

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Química

THAWAN GOMES DE OLIVEIRA

**Estudo da oxidação eletroquímica da indapamida
para aplicação eletroanalítica**

Versão corrigida da dissertação apresentada conforme Resolução CopGr 5890

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
Data de depósito
16/06/2023

THAWAN GOMES DE OLIVEIRA

**Estudo da oxidação eletroquímica da indapamida
para aplicação eletroanalítica**

Dissertação apresentada para ao
Instituto de Química da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciência (no Programa de
Química)

Área de concentração: Química
Analítica

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O631e Oliveira, Thawan
Estudo da oxidação eletroquímica da indapamida para aplicação eletroanalítica / Thawan Oliveira. - São Paulo, 2023.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Angnes, Lúcio

1. Métodos Eletroanalíticos. 2. Química Analítica. 3. Análise por injeção em fluxo. 4. Indapamida. I. T. II. Angnes, Lúcio, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Estudo da oxidação eletroquímica da indapamida para aplicação eletroanalítica"

THAWAN GOMES DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Lucio Angnes
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga da Graça Saraiva
IO - USP

Prof. Dr. Tiago Luiz Ferreira
UNIFESP - DIADEMA

SÃO PAULO
28 de julho de 2023

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido e saudoso pai "Jose Carlos de
Oliveira" por todo apoio e dedicação na minha
trajetória acadêmica e pessoal.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma durante o meu mestrado:

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por toda ajuda e orientação ao longo dessa jornada acadêmica.

À minha família, meu pai Jose Carlos e Dominga Gomes, meu irmão Kauã Gomes, meu padrinho Edinaldo Morena e meus avós Joselita Moreira e Francisco Oliveira, por todo o apoio e suporte em minha formação.

Aos meus colegas do Laia (Laboratório de automação e instrumentação analítica), por todas as boas conversas, ajuda no desenvolvimento do projeto e pela amizade construída ao longo do tempo.

Agradeço a todos os colegas que fizeram parte desse caminho: Berlane, Irlan, Rodrigo(IC), Fernando, Eleilton, Nathalia, Josué, Masoud, Mesaque, Eric(Pop), Akira, Mayara pela amizade e pela paciência em me auxiliar.

Aos meus amigos Raphael Bacil e Jéssica Luíza, pela colaboração nos estudos de mecanismo e pela disposição em compartilhar conhecimento.

Ao professor Lucio Angnes, por ter aceitado minha solicitação para ser aluno de mestrado, por abrir as portas no seu laboratório e por sua excelente orientação. Agradeço pelas conversas de incentivo, pelos conselhos e por ter acreditado em minha capacidade, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos técnicos de laboratório do IQ-USP, especialmente o Fernando e Daniel, sempre prestativos e dispostos a ajudar.

Aos funcionários administrativos do Programa de Pós-graduação do IQ-USP, Milton e Vanderlei, pelo suporte e apoio ao longo do curso.

Ao professor Claudimir do Lago e ao professor Ivano Gutz, com os quais compartilhamos o espaço do laboratório e vivenciamos bons momentos e experiências.

À professora Silva Serrano, por permitir o acesso ao seu laboratório para parcerias e por todos os ensinamentos, conselhos e incentivos recebidos durante o mestrado.

Aos meus amigos de infância Renã Santos, Lucca (Cuca), Robert e Victor (Vitão) por sempre acreditarem no meu potencial e me incentivarem ao longo dessa trajetória.

Aos meus colegas do “Areião”, pelo momento de lazer e descontração durante as semanas no tradicional futebol da USP.

Agradeço a Universidade de São Paulo pela oportunidade de estudo no Instituto de Química e ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos, meu sincero agradecimento por fazerem parte dessa importante etapa da minha vida.

“Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do voo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode leva-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre tem um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o voo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em voo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar.

Ensinar o voo, isso elas não podem fazer, porque o voo, já nasce dentro dos pássaros. O voo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado. ”

Rubem Alves

RESUMO

T. G. Oliveira. Estudo da oxidação eletroquímica da indapamida para aplicação eletroanalítica. 2023. 123 p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Os diuréticos são frequentemente utilizados por atletas para promover a eliminação rápida de água, resultando em uma perda de peso rápida e mascarando a presença de outras substâncias proibidas. Por esse motivo, a Agência Mundial Antidoping (WADA) incluiu os diuréticos na lista de substâncias proibidas, tanto durante as competições quanto fora delas. Neste trabalho, descrevemos procedimentos para determinações da indapamida (IND), um diurético, empregando análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica, utilizando eletrodos de disco de carbono vítreo (GCE-não tratado) ou disco de grafite tratado a laser (LTGr) como eletrodo de trabalho. Os experimentos voltamétricos e amperométricos demonstraram que o produto da oxidação da indapamida adsorve na superfície do eletrodo. Para a determinação eletroanalítica, foram identificados três processos de oxidação distintos. No entanto, optou-se por adotar uma estratégia que consiste em restringir o potencial ao intervalo em que ocorre somente o primeiro dos processos de oxidação. No sistema de injeção em fluxo com detecção amperométrica utilizando GCE, foi possível quantificar o analito em formulações farmacêuticas em uma região linear de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,995$), com um limite de detecção (LOD) de $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A aplicabilidade desse método na quantificação em urina sintética também foi demonstrada. Paralelamente, foi desenvolvido um novo dispositivo, que utiliza mina de grafite tratada a laser de CO_2 para produzir superfícies, com desempenho eletroquímico diferenciado e que permite a fabricação de sensores de baixo custo e sensíveis. Como prova de conceito, aplicamos esse dispositivo para a detecção de IND em urina sintética, obtendo uma faixa linear de concentração de 2×10^{-5} a $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.996$), com LOD de $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Por fim, foi possível formular uma proposta do mecanismo eletroquímico da IND por voltametria cíclica (VC), que envolve processo eletroquímico-químico (EC). Ficou demonstrado que a etapa eletroquímica é dependente do pH (transferência de elétron

acoplada à de próton). Em conclusão, nesse trabalho são demonstradas novas formas de detectar a IND, é dada uma contribuição para elucidar os processos que ocorrem na superfície do eletrodo.

Palavras chaves: Diurético, Indapamida (IND), técnicas eletroquímicas, GCE, LTGr e FIA.

ABSTRACT

T.G. Oliveira. Study of the electrochemical oxidation of indapamide for electroanalytical application. 2023. p. 123 Master's Dissertation – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo.

