v/v).

As amostras farmacêuticas contendo DCF, Biofenac® (Aché S/A), Diclofenaco Sódico® (Medley) e Voltaren® (Novartis Biociências S/A), utilizadas na aplicação do eletrodo foram adquiridas em farmácias locais.

2.2.2.2. Síntese do MIP-DCF e NIP-DCF

A síntese do MIP-DCF foi realizada seguindo a metodologia de Blanco-Lopez (59), utilizando o método convencional de polimerização em batelada. O NIP-DCF foi sintetizado da mesma maneira que o MIP-DCF, mas sem a adição do analito. As proporções dos reagentes estão apresentadas na Tabela 4:

Tabela 4 - Reagentes utilizados na síntese do MIP-DCF e do NIP-DCF

	Reagentes (mmol)			Solvente (mL)	
	MAA	EGDMA	AIBN	DCF	ACN
MIP-DCF	2,478	12,6	0,194	0,500	4,20
NIP-DCF	2,478	12,6	0,194	0,000	4,20

O monômero MAA foi misturado ao agente de ligação cruzada EGDMA, e adicionados em uma ampola de vidro. Adicionou-se DCF e o iniciador radicalar AIBN à mistura que foi dissolvida em ACN. A ampola foi fechada com um septo de borracha e, com uma agulha hipodérmica, purgou-se nitrogênio por 30 minutos. Em seguida, a ampola foi mantida em banho ultratermostático MA-184 (Marconi) a 50°C por 24 horas.

Depois da polimerização, o DCF foi extraído, lavando-se o MIP com mistura de Metanol / Ácido acético (1:9, v/v) através do sistema de soxhlet sob refluxo por 10 h. O MIP-DCF e o NIP-DCF foram macerados em almofariz de ágata e passados por peneiras, obtendo-se um pó com granulometria menor que 150 μm .

2.2.3. Confeção dos Eletrodos Modificados

A resina poliuretana (Poliquil) foi preparada misturando-se 0,8 partes do polioli (B-471) e 1,0 parte do pré-polímero (A-249), conforme recomendação do fabricante. A seguir, uma quantidade de pó de grafite (Aldrich; diâmetro da partícula ≤ 20 micrômetros) e do MIP foi adicionada para obter eletrodos compósitos contendo 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (*m/m*) de modificador. A Tabela 5 apresenta as quantidades utilizadas de cada componente usado na confecção dos eletrodos. Essa mistura foi homogeneizada por 5 minutos em um almofariz de vidro e prensada numa prensa manual com extrusor de 3 mm de diâmetro.

Após a cura total da resina, que ocorre em 24 horas em temperatura ambiente, de acordo com o fabricante, os tarugos foram cortados em peças com 1 cm de comprimento. A seguir, foram conectados a um fio de cobre com auxílio de epóxico de prata (Two Part Conductive Silver Paint, Electron Microscopy Sciences).

Tabela 5 - Massas utilizadas na confecção dos eletrodos

Eletrodo modificado (%)	MIP (g)	Grafite (g)	Pré-polímero (g)	Poliol (g)
2,5	0,050	1,175	0,431	0,344
5,0	0,100	1,150	0,419	0,331
7,5	0,150	1,125	0,403	0,322
10	0,200	1,100	0,389	0,311

Após 48 horas, o conjunto compósito/fio de cobre foi inserido em um tubo de vidro de 6 mm de diâmetro e 9 cm de comprimento. Então, uma resina epóxi (Silaex SQ 3024), foi adicionada ao tubo de vidro com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para preenchimento. O processo de cura durou 24 horas.

2.2.4. Tratamento Mecânico

O tratamento mecânico consistiu de abrasão em lixa d'água 500 em uma lixadeira politriz motorizada modelo APL-02 (Arotec) para eliminar o excesso de resina epóxi na superfície e expor o compósito. Então, o eletrodo foi imerso em isopropanol e submetido ao ultra-som em um banho USC 1400 (Unique), por 5 minutos, antes de cada medida. O mesmo procedimento foi feito em água, para a retirada de possíveis partículas da superfície do eletrodo.

2.3. Caracterização físico-química dos polímeros sem e com impressão molecular para o analito

Os polímeros com impressão molecular, MIP-FA e MIP-DCF e os polímeros sem impressão molecular, NIP-FA e NIP-DCF, foram caracterizados morfologicamente utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) (FEI MAGELLAN 400 L) no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) operando a 2 kV.

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram realizadas no Microscópio Philips CM-120 do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) com tensão de aceleração variando entre 31 kV a 380 kV para visualizar as partículas poliméricas ao nível de nanômetros, suas cavidades e deformações. A amostra foi dispersa em álcool isopropílico com algumas gotas de água para desaglomerar as partículas. Uma gota desta suspensão foi depositada em uma tela de cobre com diâmetro de 3 mm de carbono.

A determinação da área superficial do material polimérico foi feita a partir da adsorção física de gás inerte (nitrogênio) no equipamento Micromeritics ASAP 2020 V3, pelo método de Braunaer-Emmett-Teller (BET).

2.4. Procedimentos empregados para a avaliação dos eletrodos compósitos modificados com MIP-FA

A melhor composição de eletrodo utilizando 2,5; 5,0; 7,5 ou 10% (*m/m*) de MIP-FA foi determinada em CV e DPV, sob as mesmas condições descritas por Prasad e colaboradores (82,83). A melhor resposta em termos de resolução e intensidade da corrente foi obtida para o eletrodo compósito GPU contendo 2,5% (*m/m*) de MIP-FA (EGPU-2,5MIP-FA). Curvas analíticas foram obtidas utilizando este eletrodo, o eletrodo compósito GPU modificado com 2,5% (*m/m*) de NIP-FA (EGPU-2,5NIP-FA) e o eletrodo EGPU não modificado, para comparação, com $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV, variando-se a concentração de FA de 0,1 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito de suporte, tampão acetato pH 4,5.

2.4.1. Determinação do FA em formulações farmacêuticas comerciais

O eletrodo EGPU-2,5MIP-FA foi utilizado na determinação de FA em formulações farmacêuticas. A quantidade desta substância presente nas amostras foi determinada pelo método de Adição de Padrão.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (113), foram triturados vinte comprimidos de cada amostra e depois as porções do pó obtido, equivalentes a 5 mg de FA de Afopic®, Folifolin® e Folacin® foram pesadas. Em seguida foram dissolvidos em 100 mL de solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 13 para total dissolução do analito, para obter soluções correspondentes a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FA. As soluções foram submetidas a um banho de ultrassom por 20 minutos, a fim de assegurar a dissolução.

2.4.2. Método oficial de análise do FA

O método comparativo empregado para a determinação do FA foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com as recomendações da U.S. Pharmacopeia 29 (USP 29)(114). Cromatogramas foram obtidos utilizando um Cromatógrafo Shimadzu LC-

10AD UP, equipado com um detector SPD-10A UP UV, bomba LC-6AD (610), controlado pelo Software Class-VP. A coluna C-18 (15 cm x 4,6 cm x 5 μ m) foi mantida a temperatura ambiente e a fase móvel foi uma mistura de perclorato de sódio, fosfato de potássio monobásico, hidróxido de potássio 1 mol L⁻¹ e metanol, com uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. O comprimento de onda do detector foi fixado em 225 nm.

2.4.3. Teste de Interferentes na determinação do FA

Um estudo foi realizado utilizando como interferentes o metotrexato (MTX), cuja estrutura é muito semelhante à do FA, para verificar a seletividade do eletrodo EGPU-2,5MIP-FA. As interferências de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (AU) também foram avaliadas, considerando a relevância biológica destas substâncias e a presença de grupos funcionais semelhantes aos presentes em FA em suas estruturas. O eletrodo EGPU-2,5NIP-FA foi utilizado para comparação. Voltamogramas foram obtidos em DPV, para soluções contendo 0,90 μ mol L⁻¹ de FA em tampão acetato (pH 4,5), na presença de 0,60; 0,90; e 1,2 μ mol de L⁻¹ de cada interferente.

2.5. Procedimentos empregados para a avaliação dos eletrodos compósitos modificados com MIP-DCF

Inicialmente, para se avaliar o comportamento voltamétrico do DCF, foram obtidos voltamogramas cíclicos, utilizando os eletrodos GC, EGPU e EGPU-2,5MIP-DCF em solução de ácido perclórico 25 mmol L⁻¹ pH condicional (pH_{cond}) 1,6, com 10% de ACN (v/v), com $v = 50$ mV s⁻¹, sem analito e com DCF 0,2 mmol L⁻¹, nas mesmas condições que Blanco-Lopez (109).

A melhor percentagem de MIP-DCF na modificação do eletrodo compósito EGPU e a otimização dos parâmetros na determinação quantitativa do DCF foram realizados em DPV. Foram utilizados dois eletrólitos suporte para otimização: solução fosfato com valores de pH 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 de acordo com Christian e Purdy (115) e ácido perclórico 25 mmol L⁻¹ pH_{cond} 1,6.

Para a otimização da amplitude de pulso (a) e da velocidade de varredura de potencial (v), foi usado um planejamento fatorial 2ⁿ, sendo n = número de variáveis (a , v), no qual foram estabelecidos valores de $a = 10$ e 25 mV s⁻¹ e valores de $v = 25$ e 50 mV, totalizando-se quatro experimentos. Para otimização do potencial de acumulação, inicialmente

fixou-se um tempo de acumulação de 60 segundos e foram obtidos voltamogramas para os valores de potencial de acumulação de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 V (vs. SCE), com renovação da superfície entre cada medida. Escolhido o potencial de acumulação, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial por redissolução anódica para valores de tempo de acumulação de 0; 60; 120; 180; 240; 300; 360 e 480 segundos, para a escolha do melhor tempo de acumulação.

Assim, entre os eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5; 5,0; 7,5 ou 10% (m/m) de MIP-DCF, a melhor resposta em termos de resolução e intensidade da corrente foi obtida para o eletrodo contendo 2,5% (m/m) de MIP-DCF.

Os parâmetros foram otimizados, baseando-se nos trabalhos de Blanco-López (108,109) e, em seguida, curvas analíticas foram obtidas utilizando os eletrodos EGPU-2,5MIP-DCF, EGPU-2,5NIP-DCF, e EGPU não modificado, para comparação, variando-se a concentração de DCF de 0,010 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v).

2.5.1. Determinação do DCF em formulações farmacêuticas

O eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF foi utilizado na determinação do DCF em formulações farmacêuticas pelo método de Adição de Padrão.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (113), foram triturados vinte comprimidos de cada amostra e depois as porções do pó obtido, equivalentes a 50 mg de DCF de Biofenac®, Diclofenaco Sódico® e Voltaren® foram pesadas. Em seguida, foram dissolvidos em 100 mL de ACN para obter soluções correspondentes a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF. As soluções foram submetidas a um banho de ultrasson por 20 minutos, a fim de assegurar a dissolução.

2.5.2. Método oficial de análise do DCF

O método comparativo empregado para a determinação do DCF foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com o metodologia de Fernández-Llano (116). Cromatogramas foram obtidos utilizando um Cromatógrafo Shimadzu LC-10AD UP, equipado com um detector SPD-10A UP UV, bomba LC-6AD (610), controlado pelo Software Class-VP. A coluna C-18 (15 cm x 4,6 cm x 5 μm) foi mantida a temperatura

ambiente e a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e água (60:40) (v/v), com uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. O comprimento de onda do detector foi fixado em 278 nm.

2.5.3. Determinação do DCF em Urina sintética

O eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF foi utilizado para determinação do DCF em amostra de urina sintética, preparada de acordo com Laube e colaboradores (117) como mostra a Tabela 6. A amostra foi intencionalmente enriquecida com alíquotas da solução estoque $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF em ACN, de forma a se obter concentração de 100 nmol L^{-1} de DCF. A quantidade de DCF foi determinada pelo método de adição de padrão.

Tabela 6 - Composição da Urina artificial

Substância	Urina sintética / g L^{-1}
CaCl₂ . H₂O	1,103
NaCl	2,925
Na₂SO₄	2,25
KH₂PO₄	1,40
KCl	1,60
NH₄Cl	1,00
Urea	25,00
Creatinina	1,10
pH	6,0

2.5.4. Teste de interferentes na determinação do DCF

Devido à semelhança estrutural com a molécula do DCF, os interferentes, ácido mefenâmico (AMFN) e ácido meclofenâmico (AMCFN) foram utilizados para avaliar a seletividade do eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF. O eletrodo EGPU-2,5NIP-DCF foi utilizado para comparação. Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos para soluções contendo 150 nmol L^{-1} DCF em solução de ácido perclórico 25 mmol L^{-1} ($\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$), com 10% de ACN (v/v), na presença de 75, 150 e 300 nmol L^{-1} de cada interferente.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Ácido Fólico

3. Resultados e Discussão

3.1. Ácido Fólico

3.1.1. Síntese do MIP e Confeção dos Eletrodos Compósitos de GPU Modificados

A síntese do MIP foi baseada na co-polimerização do monômero funcional TAT e do agente reacional de ligação inter-cruzada EGDMA, que interagem com as moléculas do FA, antes da polimerização. Depois da remoção das moléculas do analito do polímero formado, sítios de ligação são deixados (Figura 3).

Figura 3 - O esquema representativo da impressão molecular e posterior remoção do FA no MIP e sua inserção no eletrodo compósito GPU.

3.1.2. Caracterização do MIP-FA e NIP-FA

Para a caracterização dos MIP-FA e NIP-FA foi utilizado o método de Braunaer-Emmett-Teller (BET) para calcular a área superficial, a microscopia eletrônica de varredura (SEM) para visualizar a morfologia dos polímeros e imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), para visualizar as deformações das partículas.

3.1.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As imagens de SEM de ambas as amostras, MIP-FA e NIP-FA são apresentados nas Figura 4a/4e e 4b/4f, respectivamente.

Figura 4-Imagens de SEM do MIP-FA (a, c, e) e do NIP-FA (b, d, f) com magnificações de 250x, 5.000x e 200.000x, respectivamente.

Nas Figuras 4a e 4b as partículas de MIP-FA e NIP-FA apresentam morfologia de blocos com diâmetro médios variando entre 4 e 150 μm .

Sob ampliações maiores de 5000x (Figura 4c e 4d), ambas apresentam geometria semelhante a aparente rugosidade de superfície com irregularidades nos dois casos. Ampliando-se 200.000x (Figura 4e e Figura 4f) nota-se novamente semelhança estrutural em ambos os casos com poros de ordem de 100 nm e estruturas nanométricas de crescimento polimérico.

Apesar das imagens serem tridimensionais, sua ampliação não foi suficiente para visualizar as cavidades da impressão do analito no polímero.

3.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As Figura 5a e 5b apresentam imagens das partículas do MIP-FA e do NIP-FA, respectivamente, obtidas pela microscopia eletrônica de transmissão.

As Figura 5a e Figura 5b mostram uma micrografia representativa de várias que foram realizadas para o MIP-FA e o NIP-FA, respectivamente. Pode-se observar que foi possível dispersar as partículas de MIP e visualizá-las separadamente (Figura 5a). O mesmo não aconteceu com o as partículas de NIP-FA que continuaram com pequenos aglomerados (Figura 5b). Verificaram-se, a partir das imagens de TEM, partículas do MIP com diversos tamanhos na ordem de nanômetros e com nanocavidades menores e maiores sobre a superfície das partículas do polímero. Pode-se inferir que no momento da polimerização o molde foi realizado de forma aleatória com aglomerados de moléculas de FA de vários tamanhos. Com relação às partículas de NIP-FA não foram visualizadas cavidades em sua superfície, mas apenas partículas maciças aglomeradas com formatos irregulares.

Como as imagens fornecidas pelo TEM são bidimensionais, utilizou-se o Matematica® para criar uma imagem tridimensional com as nanocavidades. Selecionou-se dentro de uma escala de tons de cinza da imagem, uma cor para o cinza escuro e outra cor para o cinza mais claro. O software reconhece todos os pontos de cores e cria uma imagem tridimensional como mostrado nas Figura 5c e 5d. Podem-se notar pequenas deformações na superfície do MIP (Figura 5c), enquanto não se observou estas deformações na superfície do NIP-FA (Figura 5d).

Figura 5 - Imagens bidimensionais do TEM do (a) MIP-FA com ampliação de 31000x e (b) NIP-FA com ampliação de 175000x e suas respectivas imagens tridimensionais criadas de um programa de tratamento de dados (c) MIP-FA e (d) NIP-FA apresentadas nas cores verde (plano de fundo), azul claro, azul escuro, rosa, vermelho, laranja e amarelo (mais longe do plano).

Para estimar a área e o diâmetro médio das partículas e das cavidades presentes no MIP, utilizou-se um programa de tratamento de imagens. As partículas de MIP foram divididas em dois grupos de áreas da ordem de 10^3 e 10^4 nm² e diâmetro médio da ordem de 10 e 100 nm, respectivamente, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Área e diâmetro médio das partículas do MIP-FA

Partículas do MIP-FA		
Grupo	Área (nm ²)	Diâmetro médio (nm)
1	$(2,4 \pm 0,9) \times 10^3$	$(5 \pm 1) \times 10^1$
2	$(3 \pm 2) \times 10^4$	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^2$

As cavidades das partículas do MIP também foram selecionadas e com um programa de tratamento de imagens obteve-se dados da área e do diâmetro médio (Tabela 8).

Tabela 8 - Área e diâmetro médio das cavidades do MIP-FA

Cavidades do MIP-FA		
Grupo	Área (nm ²)	Diâmetro médio (nm)
1	$(2 \pm 1) \times 10^1$	6 ± 2
2	$(3 \pm 2) \times 10^2$	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^1$
3	$(4 \pm 2) \times 10^3$	$(6 \pm 2) \times 10^1$
4	$(3 \pm 0,5) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^2$

As cavidades foram divididas em quatro grupos variando a ordem de grandeza da área de 10 a 10^4 nm². De acordo com o software ACD / Chem Sketch®, o volume molar do FA é 273,3 cm³ mol⁻¹, ou seja, um volume de 0,454 nm³ por molécula. Supondo que seja uma esfera, uma molécula de FA teria uma área de 2,86 nm² e um raio de aproximadamente 0,48 nm.

Estas nanocavidades podem estar relacionadas com a formação de sítios ativos de uma ou várias moléculas de FA, pois o processo de impressão no momento da polimerização é aleatório e não se pode afirmar que a impressão molecular seja formada para cada molécula de FA.

3.1.2.3. BET

Pela análise de BET foi possível obter uma área superficial de 279,7 e de 153,2 m² g⁻¹ para o MIP-FA e o NIP-FA, respectivamente. Pode-se inferir que o aumento de 82,6% na área do MIP, em relação ao NIP-FA, se deve às diferenças morfológicas e de superfície foram provocadas pela impressão da molécula molde no polímero, o que corrobora os dados de TEM.

3.1.3. Estudos Voltamétricos dos Eletrodos EGPU-MIP-FA

O comportamento do FA em eletrodo não modificado e nos eletrodos modificados com diferentes percentagens de MIP foi inicialmente avaliado em voltametria cíclica, para identificar a melhor composição do eletrodo.

Inicialmente, os voltamogramas apresentados na Figura 6 mostram o comportamento do FA 1,0 mmol L⁻¹ em solução de fosfato pH 7,8, utilizando os eletrodos compósitos modificados com as diferentes percentagens de MIP e com o eletrodo compósito GPU sem modificação, em $v = 25$ mV s⁻¹, semelhante ao que descreveram Prasad e colaboradores (83).

Figura 6 - Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L⁻¹ em solução de fosfato pH 7,8 com velocidade de varredura de potencial $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando os eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (m/m) de MIP e o eletrodo GPU sem modificação.

Em todos os voltamogramas cíclicos da Figura 6, observou-se um pico de oxidação em, aproximadamente, +0,8 V (vs.SCE). Foi possível observar também picos de redução em -0,4 V e em -0,7 V (vs. SCE).

Gall & Van Den Berg (81) obtiveram voltamogramas de redissolução catódica para determinação de 100 nmol L⁻¹ de FA em tampão acetato pH 5, com pré-concentração de 60s a -0,2 V, tempo de repouso de 15 s, amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de potencial de 20 mV s⁻¹ e encontraram três picos de redução em -0,5; -0,8 e -1,2 V (vs. SCE), com intensidades na ordem de 1 nA, utilizando um eletrodo gotejante de mercúrio. Entretanto, nos voltamogramas da Figura 6, a intensidade da corrente dos picos foi da ordem de 1 μA, que pode ser considerada uma corrente baixa para a concentração relativamente elevada do analito, neste caso, da ordem de mmol L⁻¹.

De acordo com El-Maali e colaboradores(80), durante a varredura anódica, um pico de oxidação apareceu em cerca de 0,8 V (vs. SCE), relacionado com a perda de dois elétrons e dois prótons. Na varredura catódica (81), dois picos de redução foram observados. O primeiro pico de redução, em -0.4 V (vs. SCE), se deve ao ganho de dois elétrons e dois prótons, seguido por uma tautomerização da molécula e o segundo pico em cerca de -0,8 V (vs. SCE), é devido a uma redução irreversível.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 7 apresentam o comportamento voltamétrico do FA, utilizando as mesmas condições descritas na Figura 6, mas alterando o sentido da varredura do potencial, como feito por Prasad e colaboradores (83).

Pode-se observar o pico de oxidação do FA próximo a 0,8 V (vs. SCE), semelhante àquele observado também por El-Maali (80), quando utilizou um CPE modificado com ácido palmítico e ácido esteárico.

Porém, houve diferença nas intensidades de corrente dos eletrodos compósitos modificados em relação ao eletrodo EGPU sem modificação que chega a 10%, como é o caso da intensidade da corrente de pico obtida pelo EGPU-10MIP-FA, mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Correntes obtidas por CV utilizando diferentes EGPU

Eletrodos	GPU	2,5%	5,0%	7,5%	10%
$I_p/10^{-6} \text{ A}$	8,83	8,94	9,42	7,80	9,69

Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L⁻¹ em solução fosfato pH 7,8, com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando os eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5; 5; 7,5 e 10% (m/m) de MIP e o eletrodo GPU sem modificação.

Entretanto, voltamogramas cíclicos obtidos em tampão acetato pH 4,5, como sugerido por Le Gall e colaboradores (81) (Figura 8) mostraram resultados melhores que em solução fosfato (Figura 7), em relação à definição de pico e o potencial de oxidação mais baixo. Os picos apresentados foram mais intensos e mais bem definidos do que aqueles obtidos em solução fosfato. Além disso, estes picos de redução não ficaram tão perto da descarga do eletrólito suporte, como ocorreu na oxidação, apresentando uma linha base com perfil mais adequado para a extrapolação. Assim, o processo de redução foi escolhido para ser investigado com mais profundidade.

Figura 8-Voltamogramas cíclicos obtidos para FA 1,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato (pH 4,5), com $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando o eletrodo EGPU não modificado e os eletrodos modificados com 2,5, 5,0 e 7,5% (m/m) de MIP-FA.

A Figura 8 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos compósitos GPU com diferentes percentagens de MIP em tampão acetato pH 4,5. Nestes voltamogramas foi possível observar um pico anódico de baixa intensidade em 0,69 V (*vs.* SCE) relacionado à oxidação do FA e dois picos catódicos em -0,41 e -0,65 V (*vs.* SCE). Estes picos de redução têm picos de oxidação correspondentes com intensidade muito baixas em -0,49 e -0,33V (*vs.* SCE), já discutidos por Luo (118).

Dois picos reversíveis de intensidade muito baixa anódico e catódico em +0,43 / 0,40 V (*vs.* SCE) foram atribuídos a grupos funcionais da poliuretana presente no eletrodo EGPU sem modificação como, anteriormente reportado (19).

De acordo com El-Maali (80) ao utilizar os eletrodos de pasta de carbono modificados com ácido esteárico e ácido palmítico para determinar FA em tampão universal em DPCSV, observaram-se dois picos, sendo o primeiro pico referente à primeira etapa de oxidação (Figura 9),, como representado no mecanismo abaixo em 0,8 V (*vs.* SCE) referente ao processo

A Figura 9 mostra o mecanismo de oxidação biológica do FA proposto por El-Maali (80). Considerando-se apenas a etapa de oxidação eletroquímica do FA, pode-se dizer que há uma perda de 2 prótons e 2 elétrons (reação 1).

Figura 9 - Mecanismo de oxidação biológica do FA.

Fonte: EL-MAALI, N.A. "Carbon paste electrodes modified with palmitic acid and stearic acid for the determination of folic acid (vitamin E9) in both aqueous and biological media", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 27, 465, 1992.

Le Gall & Van Den Berg (81) observaram picos de redução de FA em -0,5; -0,8 e -1,2 V (vs. SCE), em solução fosfato pH = 5, mas não descreveram processos de oxidação nessas condições. Em pH 8,5, os autores observaram apenas um pico de redução em -0,8 V, com um pico de oxidação em torno de +0,8 V (vs. SCE).

Esses mesmos autores propuseram um mecanismo de redução do FA, apresentado na Figura 10.

Reação 1:

Reação 2:

Reação 3:

Reação 4:

Figura 10 - Comportamento eletroquímico do FA.

Fonte: Le Gall, A.C.; Van den Berg, C.M.G. "Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry", *Analytica Chimica Acta*, 282, 459, 1993.

Como só foi possível estudar qualitativamente o comportamento voltamétrico do FA por CV e não foram observadas diferenças nas intensidades de corrente (Figura 7), optou-se por avaliar os eletrodos em voltametria de pulso diferencial (DPV), uma técnica mais sensível que CV, usando concentrações mais baixas de FA.

3.1.4. Otimização da porcentagem do modificador

Para a escolha da melhor porcentagem de MIP-FA na composição do eletrodo compósito, voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos com eletrodos contendo 2,5, 5,0, 7,5, e 10% (*m/m*) de modificador em solução fosfato (pH 4,2) e tampão acetato (pH 4,5) em uma região catódica de 0,0 a -1,2 V (Figura 11), tomando-se a corrente no potencial de pico e usando a linha base ombro a ombro.

Figura 11 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em (a) solução fosfato pH 4,2 e (b) tampão acetato pH 4,5 dos eletrodos modificados com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (*m/m*) de MIP, em amplitude de 25 mV e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Em DPV foram observados perfis semelhantes para os eletrodos com MIP-FA entre 2,5 e 7,5% (*m/m*), enquanto que a resolução foi perdida e o pico foi distorcido quando a percentagem de MIP-FA foi aumentado para 10%. Além disso, a intensidade de corrente de pico foi maior em menores percentagens de MIP-FA (Tabela 10). O eletrodo com 2,5% (*m/m*) de MIP-FA foi, portanto, selecionado para utilização nos estudos seguintes.

Através da Tabela 10 observa-se que o eletrodo com 5% de modificador mostrou menor intensidade de corrente, mas que podem ser consideradas na mesma ordem de grandeza das intensidades de corrente de pico obtidas pelos eletrodos com 7,5 e 10% de MIP-FA. Talvez isso ocorra devido a problemas de homogeneização do compósito.

Tabela 10- Correntes obtidas a partir dos voltamogramas de pulso diferencial para o FA em solução fosfato (pH 4,2) e tampão acetato (pH 4,5)

Meio eletrolítico	I_p (μA) para % MIP-FA (<i>m/m</i>)				
	EGPU*	2,5	5,0	7,5	10
Fosfato	1,76	2,48	2,25	2,45	1,61
Acetato	2,38	4,48	2,83	3,76	3,23

*Eletrodo não modificado

3.1.5. Escolha do eletrólito suporte

Como a redução do FA é dependente do pH, o estudo do efeito do pH do meio na resposta voltamétrica do eletrodo MIP 2,5% (*m/m*) foi realizado, utilizando 10 mmol L⁻¹ de FA em solução fosfato, com valores de pH 2,2, 4,2, 6,0 e 8,6 (Figura 12). As medidas foram feitas com $a = 25$ mV e $v = 10$ mV s⁻¹, como anteriormente utilizado por Prasad e colaboradores (83).

Nos voltamogramas, pode-se observar que, no processo de redução, há dois picos, quando o pH varia de 4,0 a 6,0 e tornou-se um único pico novamente em pH superior a 6,0. Isto pode ser explicado pela redução de formas ácidas e básicas de FA, uma vez que seu pKa é 4,7 (82). Também observou-se que, com o aumento do valor de pH, esses picos de redução são deslocados para valores menores de potencial.

Utilizando o eletrodo compósito com 2,5% (*m/m*) de MIP, maior intensidade de corrente foi obtida com pH 4,2, o qual foi escolhido para os estudos seguintes.