Diuretics are often used by athletes to promote the rapid elimination of water, resulting in rapid weight loss and masking the presence of other prohibited substances. For this reason, the World Anti-Doping Agency (WADA) has included diuretics in the list of prohibited substances, both during competitions and outside them. In this work, we describe procedures for determinations of indapamide (IND), a diuretic, employing flow injection analysis (FIA) with amperometric detection, using glassy carbon electrodes (GCE-untreated) or laser-treated graphite (LTGr) as working disk electrodes. Voltammetric and amperometric experiments demonstrated that the oxidation product of indapamide adsorbs on the electrode surface. For the electroanalytical determination, the strategy of restricting the potential was adopted, in which only the first process occurs. In the flow injection system by amperometric detection using GCE, it was possible to quantify pharmaceutical formulations in a linear region from 2×10^{-6} mol L⁻¹ to 25×10^{-6} mol L⁻¹ ($R^2 = 0.995$), with a limit of detection (LOD) of 3×10^{-7} mol L⁻¹. To demonstrate the applicability of this method in urine quantification, we also performed quantification in synthetic urine. At the same time, a new device was developed, which uses graphite treated with a CO₂ laser capable of producing surfaces with differentiated electrochemical performance and which allows the manufacture of low-cost and sensitive sensors. as proof of concept, we applied this device for the detection of IND in synthetic urine, obtaining a linear concentration range from 2×10^{-5} to 7×10^{-5} mol L⁻¹ ($R^2=0.996$), with

LOD of 5×10^{-7} mol L⁻¹. Finally, it was possible to formulate a proposal for the electrochemical mechanism of IND by cyclic voltammetry (VC), which involves an electrochemical-chemical (EC) process. It has been shown that the electrochemical step is pH-dependent (proton-coupled electron transfer). In conclusion, this work demonstrates new ways to detect IND, and makes a contribution to elucidate the processes that occur on the electrode surface.

Keywords: Diuretic, Indapamide (IND), electrochemical techniques, GCE, LTGr and FIA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área do eletrodo
AA	Ácido ascórbico
ACSV	Voltametria de <i>stripping</i> adsortiva catódica
AS	<i>Stripping</i> adsortiva
B	Classificação do grafite, mole (do inglês <i>blackness</i>)
BDDE	Eletrodo de diamante dopado com boro
CPE	Pasta de carbono
DPV	Voltametria de pulso diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_{pa}	Potencial de oxidação
E_{pc}	Potencial de redução
E_i	Potencial inicial
E_f	Potencial final
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
F	Constante de faraday
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês <i>Glass carbon</i>)
GLU	Glicose
H	Classificação do grafite, duro (do inglês <i>hardness</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
HMDE	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
I	Corrente elétrica
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
I_F	Corrente faradaíca

I_c	Corrente Capacitiva
IND	Indapamida
INT	Interferente
J	Fluxo de carga
K_a	Constante de velocidade eletroquímica (oxidação)
K_c	Constante de velocidade eletroquímica (redução)
K_s	Constante de velocidade padrão
LTGr	Grafite tratado a laser
LOD	Limite de detecção
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NTGr	Grafite não tratado na laser
OG	Óxido de grafeno
OMS	Organização mundial da saúde
PLA	Poli (ácido lático)
R	Constante universal dos gases
SWV	Voltametria de onda quadrada
SWAD	Voltametria de onda quadrada por adsorção
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
WADA	Agência Mundial Antidoping (do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>)
α	Coeficiente de transferência de carga (redução)
β	Coeficiente de transferência de carga (oxidação)
ΔG_r	Energia livre de Gibbs
ΔE_p	Variação de potencial de pico
Φ_M	Potencial do eletrodo
Φ_s	Potencial da espécie química em solução

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da Indapamida (IND).....	24
Figura 2: Exemplos de diuréticos da classe dos tiazídicos [23].	29
Figura 3: Esquema de um sistema para análise por injeção em fluxo, utilizando gravidade como propulsão da solução carreadora, para uma célula eletroquímica (detecção amperométrica). Ao lado é representado o gráfico resultante (corrente vs tempo).	31
Figura 4: Representação da célula eletroquímica do sistema de três eletrodos	33
Figura 5: Ilustração do transporte de massa da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo adaptado de [32].	35
Figura 6: Mudança de Φ_M e Φ_s alterando o perfil de energia nos processos de eletrodo adaptado de [32].	37
Figura 7: Forma de onda aplicada ao eletrodo de trabalho (ET) na voltametria cíclica (CV) [32].	39
Figura 8: Representação esquemática de um voltamograma cíclico [30,32]. ...	40
Figura 9: (a) Perturbação aplicada no eletrodo de trabalho; (b) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.	43
Figura 10: Representação da estrutura do grafeno	46
Figura 11: Representação da pirólise em superfície de grafite com laser de CO ₂	47
Figura 12: Sistema gravimétrico com controle de nível constituído de (A) um frasco de polietileno (1 L); (B) suporte de PLA impresso em impressora 3-D; (C) balão volumétrico de 500 mL em posição invertida para manter o nível da solução constante; (D) tubo de polietileno adaptado na tampa do frasco para conduzir o eletrólito.	51
Figura 13: (A) Célula de fluxo constituída por: A- Bloco comercial Kel-F contendo eletrodo de GCE; B- Espaçador; C- Bloco de Plexiglass (construído em nosso laboratório) para completar a célula de fluxo. Um grupo de quatro furos foi feito no espaçador (B) e no bloco superior (C) Quatro parafusos (não mostrados) tem a função de unir todas as partes. As soluções entram na célula pela esquerda (entrada), passam na minúscula câmara definida pelo furo central feito no espaçador e são conduzidas para	

a saída. O eletrodo de referência é posicionado exatamente à frente do eletrodo de trabalho e um tubo inox inserido no canal de saída funcionando como contra eletrodo.

(B) Célula de fluxo acoplado ao LTGr, A – eletrodo auxiliar, B – eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl_(sat.)), C - eletrodo de trabalho (LTGr), D – saída de fluxo e E – pipeta. 53

Figura 14: Esquema do preparado da solução de comprimido de indapamida. 55

Figura 15: **(A)** Voltamogramas cíclicos de: tampão fosfato, (pH = 12), 0,10 mol L⁻¹ (**tracejado**); solução de IND 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato, (pH 12), 0,10 mol L⁻¹ (**vermelho**). **(B)** Três ciclos em sequência na mesma solução contendo 1,0 mmol L⁻¹ de IND em tampão fosfato, pH = 12, 0,10 mol L⁻¹. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.), E_i=0,0 V, E_f=0,80 V, potencial de parada = 0,0 V, v = 50 mV s⁻¹, step potencial = 0,0024 V e intervalo de tempo = 0,049 s. 60

Figura 16: **(A)** Voltamogramas cíclicos registrados em tampão fosfato (pH = 12) 0,10 mol L⁻¹ (**tracejado**) e após a adição 1 mmol L⁻¹ de IND em tampão fosfato (pH=12) 0,1 mol L⁻¹ (**vermelho**) **(B)** Três ciclos repetidos na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de IND. Condições experimentais: igual a descrita (Figura 15). A solução foi agitada após cada voltamograma. 61

Figura 17: **(A)** VC em diferentes velocidades de varredura: (--) branco ; (-) 5; (-) 9; (-) 20; (-) 40; (-) 60; (-) 80 e (-) 100 mV s⁻¹ e **(B)** Relação linear de I_p vs v^{1/2}. Sem limpeza do eletrodo entre as medidas. Voltamogramas registrados em GCE, em solução de IND 1,0 mmol L⁻¹, em solução tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH=12). Condições experimentais similares a figura 15. 62

Figura 18: Variação do logaritmo das correntes de pico (I_{pa,1}), em função do logaritmo da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com GCE, em solução de IND 1,0 mmol L⁻¹, em solução tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH=12). [I(μA)] = - 4,82 + 0,420 [indapamida (μmol L⁻¹)], R²=0,999. Condições experimentais: igual (Figura 20). 63

Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo de 0 a 6 mmol L⁻¹ de IND. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.), E_i = -0,2 V, E_f = 0,2 V, v = 50 mV s⁻¹, step potencial= 0,0024 V e intervalo de tempo= 0,049 s. **(A)** diferentes concentrações: (--) eletrólito de suporte

apenas; (-) 1; (-) 2; (-) 3; (-) 4; (-) 5 e (-) 6 mmol L⁻¹ de IND **(B)** Relação linear de I_p vs concentração de IND. 64

Figura 20: Experimentos de FIA com potencial fixo em: 0,20 V (A) e 0,50 V (B) para injeções de IND a 200 μmol L⁻¹ utilizando o sistema FIA de linha única com vazão 4,0 mL min⁻¹, volume injetado de 125 μL. Condições experimentais: sistema linha única, carreador = tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 12), detecção amperométrica: ET = GCE; EA = platina, RE = Ag/AgCl/KCl_(sat.). 66

Figura 21: Registros de uma série de injeções de uma solução contendo (a) sinais transientes obtidos em triplicata para: amostra farmacêutica; (b) amostras farmacêuticas mais 2 μmol L⁻¹ de indapamida; (c) amostras farmacêuticas acrescidas de 8 μmol L⁻¹ de indapamida; (d) amostras farmacêuticas mais 12 μmol L⁻¹ de indapamida; (e) amostras farmacêuticas acrescidas de 16 μmol L⁻¹ de indapamida e (f) amostras farmacêuticas acrescidas de 25 μmol L⁻¹ de indapamida. Condições experimentais: Potencial = 0,2 V; Vazão = 4,0 mL min⁻¹; volume injetado: 125 μL. 67

Figura 22: Análise de indapamida em amostra de urina sintética. (a) Amostra sintética contendo 20 μmol L⁻¹ de indapamida; (b) o mesmo que (a) mais 5 μmol L⁻¹ de indapamida; (c) o mesmo que (a) mais 10 μmol L⁻¹ de indapamida; (d) o mesmo que (a) mais 20 μmol L⁻¹ de indapamida; (e) o mesmo que (a) mais 25 μmol L⁻¹ de indapamida e (f) o mesmo que (a) mais 30 μmol L⁻¹ de indapamida. Condições experimentais idênticas às da Figura 24. 68

Figura 23: Cromatograma típico: (A) Solução padrão de 15 μmol L⁻¹ de IND; (B) curva de calibração (5,00; 10,0; 15,0; 25,0 e 30,0 μmol L⁻¹) de IND. Soluções foram dissolvidas em fase móvel isocrática (60 % de acetonitrila + 40 % de solução aquosa). 70

Figura 24: Escolha da dureza da mina de grafite e otimização dos parâmetros do tratamento com laser com base na razão entre corrente faradaica (I_F) e capacitiva (I_C). (A) tipo de grafite, (B) potência do laser, (C) taxa de varredura e (D) distância focal do feixe de laser (medida entre a lente e o grafite). 76

Figura 25: Voltamogramas cíclicos (CVs) registrados com uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ usando grafite tipo H não tratado - NTGr (azul) e tratado - LTGr (vermelho) sob a condição otimizada de 50,0 % da potência do laser, 1,00 mm s⁻¹ de taxa de

varredura do laser e 10 mm de altura do laser na seguinte solução. (A) Solução aquosa de KCl 0,10 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN₆)]^{3-/4-}; (B) Solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ com dopamina 1,0 mmol L⁻¹. (C) A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada no potencial de circuito aberto usando um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl contendo 4,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN₆)]^{3-/4-} usando eletrodos de grafite não tratados (azul) e tratados (vermelho) usando potencial alternado com uma amplitude de 10 mV operando na faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz. (D) Estudo em diferentes taxas de varredura em 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN₆)]^{3-/4-} 79

Figura 26: Imagens FE-SEM de grafite (A-B) não tratado e (C-D) tratado com laser de duas regiões diferentes e em ampliação crescente (as ampliações das imagens aumentam de cima para baixo: x1000, x10 000 e x25 000). 80

Figura 27: Mapeamento Raman de (A) NTGr e (B) LTGr, obtido usando um laser de comprimento de onda de 532 nm com uma lente de aumento x5, potência do laser de 100%, tempo de exposição de 5 s e acúmulo de 1 em uma área de 11 x 11 μm. (C) Espectro Raman (λ_{exc}=532 nm) de NTGr (linha ciano), LTGr (linha azul royal). 81

Figura 28: Representação esquemática da determinação da IND em FIA amperométrico usando LTGr. 83