O efeito da natureza do eletrólito suporte também foi avaliado em DPV, utilizando solução fosfato pH 4,2 e tampão acetato pH 4,5, com a medida das correntes nos potenciais em que o pico foi mais intenso. Os voltamogramas (Figura 13) mostraram uma melhor definição de pico e maior intensidade de corrente, utilizando o tampão acetato pH 4,5, que foi, portanto, utilizado nos estudos seguintes.

Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA 10 µmol L⁻¹ em solução fosfato com eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5% (*m/m*) de MIP, com $a = 25$ mV e $v = 10$ mV s⁻¹, em diferentes valores de pH.

Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução fosfato pH 4,2 e tampão acetato pH 4,5 com eletrodos compósitos GPU modificados com 2,5% (*m/m*) de MIP, com amplitude de 25 mV e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

3.1.6. Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial em diferentes concentrações de FA (Figura 14), para os eletrodos EGPU, EGPU-2,5MIP-FA e EGPU-2,5NIP-FA, para avaliar o efeito da presença do MIP-FA na sensibilidade do eletrodo.

Como mencionado anteriormente, dois picos de redução, em torno de -0,52 (pico a) e -0,58 V (pico b) (*vs.* SCE), foram observados em pH 4,5. As correntes foram, portanto, medidas nos potenciais referentes a estes dois picos, a fim de avaliar a sensibilidade, devido à presença de MIP-FA e NIP-FA nos eletrodos compósitos, em comparação com o eletrodo de GPU não modificado. Os voltamogramas obtidos (Figura 14a-c) mostraram que, em todos os casos, as correntes capacitiva e faradaica aumentaram com o aumento da concentração de FA.

As Figura 15a e Figura 15b apresentam sobreposições das curvas analíticas obtidas para o EGPU-2,5NIP-FA, EGPU-2,5MIP-FA e EGPU em -0,52 e -0,58 V (*vs.* SCE), respectivamente. Acima de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, houve uma tendência para a saturação dos sítios ativos, resultando em uma corrente de pico constante, como o aumento da concentração de

FA. As inserções nas Figura 15 a e Figura 15b mostram as regiões lineares em concentrações mais baixas.

a)

b)

c)

Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial para o FA em concentrações entre 0,1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão acetato pH 4,5, $a = 50 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, para os eletrodos: (a) EGPU, (b) EGPU-2,5MIP-FA e (c) EGPU-2,5NIP-FA.

a)

Figura 15- Curvas analíticas para o eletrodo EGPU, EGPU-2,5MIP-FA e EGPU-2,5NIP-FA, usando o pico em (a) $-0,52 \text{ V (vs. SCE)}$ e (b) $-0,58 \text{ V (vs. SCE)}$.

A Tabela 11 resume os resultados obtidos com os eletrodos modificados e não modificados nos potenciais $-0,52$ e $-0,58 \text{ V (vs. SCE)}$.

Tabela 11 - Figuras de mérito correspondentes aos picos em $-0,52$ e em $-0,58 \text{ V (vs. SCE)}$

Potencial de Pico V (vs. SCE)	Eletrodos	Região linear $(\mu\text{mol L}^{-1})$	Coefficiente de Correlação	Sensibilidade $(\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1})$	LOD $(\mu\text{mol L}^{-1})$
-0,52	MIP-FA	0,6-2,0	0,992	0,69	0,17
	NIP-FA	0,6-1,5	0,992	0,88	0,16
	GPU	0,6-1,5	0,992	0,88	0,16
-0,58	MIP-FA	0,6-2,0	0,999	0,56	0,03
	NIP-FA	0,6-2,0	0,975	0,65	0,30
	GPU	0,6-2,0	0,975	0,66	0,30

Para as correntes de pico obtidas em $-0,52 \text{ V (vs. SCE)}$, pode ser visto que, embora a sensibilidade tenha sido ligeiramente mais elevada para o EGPU e EGPU-2,5NIP-FA, o intervalo linear foi maior para o EGPU-2,5MIP-FA. O limite de detecção (LOD) foi calculado como três vezes o desvio padrão do branco, dividido pela inclinação da reta (115), e foi semelhante para todos os eletrodos, nesse potencial.

No caso das correntes de pico obtidas em $-0,58 \text{ V (vs. SCE)}$, apesar dos eletrodos EGPU e EGPU-2,5NIP-FA apresentarem sensibilidade mais alta, os intervalos lineares foram

os mesmos para todos os eletrodos e LOD foi menor para o eletrodo EGPU-2,5MIP-FA, o que indica que este eletrodo é capaz de proporcionar uma melhor repetibilidade e dispersão reduzida (como confirmado pelos coeficientes de correlação). Portanto, comparando os dois potenciais, o eletrodo EGPU-2,5MIP-FA mostrou vantagem apenas em relação ao LOD, em -0,58 V (vs. SCE).

Quando comparados com outros eletrodos de grafite apresentados na Introdução, nota-se que seus LOD variam entre 10^{-6} a 10^{-10} mol L⁻¹, sendo muitos deles mais sensíveis que o presente trabalho. Entretanto, esses limites de detecção baixos são obtidos com etapas longas de pre-concentração para preparação de filmes, que resultam em resultados pouco reprodutíveis (119), ou são baseados no uso de eletrodos de mercúrio, envolvendo toda a problemática ambiental e de saúde que envolve esse metal (81,120,121). Há, ainda, eletrodos que envolvem o crescimento de filmes sobre o carbono vítreo (122), o qual é perdido na renovação de superfície. O presente eletrodo, embora apresente um LOD relativamente mais elevado, possui vantagens em relação à esses eletrodos, como boa repetibilidade e reprodutibilidade e possibilidade de produção em massa.

Os LOD obtidos pelos dois eletrodos propostos por Prasad e colaboradores foram menores devido a aplicação da pré-concentração do analito na superfície do eletrodo antes das medidas voltamétricas, o que não foi realizado no presente trabalho. Entretanto, o EGPU-MIP-FA desenvolvido neste trabalho apresenta algumas vantagens como o MIP que está presente em todo o corpo do compósito do eletrodo, enquanto que no eletrodo de grafite de lápis com filme de sol-gel modificado o MIP está presente somente na superfície do eletrodo (82). Outra vantagem é a presença da poliuretana no compósito, dando ao mesmo maior resistência e reatividade em relação ao eletrodo de fibra de carbono modificado com MIP (83). A principal inovação desta pesquisa (38) está na investigação da seletividade do eletrodo para moléculas de tamanho grande e com vários grupos funcionais presentes na estrutura como o FA, com o MIP para esse analito inserido na matriz do compósito.

3.1.7. Determinação do FA em formulações farmacêuticas

Após otimizar todas as condições conforme descrito, anteriormente, o ácido fólico foi determinado nas amostras farmacêuticas comerciais Afopic®, Folifolin® e Folacin® pelo método de adição de padrão, em DPV, utilizando o eletrodo EGPU-2,5MIP-FA. Alíquotas sucessivas de solução padrão de FA foram adicionadas às amostras contendo 0,9 mmol L⁻¹ de FA, em tampão acetato pH 4,5, a fim de obter concentrações de 0,6, 0,9, e 1,2 mmol L⁻¹ de

FA. As medidas foram feitas em triplicata. As interferências dos excipientes presentes nas amostras comerciais (Tabela 12) foram avaliadas no teste de recuperação.

Tabela 12 - Excipiente das formulações farmacêuticas utilizadas neste estudo

Formulações	Excipientes
Folacin®	Lactose,amidogliconato de sódio, estearato demagnésio, talco, dióxido detitânio, polietilenoglicol, trietilcitrato, polissorbato, copolimero ácidometacrilico, simeticona, água destilada, agente de coloração, álcool isopropílico
Afopic®	Estearato demagnésio, celulosemicrocristalina, croscarmelosesódica
Folifolin®	Lactose monohidratada, talco, estearato demagnésio, celulose microcristalina, croscarmelosesódica, laurilsulfatode sódio, povidona

A Tabela 13 apresenta as concentrações de FA obtidas por DPV com o EGPU-2,5MIP-FA e os resultados obtidos utilizando o procedimento oficial, HPLC (114). Os resultados obtidos por DPV estão de acordo com os obtidos utilizando HPLC, em um intervalo de confiança de 95%, de acordo com o teste *t* de Student, que confirmou a eficiência e o desempenho satisfatório do eletrodo. Também foi avaliado o efeito de matriz, no qual as recuperações médias obtidas foram de 97 ± 7 ; 97 ± 9 , e $102 \pm 8\%$ para Afopic®, Folacin® e Folifolin®, respectivamente, indicando que não houve interferência significativa dos componentes das amostras analisadas pelo método proposto (Tabela 14).

Tabela 13 - Determinação do FA em formulações farmacêuticas pelo método de Adição de Padrão, usando eletrodo de EGPU-2,5MIP-FA por DPV e HPLC

Amostras	Rotulado / mg	DPV / mg	E_1^a / %	HPLC/ mg	E_2^b / %	E_3^c / %
Afopic®	5,00	4,71	- 5,78	4,82	- 3,62	- 2,31
Folifolin®	5,00	4,64	- 7,14	4,76	- 4,82	- 2,44
Folacin®	5,00	5,21	+ 4,25	5,09	+ 1,79	+ 2,43

a = DPV vs Rotulado: $((\text{DPV} - \text{Rotulado}) / \text{Rotulado}) \times 100\%$

b = HPLC vs Rotulado: $((\text{HPLC} - \text{Rotulado}) / \text{Rotulado}) \times 100\%$

c = DPV vs HPLC: $((\text{DPV} - \text{HPLC}) / \text{HPLC}) \times 100\%$

Tabela 14 - Valores de recuperação do FA nas três formulações farmacêuticas analisadas

Amostras	Adição	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Afopic®	1 ^a	0,60	0,54	89,7
	2 ^a	0,90	0,88	98,3
	3 ^a	1,20	1,24	104
				Média = 97,2
Folifolin®	1 ^a	0,60	0,52	87,3
	2 ^a	0,90	0,93	104
	3 ^a	1,20	1,21	102
				Média = 97,4
Folacin®	1 ^a	0,60	0,61	101
	2 ^a	0,90	0,99	110
	3 ^a	1,20	1,13	94,1
				Média = 102

Um único eletrodo de compósito EGPU-2,5MIP-FA foi utilizado em todas as medidas descritas neste trabalho, não sendo necessário regenerar a superfície entre medidas sucessivas, o que sugere que o sensor apresenta uma vida útil relativamente longa.

Os resultados descritos acima demonstraram que o EGPU-2,5MIP-FA pode ser utilizado com sucesso na determinação quantitativa de FA em formulações farmacêuticas comerciais, sem interferência dos excipientes presentes nestas matrizes, comum ligeiro aumento na sensibilidade em baixas concentrações quando comparadas com o EGPU e EGPU-2,5NIP-FA.

3.1.8. Estudo de seletividade

Um dos motivos do uso do MIP como modificador de um eletrodo é a possibilidade de melhorar sua seletividade. No presente caso, o FA, que é uma molécula relativamente grande, contendo diversos grupos funcionais na sua estrutura, foi utilizado para avaliar a seletividade do EGPU-2,5MIP-FA. Testes de interferência foram realizados utilizando o MTX, uma substância com um tamanho molecular relativamente grande e estrutura química muito semelhante à do FA, assim como moléculas menores, que contêm grupos funcionais também presentes na estrutura do FA e que foram escolhidos com base na sua importância biológica. As estruturas de FA e dos interferentes utilizados são ilustrados na Figura 16. A Tabela 15 resume os resultados de interferência do MTX em soluções de FA.

Tabela 15 - Relação de interferência do MTX no sinal referente a $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FA

C_{FA} : C_{MTX} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	MIP-FA 2,5%		Esperada	NIP-FA 2,5%	
	I_p (μA)	Interferência (%)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)
0,6:0,0	1,76	-	-	0,97	-
0,6:0,6	2,99	69,6	100	1,68	73,4
0,6:0,9	3,28	86,0	150	2,07	114
0,6:1,2	3,67	108	200	2,16	123

Pode-se concluir que a interferência do MTX ocorreu em todos os casos, tanto para o MIP-FA quanto para o NIP-FA. No entanto, é interessante notar que, embora a interferência esperada fosse de 100% (um sinal de corrente igual a duas vezes o sinal de FA sozinho) quando as concentrações de FA e MTX eram iguais, os aumentos reais foram de apenas 69,6 e 73,4%, para os eletrodos modificados com MIP-FA e NIP-FA, respectivamente. O aumento de sinal esperado para uma mistura na proporção 1:2 (FA: MTX, mol/mol) deveria

ser de 200% (três vezes o sinal do FA), mas os valores medidos foram 108 e 123% para os eletrodos MIP-FA e NIP-FA, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando uma proporção de 1: 1,5 (FA: MTX, mol/mol).

Estes resultados sugerem que, embora a interferência tenha sido relativamente grande, o MIP-FA foi capaz de discriminar o analito na presença do interferente, apesar da semelhança estrutural entre o FA e o MTX, de modo que a interferência observada foi menor que a esperada, e que a encontrada para o NIP-FA.

O FA e o MTX têm estruturas muito próximas, incluindo grupos funcionais semelhantes. Tais grupos funcionais certamente interagem com os grupos da matriz do metacrilato, uma vez que este responde para ambos os analitos, não importando se foi ou não impresso com FA. Quando a mesma concentração de FA e MTX está presente em solução, parece que ainda há cavidades disponíveis para pré-concentração de ambos analitos, resultando assim em um não reconhecimento do FA no NIP-FA e MIP-FA, surgindo uma interferência grave. Quando a concentração de MTX aumenta, uma competição pelas cavidades é estabelecida, sendo que o FA é favorecido pelo MIP-FA, enquanto que no NIP-FA não há qualquer discriminação entre FA e MTX, uma vez que não se têm cavidades para discriminar entre eles, resultando em uma maior interferência.

Os resultados obtidos para os testes de interferência de substâncias biologicamente relevantes como ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (AU) (Figura 16) foram obtidos utilizando o EGPU-2,5MIP-FA e estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Interferência de AA, DA e UA no sinal obtido para $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FA usando o EGPU-2,5MIP-FA

	Esperada	AA		UA		DA	
$C_{\text{FA}}:C_{\text{INTERFERENTE}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)	I_p (μA)	Interferência (%)
0,6:0,0	-	0,63	-	0,78	-	0,58	-
0,6:0,6	100	0,94	48,1	0,88	12,2	0,70	21
0,6:0,9	150	1,28	102	0,93	19,2	1,40	143
0,6:1,2	200	1,52	140	1,19	52,3	1,48	157

A interferência foi observada para todas as espécies avaliadas, especialmente AA e DA. A menor interferência observado para o UA, pode ter sido devido à sua estrutura rígida sem ramificações, em que os heteroátomos são fixos nos anéis, o que poderia dificultar a sua complexação nos locais de coordenação na cavidade do MIP, apesar da sua semelhança com a região da molécula do FA em que os anéis heterogêneos, contendo heteroátomos de nitrogênio estão presentes. Por outro lado, AA e DA possuem grupos funcionais em cadeias alifáticas, bem como grupos pendentes ligados a anéis, resultando em maior mobilidade

rotacional, o que pode ter facilitado a coordenação nos sítios ativos nas cavidades, resultando em uma maior interferência.