Figura 29: (A) Curvas analíticas com LTGr para concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de (a) 10,0 (b) 20,0 (c) 30,0 (d) 40,0 (e) 50,0 (f) 60,0 e (g) 70,0 μmol L⁻¹. (B) Ajustes lineares nas curvas de calibração com aumento e diminuição da concentração de IND. (C) Estudos de repetibilidade (n=10) de 1,0 mM IND. (D) Amperograma para determinação de IND pelo sistema FIA em urina sintética enriquecida. Curva analítica (a) 20,0 (b) 30,0 (c) 40,0 (d) 50,0 (e) 60,0 (f) 70,0 μmol L⁻¹, (S1) amostra 1 e (S2) amostra 2. Condições experimentais : tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH=12), alça de amostragem de 150 μL, vazão de 1,60 mL min⁻¹ e potencial +0,20 V vs Ag/AgCl KCl_(sat.). 85

Figura 30: Voltamogramas cíclicos (VCs) (1º ciclo) típicos obtidos em soluções de indapamida em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 12 em diferentes velocidades de varredura, de 0,0010 a 1,0 V s⁻¹. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER

= Ag/AgCl/KCl_(sat.), E_i = -0,4 V, E_f = 0,8 V. O eletrodo de trabalho foi polido após a obtenção de cada voltamograma. 89

Figura 31: Voltamogramas cíclicos (VCs) (1º ciclo) obtidos com GCE em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH = 12 contendo 1,0 mmol L⁻¹ de IND. (A) Janela restrita no processo I em diferentes velocidades 0,0020 a 1,0 V s⁻¹; (B) Relação $i_{pa,1} / i_{pc,1}$ em função da taxa de varredura (v) no primeiro processo de oxidação. Condições experimentais similares aquelas descritas na figura 30. 90

Figura 32: SWV típico obtido em soluções de indapamida em DMSO/tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH=12. Condições experimentais: varredura de 0,0 a 0,80 V, velocidade de varredura de 0,10 V s⁻¹. 92

Figura 33: Gráfico E_{pa,1} vs log v obtido em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH=12 contendo 1 mmol L⁻¹ de IND. (E_{pa,1} = 0,030 log v + 0,113, R²= 0,991). 93

Figura 34: Gráfico de corrente de pico de oxidação de indapamida em função da raiz quadrada das taxas de varredura, em comparação com os gráficos teóricos das equações de Randles-Sevcik (quadrado preto - valores de corrente de pico experimentais IND; **linha preta** – processo irreversível de várias etapas, em que n’=0 (sendo n’ o número de elétrons antes da etapa determinante da velocidade), n= 2 (n é o número total de elétrons transferidos), β=0,2 (coeficiente de transferencia de carga anódica); **linha vermelha** - irreversível n=1 β = 0,2, área do eletrodo = 0,0314 cm², D = 4,31 × 10⁻⁵ cms⁻¹. 94

Figura 35: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de indapamida 1 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em valores de pH de 2,0 a 12 em diferentes velocidades de varredura de 0,0020 a 1,0 V s⁻¹. 95

Figura 36: Diagrama de Pourbaix (Potencial de pico em função do pH) dos processos IND. A) Processo I – inclinação E_{pa,1} = -0,050pH + 0,706, R²=0.994, B) Processo II. 97

Figura 37: Valores de β diferentes valores de pH: A) processo I e B) processo II. Os voltamogramas foram obtidos em solução de IND 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ para o intervalo de potencial (-0,4 V a 0,8 V vs Ag/AgCl_(KCl, sat.)). 99

Figura 38: Mecanismo de oxidação eletroquímica proposto para os três processos IND. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados	48
Tabela 2: Avaliação do efeito dos sais na urina sintética sobre o sinal da indapamida ($16 \mu\text{mol L}^{-1}$)	71
Tabela 3: Estudos voltamétricos envolvendo a quantificação de IND	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Considerações gerais	24
1.2 Indapamida	26
1.3 Uso de diuréticos nos esportes	28
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1 Análise por injeção em fluxo (FIA)	29
2.2 Detecção eletroquímica	32
2.2.1. <i>Sistema eletroquímico: célula de três eletrodos</i>	32
2.2.2 <i>Transferência de carga na superfície do eletrodo</i>	33
2.2.3 <i>Cinética eletroquímica: Equação de Butler-Volmer</i>	35
2.2.4 <i>Voltametria cíclica (VC)</i>	38
2.2.5 <i>Amperometria</i>	42
2.2.6 <i>Modificação de superfície: Sensores de grafite de lápis</i>	44
3 OBJETIVO	47
3.1 Objetivos Gerais	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 PARTE EXPERIMENTAL	48
4.1 Reagentes e soluções	48
4.2 Instrumentação	50
4.2.1 <i>Medidas Eletroquímicas</i>	50
4.2.2 <i>Análises em Fluxo</i>	50
4.2.3 <i>Medidas cromatográficas</i>	53
4.2.4 <i>Espectroscopia Raman</i>	54
4.2.5 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	54

5 PROCEDIMENTOS	54
5.1 Preparo de amostras	54
5.2 Determinação de IND	56
5.3 Tratamento a laser de eletrodos de grafite (LTGr) de lapiseiras	56
5.3.1 <i>Investigação eletroquímica da superfície do eletrodo (LTGr)</i>	57
5.4 Proposta de mecanismo de oxidação da IND	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 Parte I – Detecção amperométrica de indapamida em GCE	58
6.1.1 <i>Comportamento eletroquímico da IND</i>	58
6.1.2 <i>Aplicação analítica: FIA</i>	64
6.1.2.1 <i>Otimização dos parâmetros do sistema de fluxo</i>	64
6.1.2.2 <i>Demonstração da seleção adequada do potencial de trabalho</i>	65
6.1.2.3 <i>Quantificação de IND em fármaco e urina sintética</i>	66
6.1.2.4 <i>Determinação da IND por HPLC</i>	69
6.1.2.5 <i>Estudos de interferentes</i>	70
6.1.3 <i>Considerações finais da parte I</i>	73
6.2 Parte II - Eletrodos de grafite de lapiseiras tratados a laser (LTGr) para quantificação amperométrica de indapamida	74
6.2.1 <i>Fabricação do eletrodo (LTGr)</i>	75
6.2.2 <i>Caracterização do LTGr</i>	78
6.2.3 <i>Detecção amperométrica em LTGr</i>	82
6.2.3.1 <i>Otimizações das condições do sistema FIA</i>	82
6.2.3.2 <i>Parâmetros analíticos</i>	83
6.2.3.3 <i>Determinação de IND em urina sintética</i>	85
6.2.4 <i>Considerações finais da parte II</i>	87

6.3 Parte III - Mecanismo eletroquímico da indapamida em GCE	88
6.3.1 <i>Voltametria cíclica e de onda quadrada: o comportamento eletroquímico da indapamida</i>	89
6.3.2 <i>Equação de Randles-Sevcik e discriminação do mecanismo de oxidação</i>	93
6.3.3 <i>A influência do pH na etapa química da IND</i>	95
6.3.4 <i>Oxidação eletroquímica dos processos I e II</i>	97
6.3.5 <i>Proposta de mecanismo</i>	100
6.3.6 <i>Considerações finais da parte III</i>	101
7 CONCLUSÕES	102
8 PERSPECTIVAS	103
9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	104
APÊNDICE 1	110
<i>Súmula Curricular:</i>	110
<i>Trabalhos apresentados em congresso:</i>	112
<i>Artigos Científicos:</i>	112
<i>Coorientação de alunos de iniciação científica:</i>	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A indapamida (IND) é um fármaco da classe dos diuréticos tiazídicos, derivado da substância sulfonamida. Possui efeitos diuréticos e natriuréticos, sendo considerada um fármaco de primeira linha para terapia anti-hipertensiva, de acordo com as diretrizes para prevenção da hipertensão da Organização Mundial da Saúde (OMS) [1].

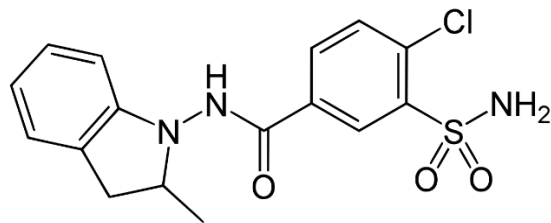


Figura 1: Estrutura química da Indapamida (IND)

A IND é um diurético usado para aumentar a taxa de fluxo de urina e excreção de sódio, com a finalidade de ajustar o volume e a composição dos fluidos corporais ou eliminar o excesso de fluidos nos tecidos [2]. Entretanto, este diurético foi banido em 1988 devido ao seu uso abusivo por atletas. As duas principais razões para o seu uso foram: a capacidade de remover água do corpo, causando uma rápida perda de peso e a capacidade de mascarar a utilização de agentes dopantes. Adicionalmente, o efeito de diluição dos diuréticos também permite classifica-los como agentes de mascaramento [3].

Devido ao crescente investimento financeiro nos atletas, tornou-se comum o uso de IND e outros diuréticos para alcançar máximo desempenho. Portanto, a partir de 1988 surgiu a necessidade de desenvolver métodos analíticos para a detecção da IND. De acordo com a (farmacopeia europeia, 2019), a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (em inglês “*high performance liquid chromatography*”) é o método oficial para a quantificação de IND [4]. A quantificação por cromatografia apresenta alta sensibilidade, seletividade e boa estabilidade para a determinação de IND, mas apresenta limitações quanto à detecção *in situ* devido aos grandes instrumentos utilizados, bem como aos procedimentos de pré-tratamento de amostra [5].

Assim, os métodos eletroanalíticos tem atraído a atenção nos últimos anos devido a atributos como o baixo custo dos sensores, rapidez de análise, boa sensibilidade, simplicidade e facilidade de miniaturização. Some-se ainda a possibilidade de análise *in situ* sem a necessidade de um preparo complexo da matriz [6]. Adicionalmente, há a possibilidade de mecanizar ou automatizar os processos químicos para obter excelentes resultados em termos de velocidade, precisão e exatidão utilizando a técnica de análise por injeção em fluxo - FIA [7].

Em análise por injeção em fluxo são utilizados detectores coulométricos, voltamétricos, potenciométricos e amperométricos. Estes detectores são responsáveis pelas informações sobre o(s) analito(s). A amperometria é a técnica mais comumente utilizada em FIA, na qual um potencial fixo é aplicado ao eletrodo de trabalho e o analito sofre uma reação redox na superfície do eletrodo, sendo a corrente resultante medida em função do tempo [8,9].

Até o momento, existem poucos estudos relacionados à determinação de indapamida utilizando técnicas eletroanalíticas. No presente estudo, é descrito o desenvolvimento de uma técnica alternativa para quantificar a IND, visando principalmente reduzir o tempo de análise para obter uma resposta rápida, sensível e de baixo custo com potencial para a utilização em laboratórios de controle de doping. A estratégia consistiu em um estudo inicial por voltametria cíclica (VC) que evidenciou uma sucessão de três processos anódicos sendo que somente o primeiro oferece uma janela de potencial, em que é evitado o envenenamento na superfície do eletrodo. Este estudo foi fundamental para a escolha do potencial de trabalho na determinação por FIA de IND, com detecção amperométrica, tanto utilizando GGE como LTGr. Com base nestes estudos por VC, foi possível também propor o mecanismo de oxidação deste fármaco.

1.2 Indapamida

A indapamida (Cloro-N-(2-metil-2,3-di-hidro-1H-indol-1-il)-3-sulfamoilbenzamida, de fórmula $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$, PM = 365,835 g/mol e pKa = 8,8) é um diurético do tipo tiazídico, mas sua estrutura molecular difere de outros medicamentos tiazídicos pela presença de um anel 2-metil indolina, que confere importantes propriedades lipofílicas [10]. Embora algumas evidências indiquem que a ação anti-hipertensiva da indapamida seja principalmente resultado de sua atividade diurética, apenas uma diurese limitada ocorre com as doses anti-hipertensivas usuais de 2,5 mg por dia. Estudos sugerem que IND pode reduzir a pressão sanguínea, diminuindo a reatividade vascular e a resistência vascular periférica [11].

Portanto, esse fármaco apresenta-se como uma alternativa adequada para o tratamento de hipertensão leve a moderada. Nestes casos, sua eficácia na redução da pressão arterial é comparável á dos diuréticos tiazídicos e dos agentes bloqueadores β -adrenérgicos quando utilizado como monoterapia. Além disso, esse medicamento é considerado uma opção de primeira linha no tratamento da hipertensão [12,13].

A indapamida atua principalmente inibindo a reabsorção de sódio nos túbulos distais, onde parte de sua ação envolve o cotransporte de Na^+ e Cl^- nas células epiteliais renais. Essa inibição resulta em uma redução na reabsorção de sódio e cloreto, aumentando a concentração desses íons na urina e, conseqüentemente, promovendo um aumento na excreção de água. Ao aumentar a excreção de água, a indapamida também contribui para a diminuição do volume sanguíneo e para a redução da pressão arterial. Em outras palavras, a atividade anti-hipertensiva da indapamida pode ser explicada principalmente pelo seu vasorrelaxamento. Este efeito vascular direto é mais pronunciado do que o produzido pela hidroclorotiazida ou outros diuréticos. Este desempenho diferenciado é atribuído á sua alta lipofilicidade que deve favorecer a ligação seletiva aos túbulos [13,14].