Figura 16–Fórmula estrutural do (a) FA, (b) MTX, (c) AA, (d) DA e (e) UA

Assim, a interferência nos MIPs parece estar relacionada com o processo de impressão quando a molécula molde é inserida na cavidade, durante a polimerização e interage com grupos funcionais dos monômeros, iniciadores e agentes de reticulação. A remoção do molde deixaria uma cavidade com grupos pendentes capazes de coordenar outras moléculas molde durante a análise. A utilização de uma grande molécula molde com diversos grupos funcionais diferentes na sua estrutura cria uma cavidade grande, cheia de sítios de coordenação, com a conformação do molde.

Assim, devem-se considerar duas fontes possíveis de interferência nos MIPs quando se usam moléculas molde de dimensões grandes. A primeira seria a interferência de moléculas também grandes, mas com estrutura e grupos funcionais semelhantes ao molde, que podem se coordenar aos sítios pendentes no polímero. Neste caso, o efeito foi ilustrado pela interferência do MTX. A segunda é resultante da interação de grupos funcionais presentes em pequenas moléculas, que apresentam semelhanças com aqueles presentes no molde. Assim, podem coordenar-se com sítios de coordenação da cavidade, tal como demonstrado pelos efeitos de AA e DA, e em menor proporção pelo UA. Neste caso, porém, a

mobilidade estrutural desses grupos funcionais tem papel importante ao tornar mais ou menos disponíveis para coordenação desses grupos funcionais.

Quando o molde é uma molécula pequena, apenas o efeito conformacional parece desempenhar um papel importante na seletividade, porque alguns grupos funcionais estão presentes. Exemplos disso incluem a utilização de moldes como paracetamol (29), piridoxina e epinefrina (resultados do grupo ainda não publicados), e outras moléculas (119,123).

3.2. Diclofenaco

3.2. Diclofenaco

3.2.1. Caracterização do MIP-DCF

As amostras de MIP-DCF e NIP-DCF foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e suas áreas superficiais foram medidas pelo método de BET.

3.2.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As imagens de SEM do MIP-DCF e do NIP-DCF estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17 -Micrografias de SEM para o MIP-DCF (a, c, e) e para o NIP-DCF (b, d, f), com magnificações de 250x, 5.000x e 200.000x, respectivamente.

Nas Figura 17a/c e Figura 17b/d já se verifica que o MIP-DCF e o NIP-DCF apresentam aspecto compacto e cristalino. As Figura 17e e Figura 17f mostram uma aglomeração porosa e mais deformações no MIP-DCF, enquanto que o NIP-DCF apresenta uma arranjo mais compacto entre as partículas.

Sob maior ampliação, 5.000 x, a superfície das partículas se apresenta porosa (Figs. 17.c e 17.d) mais irregular no caso dos DCF-MIP, sugerindo maior porosidade nesse caso.

As Figura 17e e Figura 17f, com ampliação de 200.000x, mostram uma aglomeração com poros maiores e mais deformações no MIP-DCF, enquanto que o NIP-DCF apresenta uma arranjo mais compacto entre as partículas.

3.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens bidimensionais de TEM para MIP-DCF e NIP-DCF estão apresentadas nas Figura 18a e 18b e suas imagens tridimensionais criadas com auxílio do Matematica® estão nas Figura 18c e 18d.

Figura 18 - Imagens bidimensionais do TEM do (a) MIP-DCF com ampliação de 31000x e (b) NIP-DCF com ampliação de 175000x e suas respectivas imagens tridimensionais criadas por um programa de tratamento de dados (c) MIP-DCF e (d) NIP-DCF apresentadas nas cores verde (plano de fundo), azul claro, azul escuro, rosa, vermelho, laranja e amarelo (mais longe do plano).

As Figura 18a e Figura 18b mostram uma micrografia representativa de várias que foram tiradas para o MIP-DCF e o NIP-DCF, respectivamente. Pode-se verificar que as partículas NIP-DCF são maciças e não possuem cavidades (Figura 18b) como observado em umas das partículas isoladas do MIP-DCF (Figura 18a). Para melhor visualizar esta diferença, observa-se as imagens construídas em 3D para o MIP-DCF e NIP-DCF nas Figura 18c e 18d, respectivamente.

Em relação ao MIP-DCF, foram observadas partículas poliméricas isoladas na escala nanométrica com vários tamanhos, com pequenas cavidades de áreas circulares, em sua maioria.

Com o auxílio do Matematica® as partículas das imagens de TEM foram selecionadas para calcular sua área e seu diâmetro médio (Tabela 17). O mesmo foi realizado com as cavidades destas partículas (Tabela 18).

Tabela 17 - Dimensões das partículas de MIP-DCF

Partículas do MIP-DCF		
Grupo	Área (nm ²)	Diâmetro médio (nm)
1	$(3 \pm 1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^2$
2	$1,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$

Tabela 18 - Dimensões das cavidades das partículas de MIP-DCF

Cavidades do MIP-DCF		
Grupo	Área (nm ²)	Diâmetro médio (nm)
1	$(5 \pm 2) \times 10^1$	$(6 \pm 2) \times 10^0$
2	$(3 \pm 2) \times 10^2$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^1$
3	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^3$	$(2,4 \pm 0,7) \times 10^1$

As partículas foram classificadas em dois grupos por terem áreas na ordem 10^4 e 10^6 nm² e diâmetros médios na ordem de 100 nm. Já as cavidades foram classificadas em três grupos com áreas variando de 10 , 10^2 e 10^3 nm² e diâmetros médios na ordem de 10 nm.

De acordo com o software ACD / Chem Sketch® o volume molar do DCF é 206,8 cm³ mol⁻¹, ou seja, um volume de 0,342 nm³ por molécula. Supondo que seja uma esfera, uma molécula de FA tem uma área de 2,366 nm² e um raio de aproximadamente 0,434 nm.

3.2.1.3. BET

A área superficial obtida para o MIP-DCF e NIP-DCF foi de 314,8 e 250,5 m² g⁻¹, respectivamente. O aumento de 25,6% na área superficial do MIP-DCF confirma a impressão molecular do diclofenaco na superfície do polímero, causando deformações na mesma, como já foi verificado nas imagens de TEM.

3.2.2. Estudo voltamétrico dos eletrodos EGPU-MIP-DCF

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 19 foram obtidos para avaliar o comportamento do DCF utilizando o eletrodo compósito GPU modificado com 2,5% (*m/m*) de MIP (EGPU-2,5MIP-DCF) em comparação ao eletrodo de carbono vítreo (GC). Os voltamogramas cíclicos foram realizados em solução de ácido perclórico 25 mmol L⁻¹, pH_{cond} 1,6, com 10% de ACN (*v/v*), com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, na mesma faixa de potencial e meio eletrolítico e velocidade de varredura de potencial utilizadas por Blanco-Lopez (109), visando a comparação dos resultados, já que aquele autor também fez uso de eletrodos de grafite e compósitos desse condutor aglutinado por diferentes polímeros.

Entretanto, trata-se de um meio relativamente agressivo, com a presença de HClO₄ e acetonitrila em concentração significativa, além de varreduras relativamente lentas, que expõem a superfície eletródica a um possível tratamento eletroquímico (124).

Há algum tempo este grupo de pesquisa vem observando a presença de sinais voltamétricos nos eletrodos de GPU (18,125,126), os quais foram atribuídos à resposta eletroquímica devida à presença de grupos funcionais da PU, ou mesmo do grafite, que seriam ativados quando os eletrodos são submetidos à ciclagem em potenciais mais elevados, dependendo do meio.

No presente trabalho, esse fenômeno foi observado com maior evidência, como pode ser observado na Figura 19. Inicialmente foi feito um experimento no qual eletrodos de carbono vítreo, GPU sem MIP e GPU com DCF-MIP foram submetidos a 5 ciclos sucessivos de potencial entre -0,2 e +1,2 V (*vs.* SCE) em solução contendo ácido perclórico 25 mmol L⁻¹, pH_{cond} 1,6, com 10% de ACN (*v/v*), a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Os resultados são apresentados na Figura 19a.

a)

b)

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos em solução ácido perclórico 25 mmol L⁻¹, pH_{cond} 1,6, com 10% de ACN (v/v), com $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, utilizando GC, EGPU e EGPU-2,5MIP-DCF (a) sem analito e (b) com DCF 0,2 mmol L⁻¹.

A Figura 19a mostra que, na ausência de DCF, o eletrodo GC não apresenta resposta voltamétrica nas ciclagens sucessivas, mostrando que não há evidência da presença de impurezas eletroativas na solução ou contaminações na cela ou nos eletrodos. Entretanto, tanto no GPU não modificado, quanto no modificado com DCF-MIP, nota-se um processo intenso, irreversível, em torno de 1,1 V, no primeiro ciclo que tende a desaparecer nas varreduras seguintes. Enquanto isso, surgem dois pares redox, referentes a processos reversíveis em 0,60/0,52 V e 0,35/0,30V. Tais eventos foram atribuídos à ativação de grupos

funcionais presentes na PU, pois também aparecem quando grafites de diferentes origens são utilizados.

Quando DCF é adicionado à solução, o eletrodo de GC apresenta um sinal irreversível em 0,84 V (*vs.* SCE, chamado aqui de I_{DCF}), que se desloca para potenciais mais positivos com a sequência das varreduras, se fixando em 1,0 V a partir do 4º ciclo, enquanto a corrente se atenua e se torna constante a partir do 3º ciclo. Isso sugere adsorção de produtos de oxidação na superfície do GC. Na reversão da varredura de potenciais, surge um pico de redução em torno de 0,50 V no primeiro ciclo. Nas varreduras seguintes se estabelece um sistema redox reversível com um processo oxidativo que se desloca para potenciais mais positivos com as varreduras sucessivas, tendendo a 0,70 V, associado a um processo redutivo que se fixa em 0,35 V na varredura de redução. Em relação a estes picos, Blanco-Lopez (2003), que utilizou GC em ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹ afirma que em pH 1,0, o DCF é oxidado irreversivelmente (I_{DCF}), gerando subprodutos dessa oxidação que se apresentam na forma dos processos reversíveis chamados, II_{DCF} e III_{DCF} .

Figura 20 - Mecanismo de oxidação do DCF segundo Razmi e colaboradores (127).

Nos eletrodos GPU modificado ou não, observa-se o surgimento de processo anódico irreversível em 0,831 V (*vs.* SCE) que diminui com os ciclos subsequentes e que foi atribuído à oxidação do DCF, I_{DCF} , segundo Blanco-Lopez (2004). No sentido da redução, nota-se um pico catódico em 0,834 V (*vs.* SCE), provavelmente, referente à redução do produto proveniente da oxidação do DCF. Nas varreduras seguintes surgem picos dos produtos de oxidação do DCF, como dito acima, em 0,401 e 0,617 V (*vs.* SCE), chamados de III_{DCF} e II_{DCF} , respectivamente. Notam-se também os picos provenientes dos grupos funcionais da PU em 0,59/0,55V (par PU_{I}) e 0,35/0,25V (par PU_{II}), que se apresentam de forma quase coincidente com esses processos.

Nos ciclos seguintes observa-se uma diminuição de intensidade do pico I_{DCF} e consequentemente um aumento seguido da estabilização de intensidade dos picos dos produtos II_{DCF} , III_{DCF} .

Entretanto, felizmente, de acordo com Blanco-Lopez (108), utilizando o GC, apenas o sinal do processo I_{DCF} é considerado um sinal analítico. Além disso, em concentrações de ordem de μmolar , o pico aumenta linearmente com a velocidade de varredura, indicando que o processo é controlado pela adsorção, enquanto que para concentrações entre 10^{-5} e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, o sinal se aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial, indicando que o processo ocorre por difusão.

Como resumo dessas observações pode-se concluir que o eletrodo GPU não deve ser usado em potenciais mais elevados que 1,0 V (vs. SCE), neste meio, para evitar o surgimento dos picos referentes aos grupos funcionais que poderiam interferir nos processos secundários do DCF. Porém, para fins quantitativos, utiliza-se o pico de oxidação do DCF, em torno de 0,8 V (vs. SCE), o qual não sofre influência dos picos dos grupos funcionais da PU.

Para confirmar essas observações e a possibilidade de usar quantitativamente o eletrodo GPU modificado com os DCF-MIPs, obtiveram-se também voltamogramas de pulso diferencial, sob condições semelhantes, utilizando os eletrodos GC e EGPU-2,5MIP-DCF para avaliar seu comportamento voltamétrico na determinação de DCF. Os resultados são mostrados na Figura 21.

Na primeira varredura da Figura 21a, usando o GC, observa-se o pico referente ao processo de oxidação, I_{DCF} , em 0,805 V (vs. SCE), com intensidade de corrente de 6,0 μA , medida a partir do branco. Com as subsequentes varreduras seu sinal diminui para 0,2 μA . Os picos relacionados aos processos de oxidação II_{DCF} e III_{DCF} aparecem na segunda varredura em 0,640 e 0,347 V (vs. SCE), nas ordens de μA e nA, respectivamente.

Na Figura 21b, para o EGPU-2,5MIP-DCF verifica-se um pico intenso de oxidação do DCF, I_{DCF} , em 0,786 V (vs. SCE), medindo 42 μA na primeira varredura. Na segunda varredura aparecem os picos de oxidação II_{DCF} e III_{DCF} , nos respectivos potenciais 0,581 e 0,357 V (vs. SCE), medindo 17 e 4,9 μA , respectivamente. Os picos observados no branco, em 0,308 e 0,547 V (vs. SCE) estão relacionados aos grupos funcionais da PU.

a)

b)

Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial para DCF $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando (a) GC e (b) EGPU-2,5MIP-DCF em solução ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), com $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$.