Assim, a formulação de liberação prolongada na concentração de 1,5 mg de IND atinge o máximo efeito anti-hipertensivo com uma única dose em 24 horas. Sua utilização ainda melhora parâmetros arteriais e reduz a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), enquanto preserva o perfil metabólico [15].

1.3 Uso de diuréticos nos esportes

No mundo dos esportes, diuréticos são usados de forma abusiva por atletas para excretar água e obter uma rápida perda de peso, além de mascarar a presença de outras substâncias proibidas, tais como esteróides, anabólicos, androgênicos, glicocorticosteroides, hormônios peptídicos, canabinóides, etc [3,19,20].

Existem poucas evidências que comprovem a melhora do desempenho atlético após a administração de diuréticos, sendo que seu uso abusivo visa principalmente para a rápida perda de peso. O uso de diuréticos pode permitir que um atleta reduza temporariamente o peso corporal, o que confere uma clara vantagem em esportes como luta livre, boxe, judô e levantamento de peso. Além disso, os diuréticos são frequentemente usados simultaneamente com esteroides androgênicos-anabolizantes por fisiculturistas, com o objetivo de acentuar a definição muscular e o tônus corporal [21].

Os diuréticos tiazídicos são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo, alta tolerância, boa adesão (administração única diária) e baixa contraindicação. Nas olimpíadas de 2008, essa classe de diuréticos foi a mais detectada, representando 38,7 % das amostras positivas de *dopping*, de acordo com a WADA (Agência Mundial Antidoping) [22].

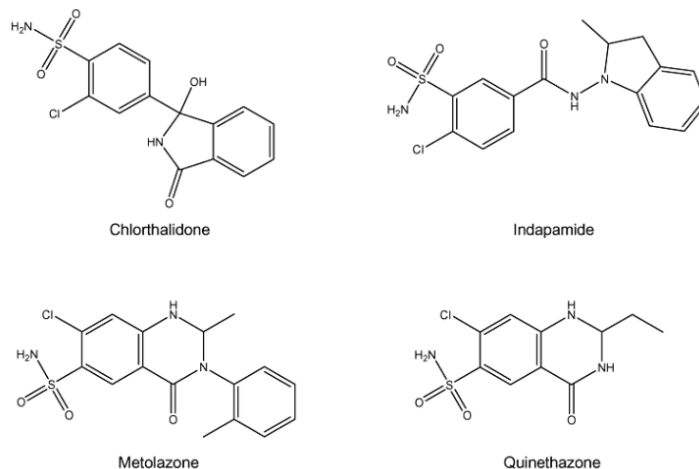


Figura 2: Exemplos de diuréticos da classe dos tiazídicos [23].

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nessa seção, é apresentada uma breve revisão dos conceitos de química eletroanalítica e dos principais fundamentos do FIA.

2.1 Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção de fluxo (FIA) é baseada na injeção de uma amostra líquida em um fluxo transportador contínuo não segmentado. A amostra injetada forma uma zona que é transportada para um detector, o qual registra continuamente parâmetros físicos como p.e. a absorvância, a corrente, o potencial entre eletrodos, etc. Durante a passagem do material de amostra através da célula de fluxo, as variações de sinal proporcionado por sua presença é registrado [24]. O sistema FIA mais simples consiste em um aparato para movimentar o líquido por uma tubulação que compreende, uma porta de injeção que permite intercalar uma alça de volume definido preenchida com uma

solução de amostra (ou padrão) na linha de fluxo, de maneira reprodutível. Em geral as técnicas voltamétricas não requerem um reator onde a amostra se disperse e reaja com reagentes na corrente de transporte, condição indispensável por exemplo em FIA com detecção espectrofotométrica. Por isso, geralmente o detector é colocado muito próximo do injetor de amostras, minimizando a dispersão do reagente [20,25], o que é vantajoso, tanto pela simplicidade, como pela menor dispersão do analito.

De acordo com Richter e col. [26], a técnica é fundamentada em três princípios: propulsão da solução carreadora, injeção da amostra, e detecção. A propulsão pode ser realizada de várias maneiras, sendo as mais comuns baseadas em bombas peristálticas, seringas motorizadas, sistemas pressurizados (por gás comprimido) ou mesmo por gravidade, proporcionando um fluxo “constante”. Ao longo do nosso trabalho, optou-se por utilizar a gravidade como meio de propulsão do fluido, conforme ilustrado na **Figura 3**. Destaca-se que, por utilizarmos o mesmo eletrólito no fluido carreador, nos padrões e nas amostra e por não dependermos da geração de um produto ao longo do processo de transporte até o sistema de detecção, pudemos prescindir da bobina de reação entre o injetor e o detector amperométrico.

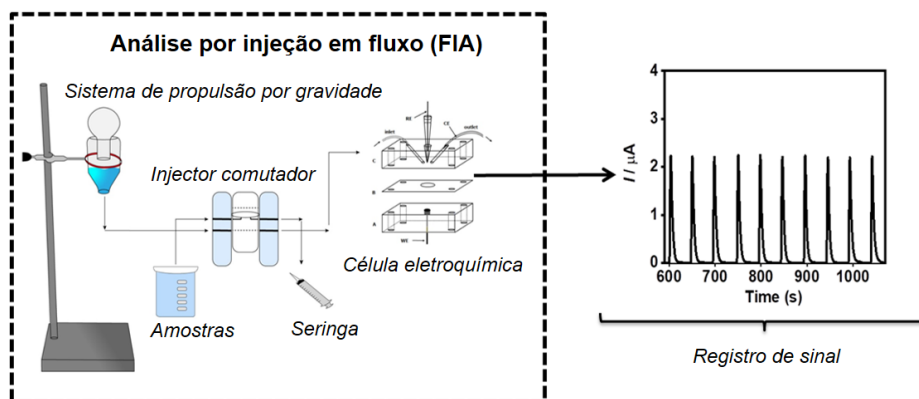


Figura 3: Esquema de um sistema para análise por injeção em fluxo, utilizando gravidade como propulsão da solução carreadora, para uma célula eletroquímica (detecção amperométrica). Ao lado é representado o gráfico resultante (corrente vs tempo) – próprio autor.

O injetor desempenha a função de transferir um volume reprodutível do analito para o fluxo contínuo, que contém a solução carreadora, que a seguir vai alcançar a célula eletroquímica, onde será registrado o sinal amperométrico produzido [21].

Sistemas FIA podem ser associados a diferentes detectores, tais como espectrométrico, fluorimétrico, luminescente, eletroquímico, entre outros. FIA proporciona vantagens como economia de reagentes, minimização de contaminações, alta frequência analítica e facilidade de integração com diversas associações com técnicas analíticas [27].

Os detectores eletroquímicos são atrativos para serem associados ao FIA devido ao baixo custo de instrumentação, facilidade de aplicação e redução de etapas de preparo de amostras. Os detectores mais comumente utilizados em sistemas em fluxo são os amperométricos, nos quais o eletrodo de trabalho é mantido em um potencial constante, permitindo a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse [28,29].

As principais vantagens da detecção amperométrica convencional acoplada aos sistemas FIA, em comparação com os métodos voltamétricos convencionais, são: a) maior sensibilidade (devido ao aumento significativo no transporte de massa proporcionado pelo fluxo da solução); b) diminuição dos efeitos de contaminação na superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que o tempo de contato da amostra e dos produtos do processo redox com o eletrodo é muito menor em comparação com

processos estacionários; c) virtual inexistência de corrente capacitiva instantes após o início do experimento (aplicação de um único potencial constante em função do tempo), o que favorece a medição de correntes faradaicas extremamente baixas (e, conseqüentemente, de baixas concentrações do analito) [30,31]. Para que a corrente capacitiva não afete significativamente as medições, é fundamental que se tenha eletrólitos idênticos (em concentrações significativas) no carreador e nas amostras a serem analisadas.

2.2 Detecção eletroquímica

2.2.1. Sistema eletroquímico: célula de três eletrodos

Nos métodos estacionários, são utilizadas células contendo três eletrodos, conforme mostrado na **Figura 4**. A célula eletroquímica representada é composta pelo eletrodo de trabalho (ET), pelo eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), também conhecido como contra-eletrodo (CE). Através de um potenciostato, é possível aplicar uma diferença de potencial entre o ET e o ER. O valor do potencial aplicado ao ET é monitorado em relação ao eletrodo de referência ER, o que permite o controle do potencial sem a influência dos processos que ocorrem tanto no ET como no EA. A corrente registrada flui entre ET e EA [32,33]. O controle do potencial e a medição da corrente são simultaneamente realizados por meio do circuito eletrônico do potenciostato [30]. É importante destacar que entre o ET e o ER, a quantidade de corrente que flui é virtualmente nula, fator garantido pela alta impedância do potenciostato.

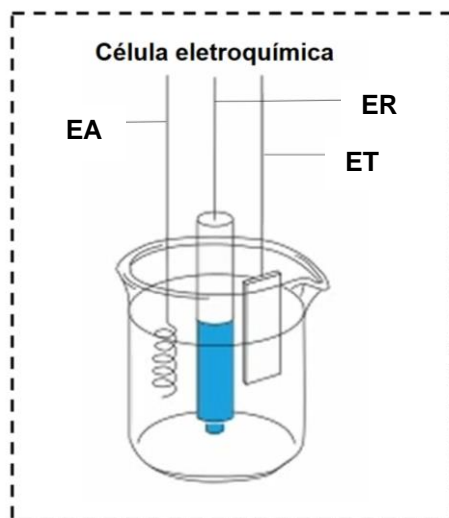


Figura 4: Representação da célula eletroquímica do sistema de três eletrodos [30].

2.2.2 Transferência de carga na superfície do eletrodo

Nos métodos voltamétricos, o potencial, a corrente ou a carga são normalmente determinados em um regime estacionário [30].

As reações redox que envolvem espécies inicialmente em solução ocorrem por meio da troca de elétrons com os eletrodos, podendo ser precedidas ou sucedidas de reações químicas. Nesse sistema, temos a presença de um reagente (A), que é uma espécie eletroativa capaz de sofrer redução ou oxidação, e um reagente (B), representado por uma superfície metálica, conforme ilustrado na **Equação 1**.



Iniciado o processo, há consumo do material eletroativo junto ao eletrodo e então é necessário que a espécie seja transportada do seio solução até a interface e encontre condições energéticas favoráveis para doar ou receber elétrons [34,35].

Essa região da interface entre o metal e a solução pode ser descrita pela contribuição de duas regiões: a dupla camada elétrica compacta, localizada próxima ao eletrodo, e a camada difusa, situada entre a dupla camada elétrica compacta e o seio da solução [31,34].

A transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie eletroativa pode ser explicada pela sobreposição dos orbitais. Por exemplo, a estrutura eletrônica de um metal apresenta “bandas” de condução, nas quais os elétrons estão livres para se mover por todo o sólido, ligando-se aos cátions metálicos. Os níveis de energia nessas ligações formam um contínuo efetivo de níveis, que são preenchidos até um máximo de energia conhecido como nível de Fermi. Por outro lado, os níveis de energia das espécies em solução estão associados a orbital moleculares, os quais podem receber ou ganhar elétrons do metal.

A diferença energética entre esses níveis é o impulso para ocorrência da transferência da carga. Esse processo é conhecido como tunelamento mecânico quântico. No entanto, quando a espécie está sujeita à eletrorredução ou eletrooxidação, ela deve estar localizada a uma distância de aproximadamente 10-20 Å (angstroms) da superfície do eletrodo. Isso ocorre porque a taxa de tunelamento diminui significativamente com o aumento da separação, uma vez que é necessária a sobreposição das funções de onda da mecânica quântica [32,35].

2.2.3 Cinética eletroquímica: Equação de Butler-Volmer

Na transferência de carga entre a espécie eletroativa e o eletrodo, é importante ressaltar que, a espécie deve difundir a partir do seio da solução até uma distância crítica para que ocorra o tunelamento, como representado na **Figura 5** [32].

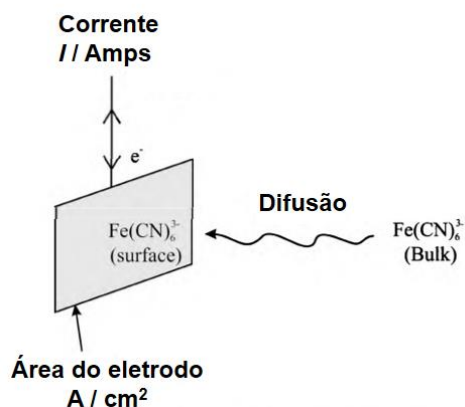


Figura 5: Ilustração do transporte de massa da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo adaptado de [32].