A partir da segunda varredura, ocorre a diminuição de intensidade de corrente do I_{DCF} e, conseqüentemente, o aparecimento dos picos dos subprodutos II_{DCF} e III_{DCF} seguido da adsorção do produto de reação, I_{DCF} , nas varreduras seguintes, como observado anteriormente em voltametria cíclica.

Também podem ser vistos sinais discretos em aproximadamente 0,20 e 0,45 V, referentes aos grupos funcionais da poliuretana, provenientes de tratamento eletroquímico, como já foi discutido acima.

3.2.3. Otimização da percentagem do modificador

Já que a DPV seria utilizada para fins quantitativos, seus resultados foram utilizados na escolha da melhor percentagem de MIP-DCF na modificação do eletrodo EGPU-MIP-DCF. Então, voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos para DCF 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio fosfato pH 7 com 10% ACN (v/v) com eletrodos compósitos grafite e poliuretana sem modificação (EGPU) e modificados com 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (m/m) de polímero com impressão molecular para diclofenaco (EGPU-MIP-DCF). Serão mostrados somente os voltamogramas obtidos com ele EGPU-2,5MIP-DCF sem e com o DCF (Figura 22), pois os voltamogramas obtidos com outros eletrodos apresentaram mesmo perfil.

Com a adição do DCF, observou-se nos voltamogramas da primeira varredura um pico de oxidação do DCF (I_{DCF}) em torno de 0,528 / 0,542 V (vs. SCE). Na segunda varredura o pico I_{DCF} se mantém, em menor intensidade, e aparece o outro pico em torno de 0,284 / 0,290 V (vs. SCE) referente a II_{DCF} , subproduto de oxidação do DCF.

Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DCF 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de solução fosfato pH 7 com 10% de ACN (v/v) com eletrodos EGPU-2,5MIP-DCF, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 23 apresenta os voltamogramas da primeira e da segunda varreduras de todos os EGPU modificados com MIP para comparação. O voltamogramas obtidos com o GC foram mostrados, com o propósito de ilustrar que o pico observado em 0,168 V (*vs.* SCE) nos outros eletrodos está relacionado à PU e não ao DCF.

Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial da (a) primeira e (b) segunda varredura obtidos para DCF 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de solução fosfato pH 7 com 10% de ACN (*v/v*), com EGPU sem modificação e modificados com 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10% (*m/m*) de MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A Tabela 19 mostra os valores dos picos de oxidação do DCF medidos na primeira e na segunda varreduras.

Tabela 19 - Correntes obtidas em DPV para picos de oxidação do DCF nas duas varreduras

		Pico	Corrente I_p / μA					
			GC	EGPU	EGPU-MIP-DCF / %			
					2,5	5,0	7,5	10
1ª Varredura	I_{DCF}	0,315	0,725	1,098	0,982	0,795	0,696	
2ª Varredura	I_{DCF}	0,271	0,533	0,715	0,668	0,553	0,528	
	II_{DCF}	0,122	1,636	2,067	1,496	1,293	0,934	

Os dados da Tabela 18 mostram significativo incremento na corrente de pico na ordem:

$$I_{GC} < I_{EGPU-MIP\ 10\%} < I_{EGPU-MIP\ 7,5\%} < I_{EGPU} < I_{EGPU-MIP\ 5\%} < I_{EGPU-MIP\ 2,5\%},$$

entretanto a corrente no eletrodo modificado diminui com o aumento da percentagem de MIP. Isso ocorre, provavelmente, devido à diminuição da quantidade de grafite, fase condutora, à medida que a percentagem de MIP aumenta, causando maior resistência à passagem de corrente.

Neste trabalho, o pico I_{DCF} localizado em torno de 0,534 V (*vs.* SCE), que se refere à oxidação do DCF, será o pico usado para fins quantitativos, pois é mais sensível que o pico II_{DCF} (0,285 V (*vs.* SCE)) em concentrações de DCF na ordem de $nmol\ L^{-1}$, na primeira varredura. Apesar de que o pico II_{DCF} , tem corrente elevada na segunda varredura não seria prático desenvolver um método com duas corridas DPV, para cada ponto. Portanto, o eletrodo escolhido para os estudos seguintes foi o EGPU-2,5MIP-DCF.

3.2.4. Escolha do meio eletrolítico e pH

Utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF em DPV, foi feito um estudo para a comparação da resposta eletroquímica do DCF, baseando-se nos trabalhos de Blanco-Lopez (108,109), que usou solução fosfato $0,1\ mol\ L^{-1}$ e a solução de ácido perclórico $25\ mmol\ L^{-1}$, $pH_{cond}\ 1,6$, respectivamente. Foram obtidos voltamogramas em solução fosfato com valores de pH 2,5; 3; 4; 5; 6 e 7 e em solução de ácido perclórico $25\ mmol\ L^{-1}$, $pH_{cond}\ 1,6$ (Figura 24).

A Figura 24 mostra os voltamogramas de pulso diferencial para DCF $20\ \mu mol\ L^{-1}$ em Ácido Perclórico $25\ mmol\ L^{-1}$ $pH_{cond}\ 1,6$ e em Fosfato $0,1M$ em pH 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 utilizando eletrodo de carbono vítreo e o eletrodo composto GPU modificado com 2,5%

(m/m) de MIP-DCF a $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ na faixa de potenciais entre 0,1 e 1,0 V (vs. SCE).

c)

d)

e)

f)

Figura 24 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DCF 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (a) ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH_{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), e em solução fosfato em pH (b) 2,5; (c) 3,0; (d) 4,0; (e) 5,0; (f) 6,0 e (g) 7,0 com 10% de ACN (v/v), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A Tabela 20 aponta os valores de potencial e de corrente para o pico I_{DCF} nas soluções de ácido perclórico e solução fosfato em diferentes valores de pH.

Tabela 20 - Valores de corrente e potencial para o pico de oxidação do DCF obtidos a partir dos voltamogramas de pulso diferencial da primeira varredura

Varredura	Pico	pH meio eletrólito							
		HClO_4				Solução fosfato			
		1,6	2,5	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	
1 ^a	E / V	I_{DCF}	0,803	0,764	0,730	0,681	0,632	0,593	0,534
	I / μA	I_{DCF}	7,751	5,716	3,339	3,328	1,203	1,376	0,976
2 ^a	I_{DCF}		4,820	2,809	1,945	1,566	0,683	0,955	0,585

Pela Figura 24 e Tabela 20 pode-se observar que, com o aumento do pH em solução fosfato, o pico de oxidação é deslocado para potenciais menos positivos e há uma diminuição significativa na intensidade de corrente.

A Tabela 20, o resultado da intensidade de corrente do pico do I_{DCF} na primeira e na segunda varredura é mais intenso em meio Ácido perclórico 25 mmol L^{-1} em pH_{cond} 1,6.

Comparando-se os voltamogramas em ácido perclórico pH_{cond} 1,6 e solução fosfato pH 2,5 (Figura 25), observa-se que, tanto na primeira, quanto na segunda varredura, a intensidade do pico é maior em ácido perclórico. Portanto, apesar de o potencial de oxidação ser um pouco mais deslocado para valores mais altos, optou-se por esse eletrólito para os estudos seguintes.

Assim, a tentativa de usar H_3PO_4 , que é um eletrólito menos agressivo para o polímero PU aglutinante do eletrodo, mostrou-se menos sensível e optou-se pelo uso do ácido perclórico/ACN, porém com intervalo de potenciais mais restrito para evitar a oxidação da PU e, conseqüentemente minimizar a interferência dos picos referentes aos seus grupos funcionais nas determinações, como se apresenta a seguir.

Figura 25 - Voltamogramas de pulso diferencial da (a) primeira e (b) segunda varredura obtidos para DCF 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em (preto) solução fosfato pH 2,5 com 10% de ACN (v/v) e em (vermelho) ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH_{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

3.2.5. Otimização do potencial e tempo de acumulação

Utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF, fez-se um estudo do tempo e do potencial de acumulação, devido à presença do MIP-DCF no eletrodo. Inicialmente fixou-se um tempo de pré-concentração de 60 segundos e foram obtidos voltamogramas para os valores de potencial de acumulação de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 V (vs. SCE), com renovação da superfície entre cada medida, para escolher o potencial de pré-concentração que promovesse um pico com maior intensidade de corrente (Figura 26 e Tabela 21). Um voltamograma sem pré-concentração foi obtido para comparação.

Figura 26- Voltamogramas de DPAdASV com DCF 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} pH_{cond} 1,6 com 10% de ACN (v/v), com tempo de acumulação de 60 segundos para diferentes valores de potencial de acumulação, utilizando EGPU-2,5MIP-DCF.

Tabela 21 - Valores de I_{DCF} obtidos nos voltamogramas de DPAdASV com tempo de acumulação de 60 s e diferentes valores de potencial de acumulação

E / V (vs. SCE)	Varredura	Sem pré-concentração	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
I / μA	1 ^a	5,309	7,063	7,353	7,398	5,915	6,671	7,234
	2 ^a	3,269	6,179	6,179	6,874	5,617	5,583	6,559

Pela Figura 26 e Tabela 21, verificou-se que as maiores intensidades de corrente na 1ª varredura foram obtidas para os valores de potencial de 0,1; 0,2 e 0,5 V. Foi observado que a maior intensidade de corrente do pico I_{DCF} ocorre para o potencial de acumulação 0,2 V (vs. SCE), sendo este escolhido para dar continuidade ao trabalho.

Em seguida, diminuiu-se o intervalo de potencial para o pico de interesse, I_{DCF} , não ter interferência do pico II_{DCF} e foram obtidos voltamogramas de DPAdASV para valores de tempo de acumulação de 0; 60; 120; 180; 240; 300; 360 e 480 segundos.

As Figura 27a e Figura 27b mostram uma tendência à estabilização na intensidade da corrente de pico a partir de 300 segundos de pré-concentração, sendo este o tempo escolhido para acumular o DCF na superfície do eletrodo.

a)

b)

Figura 27 - (a) Voltamogramas de DPAdASV com DCF 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), para diferentes tempos de acumulação, utilizando EGPU-2,5MIP-DCF e $E = 0,2 \text{ V}$, com $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e (b) relação da corrente de pico I_{DCF} com o tempo de pré-concentração.

Para otimização da amplitude de pulso (a) e da velocidade de varredura de potencial (v), foi usado um planejamento fatorial 2^n , $n = \text{número de variáveis (a, v)}$, no qual foram estabelecidos valores de $a = 10$ e 25 mV s^{-1} e valores de $v = 25$ e 50 mV , totalizando-se quatro experimentos (Figura 28).

Figura 28- Voltamogramas de de DPAdASV com redissolução anódica para EGPU-2,5MIP-DCF, $t = 300\text{s}$, $E = 0,2 \text{ V (vs. SCE)}$ em ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), com $a = 50\text{mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar na Figura 28, a distorção dos picos na velocidade de 25 mV s^{-1} , enquanto que com $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, os picos se apresentaram bem definidos. Assim, foi escolhida a amplitude de 50 mV e a velocidade de 10 mV s^{-1} por promover picos bem definidos e maior intensidade de corrente.

A

Tabela 22 mostra os parâmetros otimizados e utilizados na obtenção dos voltamogramas e das curvas analíticas.

Tabela 22 - Otimização dos parâmetros para determinação do DCF em DPCSV

Parâmetros	Otimizados	Selecionados
Meio eletrolítico	Solução Fosfato com 10% de ACN (v/v), pH 2,5; 3; 4; 5; 6; 7 Ác. perclórico 25 mmol L^{-1} 10% de ACN (v/v), $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$	Ác. Perclórico 25 mmol L^{-1} $^1\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% ACN,
Tempo de pré-concentração / s	0; 60; 120; 180; 240; 300; 360; 480	300
Potencial de acumulação / V (vs. SCE)	0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5	0,2
Amplitude / mV	25; 50 mV	50
Velocidade de varredura de potencial / mV s^{-1}	10; 25 mV s^{-1}	10

3.2.6. Curva Analítica

Voltamogramas de DPAdASV foram obtidos sem renovação da superfície do eletrodo entre as medidas na determinação do DCF nas concentrações de $0,01$ e $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando os eletrodos EGPU, EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF para comparação (Figura 29).

Pela Figura 29 pode-se observar que o eletrodo EGPU não modificado (Figura 29a) apresenta perfis bem comportados com pico em $0,830 \text{ V}$ a partir de $0,020 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, que se desloca ligeiramente para potenciais mais positivos com o aumento da concentração.

Figura 29 - Voltamogramas de DPAdASV com CDCF entre 0,01 e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DCF, tempo de acumulação de 300s e $E_{acc} = 0,2 \text{ V}$ (vs. SCE) em ácido perclórico 25 mmol L⁻¹ pHcond 1.6 com 10% de ACN (v/v), com $a = 50\text{mV}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Enquanto isso o EGPU-2,5MIP-DCF apresenta picos no mesmo potencial a partir de $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 29b), porém com maior intensidade de corrente. Forte distorção no perfil voltamétrico foi observada em concentração de $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, que poderia ser atribuída a uma saturação dos MIPs e resposta de DCF na superfície do polímero, em regiões em que não houve impressão. O pico parece se desdobrar em dois, em 0,855 e 0,873V.

Isso é corroborado pelo pico de oxidação observado na Figura 29c, quando o NIP, são usados na modificação do eletrodo. Neste caso os picos não apresentam a definição observada nos casos anteriores, mas ocorrem em potencial de 0,88 V.

A partir desses voltamogramas acima, foram obtidas curvas analíticas para o DCF (Figura 30), utilizando os eletrodos sem modificação (EGPU) e modificado com impressão molecular (EGPU-2,5MIP-DCF) e sem impressão molecular (EGPU-2,5NIP-DCF).

A Tabela 23 mostra as regiões lineares, coeficientes de correlação linear (R), sensibilidades e limites de detecção dos respectivos eletrodos.

O intervalo de concentração estudado foi de $0,01$ a $1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, entretanto, pelas curvas apresentadas na Figura 30, pode-se observar que, com exceção do EGPU-2,5NIP-DCF, todos os eletrodos apresentaram apenas uma região linear, que alcança até $0,20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, quando se observa saturação dos sítios ativos de resposta dos eletrodos, exceto para o EGPU-2,5NIP-DCF, em que essa região vai até $0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 30 - Curvas analíticas obtidas à partir dos voltamogramas da Figura 21, para DCF, utilizando-se o EGPU, EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF.

Tabela 23 - Região linear, Coeficiente de correlação linear, inclinação e LOD para DCF

Eletrodo	Região linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Coeficiente de correlação Linear (R)	Slope (b) / $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1}\text{L}$	*LOD / $\eta\text{mol L}^{-1}$
EGPU	0,01 – 0,20	0,997	1,20	5,31
EGPU-2,5MIP-DCF	0,01 – 0,20	0,999	2,01	0,990
EGPU-2,5%NIP-DCF	0,02 – 0,10	0,996	0,647	6,13

$$*LOD = \frac{3.Sd_A}{b} [6]$$

Pelos dados da Tabela 23 pode-se observar que o eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF apresentou LOD menor em relação aos outros eletrodos, enquanto que EGPU e EGPU-2,5NIP-DCF apresentaram valores semelhantes.

A sensibilidade do EGPU-2,5MIP-DCF foi o dobro da sensibilidade obtida empregando-se o EGPU, enquanto que a menor sensibilidade foi obtida, empregando-se o EGPU-2,5NIP-DCF devido a diminuição do material condutor pelo polímero sem cavidades para o analito.

As regiões lineares observadas para os eletrodos obedeceram às seguintes Equações:

EGPU, 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$:

$$I_p = 0,014 \mu\text{A} + 1,204 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L } C_{\text{FA}}, (n = 6, R = 0,997) \quad (5)$$

EGPU-2,5MIP-DCF, 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$:

$$I_p = 0,022 \mu\text{A} + 2,009 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L } C_{\text{FA}}, (n = 6, R = 0,999) \quad (6)$$

EGPU-2,5NIP-DCF, 0,02 e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$:

$$I_p = 0,003 \mu\text{A} + 0,646 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L } C_{\text{FA}}, (n = 6, R = 0,996) \quad (7)$$

Com relação às diferenças de desempenho, pode-se inferir que a presença dos MIPs no EGPU-2,5MIP-DCF permitiu interação do DCF com os grupos funcionais presentes nas cavidades do MIP. Como não foi feita a impressão molecular do DCF no NIP-DCF, este não possui cavidades e, conseqüentemente, a resposta do eletrodo apresentou menor sinal de corrente, nesse caso, associada à ocupação de sítios condutivos do grafite pelo polímero modificador. Como o eletrodo sem modificação só possui grafite e poliuretana em sua composição, o sinal do DCF se mostrou maior que o NIP-DCF, pois há, nesse caso, maior quantidade de material condutor na superfície e, conseqüentemente, maior área ativa.

3.2.7. Determinação do DCF em formulações farmacêuticas

Considerando seu desempenho nas soluções artificiais, o EGPU-2,5MIP-DCF foi utilizado para determinar o DCF em 3 amostras farmacêuticas: Biofenac®, Diclofenaco Sódico® e Voltaren®, pelo método de Adição de Padrão. A Figura 31a, 30c e 30e apresentam os voltamogramas DPASV com 3 adições de DCF e as Figura 31b, 30d e 30f mostram as respectivas curvas de adição de padrão.

a)

b)

c)

d)

e)

f)

Figura 31 - Resultados da determinação de 100 nmol L^{-1} DCF em amostra farmacêutica de (a) Biofenac®, (c) Medley® e (e) Voltaren® em condições otimizadas (Tabela 20) e as curvas de adição de padrão para DCF em (b) Biofenac®, (d) Medley® e (f) Voltaren®. Voltamogramas de DPAdASV em meio de ácido perclórico 25 mmol L^{-1} $\text{pH}_{\text{cond}} 1,6$ com 10% de ACN (v/v), obtidos com EGPU-2,5MIP-DCF

A Tabela 24 mostra os resultados obtidos por DPV e HPLC em comparação com o valor rotulado.

Tabela 24- Determinação do DCF em formulações usando EGPU-2,5MIP-DCF em DPASV

Amostras	Rotulado / mg	DPV / mg	E_1 / %	HPLC/ mg	E_2^b / %	E_3^c / %
Biofenac ®	50,0	49 ± 5	-2,1	48 ± 1	- 3,8	1,5
Medley ®	50,0	$47,2 \pm 0,3$	-5,7	50 ± 2	- 1,3	-4,6
Voltaren ®	50,0	50 ± 2	-0,5	50 ± 1	- 0,6	0,1

a = DPV vs Rotulado: $((\text{DPV} - \text{Rotulado}) / \text{Rotulado}) \times 100\%$

b = HPLC vs Rotulado: $((\text{HPLC} - \text{Rotulado}) / \text{Rotulado}) \times 100\%$

c = DPV vs HPLC: $((\text{DPV} - \text{HPLC}) / \text{HPLC}) \times 100\%$

A Tabela 25 apresenta os valores de recuperação obtidos em 3 adições de DCF, utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF em DPAdASV. Observando-se a Tabela 25, pode-se inferir

que entre a 1ª e a 3ª adição de DCF, houve uma queda na intensidade de corrente do pico devido à adsorção do analito na superfície do eletrodo em todos os casos. Testes estatísticos utilizando o teste *t* de Student para 95% de confiança mostrou que não há diferenças estatísticas entre os coeficientes de recuperação.

Tabela 25- Coeficiente de recuperação de DCF em formulações farmacêuticas

Amostras	Adição	Adicionado / nmol L ⁻¹	Encontrado / nmol L ⁻¹	Recuperação / %
Biofenac®	1ª	20,0	20,7	103 ± 4
	2ª	40,0	40,9	103 ± 2
	3ª	60,0	59,1	99 ± 1
				101 ± 3*
Medley®	1ª	20,0	21,1	105 ± 1
	2ª	40,0	40,6	102 ± 2
	3ª	60,0	59,1	99 ± 1
				102 ± 3*
Voltaren®	1ª	20,0	21,1	105 ± 2
	2ª	40,0	40,4	101 ± 1
	3ª	60,0	59,3	99
				102 ± 3*

*média ± desvio padrão, n = 3

3.2.8. Determinação do DCF em Urina Sintética

A determinação do DCF foi realizada em urina sintética, utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF. A amostra artificial de urina foi contaminada com 100 nmol L⁻¹ de DCF e as medidas foram feitas em triplicata, usando o método de adição de padrão.

Os voltamogramas de DPADASV estão apresentados na Figura 32a com a base normalizada para melhor visualização dos picos do DCF. A curva na Figura 32b corresponde às correntes do pico I_{DCF} obtidas dos voltamogramas da Figura 32a.

Na Figura 32a pode-se observar um pico bem definido em torno de 0,624 V (vs. SCE), referente à oxidação do DCF que aumenta linearmente com as adições sucessivas de DCF na urina.

Pela Figura 32b foi possível determinar na amostra de urina artificial, uma concentração de 96 ± 2 nmol L⁻¹ de DCF que corresponde a uma recuperação média da ordem de 1010% ± 2, com erro de -3,7% entre a concentração adicionada e encontrada pela DPASV.

Figura 32 - (a) Voltamogramas de DPV em urina sintética, utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF, na determinação de 100 nmol L^{-1} DCF. (b) Curva de adição de padrão para DCF sob condições otimizadas anteriormente.

A Tabela 26 apresenta os resultados de recuperação do DCF para a amostra de urina artificial.

Tabela 26 - Coeficiente de recuperação do DCF na amostra de urina sintética

Amostra Biológica	Adição	Adicionado / nmol L^{-1}	Encontrado / nmol L^{-1}	Recuperação / %
Urina sintética	1 ^a	20	21 ± 1	102 ± 6
	2 ^a	40	41 ± 4	102 ± 8
	3 ^a	60	60 ± 2	99 ± 3
				101 ± 2

Pode-se dizer que a matriz não interferiu significativamente na determinação do DCF, apresentando valores de recuperação entre 99 e 102%. Os resultados observados mostraram a eficiência e sensibilidade do eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF na determinação do DCF em urina sintética.

3.2.9. Estudo de seletividade

O principal objetivo ao preparar um eletrodo modificado com MIP é a seletividade do dispositivo final em relação aos analitos com estrutura semelhante e demais concomitantes potencialmente interferentes e eventualmente presentes na amostra.

Assim, neste trabalho, foi realizado um estudo de interferentes para avaliar a seletividade do eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF na determinação do DCF, em presença de substâncias com a estrutura química e o tamanho da molécula semelhantes aos do analito. Como foi verificado para o ácido fólico, não apenas a dimensão da molécula impressa, mas, também, seus grupos funcionais, provocam interferência em um eletrodo modificado com MIP.

Para comparação, utilizou-se o eletrodo compósito GPU modificado com polímero sem a impressão molecular, EGPU-2,5NIP-DCF.

Os interferentes utilizados foram ácido meclofenâmico (AMCFN) e ácido mefenâmico (AMFN), cujas estruturas químicas estão apresentadas, juntamente com a do DCF, na Figura 33.

Figura 33 - Estrutura química do (a) DCF, (b) AMCFN e (c) AMFN.

3.2.9.1. Ácido meclofenâmico

Os voltamogramas de DPADASV obtidos para 150 nmol L⁻¹ de DCF na ausência e na presença de 75, 150 e 300 nmol L⁻¹ de AMCFN estão apresentados nas Figura 34 (a) e Figura 34 (b), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF, respectivamente, com linha base normalizada para melhor visualização dos picos.

Figura 34 - Voltamogramas de DPAdASV para 150 nmol L⁻¹ de DCF e com adições sucessivas de 75, 150 e 300 nmol L⁻¹ de AMCFN, utilizando (a) EGPU-2,5MIP-DCF e (b) EGPU-2,5NIP-DCF, em condições otimizadas.

Inicialmente, foram obtidos voltamogramas de DPAdASV com 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMCFN para conhecer o comportamento voltamétrico dessa substância, utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF. O pico do analito não pode ser observado durante a primeira varredura, entretanto, a partir da segunda varredura o pico de oxidação do AMCFN apareceu em 0,75 V (vs. SCE) e sua intensidade de corrente aumentou a cada medida, se estabilizando a partir da 12^a varredura.

A Figura 34 (a), obtida utilizando-se o EGPU-2,5MIP-DCF, revelou um pico de oxidação do DCF entre 0,822 / 0,831 V (*vs.* SCE), dependendo da razão de interferente em solução, e o pico de oxidação do AMCFN em 0,738 V (*vs.* SCE) a partir da terceira adição. À medida que se adiciona o AMCFN, o pico I_{DCF} é ligeiramente deslocado para potenciais mais positivos.

A Tabela 27 apresenta os resultados do efeito do ácido meclofenâmico na resposta voltamétrica, dos compósitos EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF, respectivamente, em solução 150 nmol L⁻¹ de DCF. Esses resultados mostram uma ligeira interferência positiva causada pela presença do AMCFM em relação às correntes de pico do DCF. Há um ligeiro aumento na corrente na primeira adição e, em seguida, uma redução para valor constante.

Tabela 27 - Interferência do ácido meclofenâmico na resposta voltamétrica de soluções de 150 nmol L⁻¹ de DCF, utilizando o eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF

		EGPU-2,5MIP-DCF			Teórica	EGPU-2,5NIP-DCF		
$C_{DCF}:C_{AMCFN}$ (nmol L ⁻¹)		I_p (nA)	I_p (%)	Interferência (%)	Interferência (%)	I_p (nA)	I_p (%)	Interferência (%)
150	0	173,0	100,0	-	-	29,6	100,00	-
150	75	196,0	113,3	13,3	50	42,7	144,3	44,3
150	150	180,0	104,0	4,0	100	37,9	128,0	28,0
150	300	177,0	102,3	2,3	200	31,5	106,4	6,4

Utilizando o EGPU-2,5NIP-DCF, foram obtidos os voltamogramas da Figura 34 (b), nos quais é possível observar o pico de oxidação do DCF em 0,863 / 0,872 V (*vs.* SCE) e do AMCFN em 0,740 / 0,750 V (*vs.* SCE), dependendo da concentração do interferente na solução. A intensidade de corrente no pico do DCF é da ordem de quatro vezes menor que no caso anterior, sendo possível observar também os processos de oxidação do AMCFM, mesmo em baixas concentrações.

O mais importante é que há maior interferência do AMCFN no sinal do DCF no EGPU-2,5NIP-DCF, que varia de 6 – 44%, dependendo da concentração de interferente, enquanto no EGPU-2,5MIP-DCF ela varia de 2 - 13%, o que mostra a eficiência do MIP na seletividade do eletrodo modificado, principalmente tendo em conta a semelhança estrutural de ambas as espécies.

Com relação à diminuição da interferência com o aumento da quantidade de AMCFM, pode-se especular que ela seria devida à pequena competição dessa substância e do DCF, pelos sítios ativos do eletrodo, em baixas concentrações de interferente. Quando o AMCFM está em concentrações maiores, a competição aumentaria e seria privilegiado o

DCF, em função da discriminação efetivada pelo MIP. Isso reitera a eficácia do MIP-DCF no processo analítico.

3.2.9.2. Ácido mefenâmico

Os voltamogramas de DPASV obtidos para 150 nmol L^{-1} de DCF na ausência e na presença de 75, 150 e 300 nmol L^{-1} de AMFN estão apresentados nas Figura 35 (a) e (b), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF, respectivamente, com linha base normalizada para melhor visualização dos picos.

Figura 35 - Voltamogramas de DPASV para 150 nmol L^{-1} de DCF e com adições sucessivas de 75, 150 e 300 nmol L^{-1} de AMFN, utilizando (a) EGPU-2,5MIP-DCF e (b) EGPU-2,5NIP-DCF, em condições otimizadas.

Segundo Yu e colaboradores (2008), utilizando como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme compósito de nano tubos de carbono suspenso em colóide de nanopartículas de ouro (MWCNTs-AuNPs-DHP/GCE), fio de Pt como contra-eletrodo e o eletrodo de calomelano saturado como referência, em solução fosfato pH 4,5, o potencial de oxidação do AMFN (I_{AMFN}) ocorre em 0,72 V (*vs.* SCE) e quanto menor o pH do meio, mais deslocado para potenciais positivos será esse potencial.

Pela Figura 35 (a), utilizando o EGPU-2,5MIP-DCF, pode-se verificar um pico de oxidação I_{DCF} , localizado em 0,824 V (*vs.* SCE), quando há somente o DCF na solução, além da sobreposição dos picos I_{DCF} e I_{AMFN} após a 1ª adição de AMFN e o pico referente à oxidação do AMFN em 0,790 V (*vs.* SCE) a partir da sua 2ª adição. Na Figura 35 (b), utilizando o EGPU-2,5NIP-DCF, observa-se que os potenciais do pico de oxidação do DCF e do AMFN aparecem deslocados para potenciais mais positivos, 0,866 e 0,830 V (*vs.* SCE), respectivamente, além de menor intensidade de corrente. Em ambos os casos, observa-se o deslocamento do pico I_{AMFN} para potenciais mais altos, quando comparado com o trabalho de Yu e colaboradores (2008), devido ao pH condicional 1,6, do meio ácido perclórico.

Pelo fato do potencial de oxidação do AMFN ser bem próximo do potencial de oxidação do DCF, há uma interferência na corrente do pico I_{DCF} , devido à sobreposição de sinais.

Na Tabela 28 são apresentados os resultados de interferência do ácido mefenâmico na resposta voltamétrica do DCF. Apesar das dificuldades de medir as correntes de pico do DCF na presença do AMFN, nota-se que a interferência varia de -6,2 a 322% no EGPU-2,5MIP-DCF, enquanto que no EGPU-2,5NIP-DCF, ela varia de 23 – 700%. Apesar da interferência ter sido maior que a esperada em ambos os casos, impedindo a recuperação do sinal do DCF, ainda assim, ela foi superior quando utilizado o NIP-DCF, do que quando utilizado o MIP, mostrando certa habilidade de discriminação do eletrodo contendo polímero com impressão. Entretanto, a competição entre o DCF e o AMFN pelos sítios ativos da superfície do eletrodo se dá em todas as concentrações investigadas e o sinal do interferente parece ser mais elevado que o do DCF. A sobreposição impede a determinação do analito com o MIP nas concentrações investigadas e seria necessário separa os dois em uma eventual análise.

Nesse caso o AMFN foi selecionado pela sua semelhança estrutural, mas não se tem notícia do uso concomitante dessas substância em medicamentos, sendo ambos usados em formulações de anti-inflamatórios. Assim, não seria esperada a presença de ambos em

uma mesma amostra farmacêutica nem em fluidos biológicos. Talvez pudesse haver a presença concomitante em amostras de efluentes de indústria farmacêutica ou águas.

Com a 3ª adição de AMFN, em que há o dobro da concentração de AMFN em relação ao DCF e se espera uma interferência de 200%, observa-se uma sobreposição dos picos e uma interferência de 322,7 e 693,5% para os eletrodos modificados com EGPU-2,5MIP-DCF e EGPU-2,5NIP-DCF, respectivamente. Apesar da interferência ter sido maior que a esperada em ambos os casos, ainda teve um valor bem superior quando utilizado o NIP-DCF, sendo praticamente 4 vezes maior que a teórica, enquanto que quando utilizado o MIP, não chegou a dobrar.

Tabela 28 - Efeito do ácido meclofenâmico na resposta voltamétrica de soluções de 150 nmol L⁻¹ de DCF utilizando o eletrodo EGPU-2,5MIP-DCF

		EGPU-2,5MIP-DCF			Teórica	EGPU-2,5NIP-DCF		
C _{DCF} :C _{AMCFN} (nmol L ⁻¹)		I _p (nA)	I _p (%)	Interferência (%)	Interferência (%)	I _p (nA)	I _p (%)	Interferência (%)
150	0	160,5	100,0	-	-	29,4	100,0	-
150	75	150,5	93,8	-6,2	50	22,7	77,2	-22,8
150	150	285,0	177,6	77,6	100	97,3	331,0	231,0
150	300	678,5	422,7	322,7	200	233,3	793,5	693,5

Além de mais seletivo, o eletrodo modificado com MIP se mostrou mais sensível que aquele modificado com o NIP-DCF, para ambos os casos. Isso sugere que o MIP contém nanocavidades geometricamente formadas que favorecem a acumulação tanto do diclofenaco, quanto do AMFN.

Capítulo 4 – Conclusão

4. Conclusão

Foi possível preparar e caracterizar polímeros com impressão molecular (MIP) contendo ácido fólico e diclofenaco como moléculas molde (*templates*). Foram analisadas a porosidade e estrutura morfológica desses polímeros, mostrando aumento na área superficial dos mesmos na presença da impressão molecular, nos dois casos.

Em relação ao ácido fólico, e de acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que os eletrodos modificados com MIP em diferentes percentagens, apresentaram resposta voltamétrica satisfatória, com um ganho, apesar de pequeno, na sensibilidade, quando comparados ao eletrodo compósito GPU não modificado e ao modificado com NIP-DCF, na determinação de FA. O limite de adição de MIP foi da ordem de 2,5 % (*m/m*) da massa do sensor, acima do qual ocorre perda de sensibilidade, talvez por substituição do material condutor pelo MIP.

A aplicação do eletrodo na determinação do FA de amostras farmacêuticas apresentou eficiência do método proposto em relação ao método oficial de análise. Além disso, o eletrodo apresentou longa duração, pois foi utilizado em todo o trabalho. Em comparação com os trabalhos da literatura, o eletrodo EGPU-MIP-FA mostrou-se vantajoso, pois não foi utilizada a pré-concentração do analito na superfície do eletrodo antes das medidas voltamétricas, o MIP utilizado para modificar o eletrodo estava presente em todo o compósito e a presença da poliuretana lhe proporcionou maior rigidez e reatividade. A principal inovação desta pesquisa está na investigação da seletividade do eletrodo para moléculas de tamanho grande e com vários grupos funcionais presentes na estrutura como o FA, com o MIP para esse analito inserido na matriz do compósito.

A seletividade do MIP mostrou-se presente quando o analito foi medido na presença de metotrexato, cuja estrutura química é muito similar à do FA, mostrando eficiência na discriminação do FA pelo sensor. Entretanto moléculas menores, contendo grupos funcionais semelhantes ao FA e com maior mobilidade estrutural, como o ácido ascórbico e a dopamina, mostraram-se severos interferentes, pois podem se coordenar mais livremente aos sítios de coordenação impressos na cavidade do MIP. O ácido úrico, que apresenta rigidez estrutural, interferiu menos, o que se atribuiu à maior dificuldade de coordenação aos sítios de coordenação da cavidade, dada essa rigidez estrutural.

Conclusões semelhantes podem ser traçadas para o diclofenaco, exceto para o efeito do tamanho da molécula, pois o DCF é muito menor. Ainda assim, o eletrodo foi capaz de discriminar esse analito na presença de espécies com estrutura muito semelhante,

mostrando ganho no desempenho do sensor, em relação à sua seletividade, especialmente quando usado associado ao processo de pré-concentração.

O método proposto para determinação do DCF em formulações comerciais e urina sintética mostrou-se eficiente. Somando-se a isso, o eletrodo apresentou longa duração, pois foi utilizado em todo o trabalho. Comparando-se com outros trabalhos da literatura, o eletrodo EGPU-MIP-DCF apresentou menor limite de detecção e boa seletividade na presença de interferentes.

Capítulo 5 – Trabalhos futuros

5. Trabalhos Futuros

Os trabalhos futuros para dar continuidade ao trabalho são:

- Síntese e confecção de eletrodos modificados com MIP usando furosemida com molécula molde;
- Aplicação destes eletrodos na determinação de FRS em fármacos e em urina sintética;
- Avaliação da sensibilidade e seletividade desses MIP's, na modificação do EGPU.

Capítulo 6 – Referências

6. Referências

1. KUČERA, G. Zur Oberflächenspannung von polarisiertem Quecksilber. **Annalen der Physik**, v. 316, n. 7, p. 529–560, 1903.
2. HEYROVSKÝ, J. **Principles of polarography**. Prague: Pub. House of Czechoslovak Academy of Sciences, 1966. 581 p.
3. ADAMS, R.N. **Electrochemistry at solid electrodes**. New York: Marcel Dekker, 1969. 219 p.
4. ADAMS, R.N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1576–1576. 1958.
5. PUNGOR, E.; SZEPESVÁRY, É. Voltammetric studies with silicone rubber-based graphite electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 43, p. 289–296, 1968.
6. PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 1012–1021, 2002.
7. KISSINGER, P.; HEINEMAN, W.R. **Laboratory techniques in electroanalytical Chemistry**. 2. Ed. New York: CRC, 1996. 986 p.
8. CAVALHEIRO, E.T.G.; BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds. **Bioanalytical Reviews**, v. 4, n. 1, p. 31-53, 2012.
9. TALLMAN, D.E.; PETERSEN, S.L. Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications. **Electroanalysis**, v. 2, n. 7, p. 499–510, 1990.
10. RUSCHAU, G.R.; NEWNHAM, R.E.; RUNT, J.; SMITH, B.E. 0–3 ceramic/polymer composite chemical sensors. **Sensors and Actuators**, v. 20, n. 3, p. 269–275, 1989.
11. CÉSPEDES, F.; MARTINEZ-FÀBREGAS, E.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 296–304, 1996.
12. MASCINI, M.; PALLOZZI, F.; LIBERTI, A. A polythene graphite electrode for voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 64, n. 1, p. 126–131, 1973.
13. KLATT, L.N.; CONNELL, D.R.; ADAMS, R.E. Voltammetric characterization of a graphite-teflon electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 2470–2472, 1975.
14. SWOFFORD, H.S.; CARMAN, R.L. Voltammetric applications of rotating carbon-epoxy electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 966–969, 1966.
15. WANG, J.; NASER, N. Modified carbon-wax composite electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, n. 2, p. 253–259, 1995.

16. ŠTULÍK, K.; PACÁKOVÁ, V.; STÁRKOVÁ, B. Carbon pastes for voltammetric detectors in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 213, n. 1, p. 41–46, 1981.
17. CERVINI, Priscila. **Aplicação de eletrodos compósitos a base de poliuretana-grafite**. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
18. SACIOTO, Thalita Rocha. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodo compósito impresso à base de grafite e poliuretana**. 2014. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica e Inorgânica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
19. MENDES, R.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Evaluation of a new rigid carbon–castor oil polyurethane composite as an electrode material. **Talanta**, v. 57, n. 5, p. 909–917, 2002.
20. MENDES, R.K.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. The use of a graphite-castor oil polyurethane composite electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 708–12, 2006.
21. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determination of hydroquinone in a square wave voltammetry procedure using a graphite-polyurethane composite electrode. **Ecletica Química**, v. 31, n. 4, p. 59–62, 2006.
22. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Possibilities of using a new graphite-castor oil polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector. **Analytical Chemistry an Indian Journal**, v. 2, n. 5-6, p. 187–194, 2006.
23. 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 electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 10, p. 1028–1034, 2006.
24. CERVINI, P.; RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 206–9, 2007.
25. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determination of paracetamol at a graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 836–841, 2008.
26. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Graphite-polyurethane composite electrode as an amperometric flow detector in the determination of atenolol. **Analytical Letters**, v. 41, n. 10, p. 1867–1877, 2008.
27. SEMAAN, F.S.; PINTO, E.M.; CAVALHEIRO, E.T.G.; BRETT, C. M. A. A graphite-polyurethane composite electrode for the analysis of furosemide. **Electroanalysis**, v. 20, n. 21, p. 2287–2293, 2008.
28. SEMAAN, F.S.; CAVALHEIRO, E.T.G.; BRETT, C. M. A. Electrochemical behavior of verapamil at graphite–polyurethane composite electrodes: determination of release profiles in pharmaceutical samples. **Analytical Letters**, v. 42, n. 8, p. 1119–1135, 2009.

29. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, É.T.G. Evaluation of the analytical potentialities of a composite electrode modified with molecularly imprinted polymers. **Analytical Letters**, v. 42, n. 13, p. 1940–1957, 2009.
30. CESARINO, I.; CAVALHEIRO, É.T.G.; BRETT, C. M. A. Simultaneous determination of cadmium, lead, copper and mercury ions using organofunctionalized sba-15 nanostructured silica modified graphite-polyurethane composite electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 61–68, 2010.
31. CESARINO, I.; MARINO, G.; CAVALHEIRO, É.T.G. A novel graphite–polyurethane composite electrode modified with thiol-organofunctionalized silica for the determination of copper ions in ethanol fuel. **Fuel**, v. 89, n. 8, p. 1883–1888, 2010.
32. CESARINO, I.; GOUVEIA-CARIDADE, C.; PAULIUKAITĖ, R.; CAVALHEIRO, E. T. G.; BRETT, C. M. A. Characterization and application of bismuth-film modified graphite-polyurethane composite electrodes. **Electroanalysis**, v. 22, n. 13, p. 1437–1445, 2010.
33. CESARINO, I.; CAVALHEIRO, E.T.G.; BRETT, C. M. A. Characterization of graphite–polyurethane composite electrodes modified with organofunctionalized SBA-15 nanostructured silica in the presence of heavy metal ions. Application to anodic stripping voltammetry. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 1-2, p. 1–9, 2010.
34. CALIXTO, C.M.F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 938–943, 2012.
35. SACIOTO, T.R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. New screen printed electrode based on graphite and polyurethane composite for the determination of acetaminophen. **Analytical Letters**, v. 46, n. 2, p. 312–322, 2013.
36. SACIOTO, T.R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and caffeine at a graphite and polyurethane screen-printed composite electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1461–1468, 2013.
37. SOUSA, R.A.; DOS-SANTOS, S.X.; CAVALHEIRO, E.T.G.; BRETT, C. M. A. Graphite-polyurethane and graphite-silicone rubber composite electrodes for electrochemical characterization and determination of minoxidil. **Electroanalysis**, v. 25, n. 3, p. 706–715, 2013.
38. PEREIRA, A.V.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Do voltammetry electrodes modified with MIPs really work? The role of large molecules: folic acid as a probe. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6658–6667, 2014.
39. SACIOTO, T.R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Simultaneous Voltammetric Determination of Zn(II), Pb(II), Cu(II), and Hg(II) in Ethanol Fuel Using an Organofunctionalized Modified Graphite-Polyurethane Composite Disposable Screen-Printed Device. **Electroanalysis**, v. 26, n. 12, p. 2664–2676, 2014.
40. DOS-SANTOS, S.X.; CAVALHEIRO, E.T.G. Using of a graphite-polyurethane composite electrode modified with a schiff base as a bio-inspired sensor in the dopamine determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 6, p. 1071–1077, 2014.

41. MAHONY, J.O.; NOLAN, K.; SMYTH, M.R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 1, p. 31–39, 2005.
42. MOLINELLI, A.; JANOTTA, M.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers for biomolecular recognition. In: VO-DINH, T. **Protein nanotechnology**: protocols, instrumentation and applications. New York: Springer, 2005. p. 243–54. (Methods in Molecular Biology, 300).
43. PILETSKY, S.A.; ALCOCK, S.; TURNER, A.P.F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2001.
44. POLYAKOV, M.V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal fizicheskoi khimii**, v. 2, p. 799–804, 1931.
45. PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643–2657, 1940.
46. MASQUÉ, N.; MARCÉ, R.; BORRULL, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 384–394, 1998.
47. MAYES, A.G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 321–332, 1997.
48. HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2495–2504, 2000.
49. BLOMGREN, A.; BERGGREN, C.; HOLMBERG, A.; LARSSON, F.; SELLERGREN, B. Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 157–164, 2002.
50. BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 35–44, 2001.
51. ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
52. MULLETT, W.M.; MARTIN, P.; PAWLISZYN, J. In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2383–2389, 2001.
53. HWANG, C.-C.; LEE, W.-C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 765, n. 1, p. 45–53, 2001.

54. SKUDAR, K.; BRÜGGEMANN, O.; WITTELSBERGER, A.; RAMSTRÖM, O. Selective recognition and separation of β -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers. **Analytical Communications**, v. 36, n. 9-10, p. 327, 1999.
55. NILSSON, K.; LINDELL, J.; NORRLÖW, O.; SELLERGREN, B. Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 680, n. 1, p. 57–61, 1994.
56. SCHWEITZ, L.; ANDERSSON, L.I.; NILSSON, S. Capillary electrochromatography with molecular imprint-based selectivity for enantiomer separation of local anaesthetics. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 401–409, 1997.
57. VALLANO, P.T.; REMCHO, V.T. Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 887, n. 1-2, p. 125–135, 2000.
58. PILETSKY, S.A.; TURNER, A.P.F. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. **Electroanalysis**, v. 14, n. 5, p. 317–323, 2002.
59. BLANCO-LÓPEZ, M.C.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 36–48, 2004.
60. CRISTALLINI, C.; CIARDELLI, G.; BARBANI, N.; GIUSTI, P. Acrylonitrile-acrylic acid copolymer membrane imprinted with uric acid for clinical uses. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 31–38, 2004.
61. KRIZ, D.; MOSBACH, K. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, v. 300, n. 1-3, p. 71–75, 1995.
62. CERVINI, P.; CAVALHEIRO, É.T.G. Strategies for preparation of molecularly imprinted polymers modified electrodes and their application in electroanalysis: a review. **Analytical Letters**, v. 45, n. 4, p. 297–313, 2012.
63. LUCOCK, M.; YATES, Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb? **Nature Reviews. Genetics**, v. 6, n. 3, p. 235–40, 2005.
64. GUIA de remédios 2010/2011. São Paulo: Editora Escala, 2011. 1056 p.
65. THAME, G.; SHINOHARA, E.M.G.; SANTOS, H.G.; MORON, A.F. Folato, vitamina B12 e ferritina sérica e defeitos do tubo neural. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 20, n. 8, p. 449–453, 1998.
66. BALUZ, K.; DO CARMO, M.G.T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica : revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 597–607, 2002.

67. GIOVANNUCCI, E.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G. A.; RIMM, E. B.; TRICHOPOULOS, D.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 11, p. 875–883, 1993.
68. NIAZI, A.; ZOLGHARNEIN, J.; AFIUNI-ZADEH, S. Spectrophotometric determination of ternary mixtures of thiamin, riboflavin and pyridoxal in pharmaceutical and human plasma by least-squares support vector machines. **Analytical Sciences : The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 1311–6, 2007.
69. OZDEMIR, D.; DINC, E. Determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparations using UV-visible spectrophotometry and genetic algorithm based multivariate calibration methods. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 7, p. 810–7, 2004.
70. DENG, X. Y; LI, J. Y; TAN, K.J. Carbon quantum dots-based fluorescence spectrophotometric assay of folic acid. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 542–546, 2014.
71. MATIAS, R.; RIBEIRO, P.R.S.; SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. A. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3065, 2014.
72. WONGYAI, S. Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 217–220, 2000.
73. MU, G.; LUAN, F.; LIU, H.; GAO, Y. Use of experimental design and artificial neural network in optimization of capillary electrophoresis for the determination of nicotinic acid and nicotinamide in food compared with high-performance liquid chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 191–200, 2012.
74. LEBIEDZIŃSKA, A.; MARSZAŁŁ, M.L.; KUTA, J.; SZEFER, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B(1) (thiamine), B(6) (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B(12) in animal and plant foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, n. 1-2, p. 71–80, 2007.
75. MARSZAŁŁ, M.L.; LEBIEDZIŃSKA, A.; CZARNOWSKI, W.; SZEFER, P. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1-2, p. 91–8, 2005.
76. LI, H.-B.; CHEN, F.; JIANG, Y. Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 891, n. 2, p. 243–247, 2000.
77. NELSON, B.C.; SHARPLESS, K.E.; SANDER, L.C. Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 2, p. 203–211, 2006.

78. CHEN, P.; WOLF, W.R. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 7, p. 2441–8, 2007.
79. CHEN, P.; ATKINSON, R.; WOLF, W.R. Single-laboratory validation of a high-performance liquid chromatographic-diode array detector-fluorescence detector/mass spectrometric method for simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 2, p. 680–687, 2009.
80. EL-MAALI, N.A. Carbon paste electrodes modified with palmitic acid and stearic acid for the determination of folic acid (vitamin B9) in both aqueous and biological media. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, n. 3, p. 465–473, 1992.
81. GALL, A.-C. LE; VAN DEN BERG, C.M.G. Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 282, n. 3, p. 459–470, 1993.
82. PRASAD, B.B.; MADHURI, R.; TIWARI, M.P.; SHARMA, P.S. Electrochemical sensor for folic acid based on a hyperbranched molecularly imprinted polymer-immobilized sol–gel-modified pencil graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, n. 1, p. 321–330, 2010.
83. PRASAD, B.B.; MADHURI, R.; TIWARI, M.P.; SHARMA, P.S. Imprinted polymer–carbon consolidated composite fiber sensor for substrate-selective electrochemical sensing of folic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 9, p. 2140–2148, 2010.
84. TODD, P.A.; SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 35, n. 3, p. 244–85, 1988.
85. GARCIA FILHO, R.J.; KORUKIAN, M.; DOS SANTOS, F.P.E.; VIOLA, D.M.; PUERTAS, E.B. Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre a associação de cafeína, carisoprodo, diclofenaco sódico e paracetamol e a ciclobenzaprina, para avaliação da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 11–16, 2006.
86. GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A.V.; STEINBRUCH, M.; CUNHA, K.S.; RIBEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.; OZERI, D.; DAHER, J.P.L. Use of diclofenac in clinical practice: review of the therapeutic evidence and pharmacologic actions. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 29–38, 2012.
87. SILVA, P. **Farmacologia**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1352p.
88. VOLTAREN: comprimidos. Farmacêutico responsável Flavia Regina Pegorer. Taboão da Serra: Anovis, 2015. Bula de remédio.
89. CHEN, G.; DEN BRAVER, M.W.; VAN GESTEL, C.A.M.; VAN STRAALLEN, N.M.; ROELOFS, D. Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 253–260, 2015.

90. CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LLOMPART, M.; GARCÍA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2918–26, 2004.
91. THANHMINGLIANA; TIWARI, D. Efficient use of hybrid materials in the remediation of aquatic environment contaminated with micro-pollutant diclofenac sodium. **Chemical Engineering Journal**, v. 263, p. 364–373, 2015.
92. HÜBNER, U.; JEKEL, M. Tertiary treatment of Berlin WWTP effluents with ferrate (Fe(VI)). **Water Science and Technology : a Journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 68, n. 7, p. 1665–71, 2013.
93. WANG, Y.; LIU, H.; LIU, G.; XIE, Y.; GAO, S. Oxidation of diclofenac by potassium ferrate (VI): Reaction kinetics and toxicity evaluation. **Science of The Total Environment**, v. 506-507, p. 252–258, 2015.
94. QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; RODRÍGUEZ, I. Analysis of acid drugs by gas chromatography. In: **COMPREHENSIVE Analytical Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007, v. 50, p. 185-218.
95. MANSO, J.; LARSSON, E.; JÖNSSON, J.Å. Determination of 4'-isobutylacetophenone and other transformation products of anti-inflammatory drugs in water and sludge from five wastewater treatment plants in Sweden by hollow fiber liquid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 125, p. 87–93, 2014.
96. JI, W.; ZHANG, J. Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 868, n. 1, p. 101–107, 2000.
97. HAFSA, D.; CHANDA, S.; PRABHU, P.J. Simultaneous HPLC determination of methocarbamol, paracetamol and diclofenac sodium. **E-Journal Of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 1620-1625, 2011.
98. HEYDARI, R.; SHAMSIPUR, M.; NALEINI, N. Simultaneous determination of EDTA, sorbic acid, and diclofenac sodium in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 764–9, 2013.
99. LUCAS, F.W. DE S.; MASCARO, L.H.; FILL, T. P.; RODRIGUES-FILHO, E.; FRANCO-JUNIOR, E.; HOMEM-DE-MELLO, P.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Diclofenac on boron-doped diamond electrode: From electroanalytical determination to prediction of the electrooxidation mechanism with HPLC-ESI/HRMS and computational simulations. **Langmuir**, v. 30, n. 19, p. 5645–5654, 2014.
100. LHOS, M.; REMES, A.; MANEA, F. Electrochemical determination of diclofenac using boron-doped diamond electrode. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, v. 13, n. 4, p. 2096–2103, 2012.
101. YANG, X.; WANG, F.; HU, S. Enhanced oxidation of diclofenac sodium at a nano-structured electrochemical sensing film constructed by multi-wall carbon nanotubes-surfactant composite. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 188–194, 2008.

102. GOYAL, R.N.; CHATTERJEE, S.; AGRAWAL, B. Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 145, n. 2, p. 743–748, 2010.
103. ARVAND, M.; GHOLIZADEH, T.M.; ZANJANCHI, M. MWCNTs/Cu(OH)₂ nanoparticles/IL nanocomposite modified glassy carbon electrode as a voltammetric sensor for determination of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1682–1689, 2012.
104. CHETHANA, B.K.; BASAVANNA, S.; ARTHOBA NAIK, Y. Voltammetric determination of diclofenac sodium using tyrosine-modified carbon paste electrode. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 10287–10295, 2012.
105. SARHANGZADEH, K.; KHATAMI, A.A.; JABBARI, M.; BAHARI, S. Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 43, p. 1217–1224, 2013.
106. KARUPPIAH, C.; CHEEMALAPATI, S.; CHEN, S.-M.; PALANISAMY, S. Carboxyl-functionalized graphene oxide-modified electrode for the electrochemical determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. **Ionics**, v. 21, n. 1, p. 231–238, 2014.
107. ENSAFI, A. A.; IZADI, M.; KARIMI-MALEH, H. Sensitive voltammetric determination of diclofenac using room-temperature ionic liquid-modified carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**, v. 19, p. 137–144, 2013.
108. BLANCO-LÓPEZ, M.C.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Voltammetric response of diclofenac-molecularly imprinted film modified carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 2, p. 257–261, 2003.
109. BLANCO-LÓPEZ, M.C.; FERNÁNDEZ-LLANO, L.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Voltammetry of diclofenac at graphite, carbon composites, and molecularly imprinted polymer-composite electrodes. **Analytical Letters**, v. 37, n. 5, p. 915–927, 2005.
110. WONG, A.; MARESTONI, L.D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Monitoring of diclofenac with biomimetic sensor in batch and fia systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1283–1291, 2014.
111. STEMPEL, G.H.; CROSS, R.P.; MARIELLA, R. P. The preparation of acrylyl chloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 5, p. 2299–2300, 1950.
112. GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Poly(d,l-lactide) nanocapsules containing nonsteroidal antiinflammatory drugs-gastrointestinal tolerance following intravenous and oral-administration. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 1545–1547, 1995.
113. FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1988. 392 p.

114. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: The National Formulary, NF 24. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006. p. 966.
115. LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.
116. KIRIM, R. A.; MUSTAPHA, K. B.; ISIMI, C. Y.; ACHE, T.; SADIQ, A.; GALADIMA, I. H.; GAMANIEL, K. S. Quality assessment of different brands of Diclofenac tablets in some pharmacy stores in Abuja. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 37, p. 924-928, 2014
117. LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1-2, p. 367–374, 2001.
118. LUO, D.-B. Determination of folic acid by adsorptive stripping voltammetry at the static mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 189, p. 277–283, 1986.
119. KALIMUTHU, P.; JOHN, S.A. Selective electrochemical sensor for folic acid at physiological pH using ultrathin electropolymerized film of functionalized thiadiazole modified glassy carbon electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 24, n. 12, p. 3575–80, 2009.
120. ALVAREZ, J.M.F.; GARCIA, A.C.; ORDIERES, A.J.M.; TUÑON BLANCO, P. Adsorptive stripping voltammetric behaviour of folic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 225, n. 1-2, p. 241–253, 1987.
121. HAN, J.; CHEN, H.; GAO, H. Alternating current adsorptive stripping voltammetry in a flow system for the determination of ultratrace amounts of folic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 252, n. 1-2, p. 47–52, 1991.
122. WANG, C.; LI, C.; TING, L.; XU, X.; WANG, C. Application of a single-wall carbon nano-tube film electrode to the determination of trace amounts of folic acid. **Microchimica Acta**, v. 152, n. 3-4, p. 233–238, 2005.
123. ALIZADEH, T. Development of a molecularly imprinted polymer for pyridoxine using an ion-pair as template. **Analytica Chimica Acta**, v. 623, n. 1, p. 101–8, 2008.
124. BRAJTER-TOTH, A.; EL-NOUR, K.A.; CAVALHEIRO, E.T.G.; BRAVO, R. Nanostructured carbon fiber disk electrodes for sensitive determinations of adenosine and uric acid. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1576–1584. 2000.
125. DOS SANTOS, SIDNEY XAVIER. **Preparação, caracterização e aplicação de eletrodos compósitos à base de nanotubos de carbono e polímeros**. 2011. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
126. CALIXTO, CAROLINA MARIA FIORAMONTI. **Utilização de eletrodos compósitos na análise voltamétrica de tetraciclinas em amostras biológicas e ambientais**. 2012. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica e Inorgânica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

127. RAZMI, H.; SARHANG-ZADEH, K.; MOHAMMAD-REZAEI, R.. Electrochemical behavior and voltammetric determination of diclofenac at a multi-walled carbon nanotube-ionic liquid composite modified carbon ceramic electrode. **Analytical Letters**, v. 46, n. 12, p. 1885–1896, 2013.