Dessa forma, a transferência de elétrons resulta na passagem de uma corrente elétrica, I (ampéres), através do eletrodo. Isso está relacionado ao fluxo do reagente submetido à eletrólise, J / mol cm^{-2} s^{-1} expresso na **Equação 2:** [32]

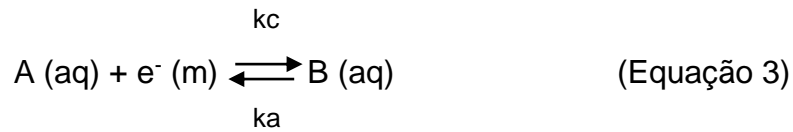
$$I = FAJ \quad (\text{Equação 2})$$

Onde F é a constante de Faraday (96485 C) e A é área do eletrodo (cm^2). O fluxo (J) pode ser entendido como uma medida da taxa da reação eletroquímica interfacial (heterogênea) [32].

Na cinética eletroquímica, um processo eletródico é considerado reversível quando a reação de transferência de carga é tão rápida que o eletrodo está sempre em equilíbrio eletroquímico. Nesse caso, o transporte de matéria, geralmente por difusão, é

o passo determinante da cinética do processo global. Por outro lado, um processo eletródico é considerado irreversível quando uma ou mais reações de transferência de carga determinam a velocidade do processo. Mas, existem casos intermediários, denominados processos quase reversíveis, nos quais o transporte de matéria e a reação de transferência de carga ocorrem em velocidades comparáveis [36].

Considere-se a reação eletroquímica genérica representada pela **Equação 3**.



Nessa equação, as constantes de velocidade k_c e k_a descrevem, respectivamente, a taxa de redução e oxidação da espécie [35].

A lei de velocidade para o processo em solução pode ser expressa pela **Equação 4**:

$$J = k_c [B]_0 - k_a [A]_0. \quad (\text{Equação 4})$$

O perfil das concentrações das espécies [A], [B] e dos elétrons é alterado em função do potencial do eletrodo Φ_M e da espécie química em solução Φ_S [32].

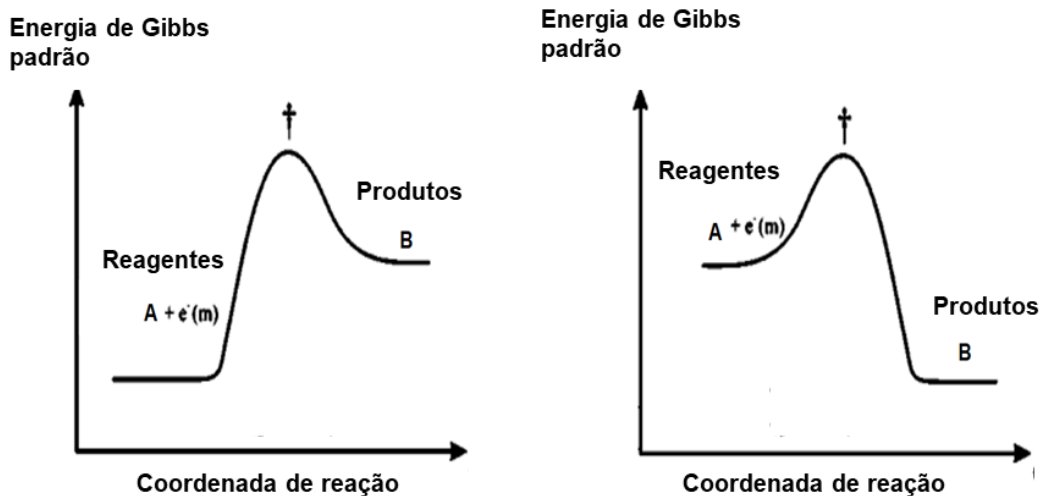


Figura 6: Mudança de Φ_M e Φ_s alterando o perfil de energia nos processos de eletrodo adaptado de [32].

Considerando a **Figura 6** pode-se escrever, sendo (\ddagger) estado de transição:

$$k_c = A_c \exp \frac{-\Delta G_c(\ddagger)}{RT} \quad (\text{Equação 5})$$

$$k_a = A_a \exp \frac{-\Delta G_a(\ddagger)}{RT} \quad (\text{Equação 6})$$

Por fim, pode ser escrita uma equação geral que nos diz que as constantes de velocidade eletroquímica para oxidação (K_a) e redução (K_c) dependem exponencialmente do potencial do eletrodo [32].

$$k_c = k_c^0 \exp \left[\frac{-\alpha F(E - E_f^0)}{RT} \right] \quad (\text{Equação 7})$$

A equação de Butler-Volmer fornece a corrente resultante da perturbação (aplicação de potencial) a um sistema composto por uma única reação de oxirredução reversível, considerando que a etapa determinante da reação é a etapa de transferência de carga [32].

$$j = k_c^0 \exp \left[\frac{-\alpha F(E - E_f^0)}{RT} \right] [B]_0 - k_a^0 \exp \left[\frac{+\beta F(E - E_f^0)}{RT} \right] [A]_0 \quad (\text{Equação 8})$$

Tafel, empiricamente, descobriu a primeira formulação da lei da cinética eletroquímica, na qual a linearização da (**Equação 8**) é conhecida como expressão gráfica de Tafel. Isso fornece informações sobre a magnitude dos coeficientes de transferência de carga, α ou β , como mostrado na **Equação 9**: [34]

$$\ln |I_{red}| = -\frac{\alpha FE}{RT} + constant$$

$$\ln |I_{ox}| = \frac{\beta FE}{RT} + constant,$$

(Equação 9)

O coeficiente de transferência, α , é definido como a fração de energia potencial eletrostática que afeta a taxa de redução em uma reação de eletrodo, enquanto a fração restante $(1-\alpha)$ ou β afeta a taxa de oxidação correspondente [34,35].

Os parâmetros cinéticos de uma reação eletroquímica heterogênea envolvendo a oxidação ou a redução de uma espécie química em um eletrodo (o coeficiente de transferência de carga α ou β e a constante de velocidade padrão K_s) podem ser determinados usando diferentes técnicas, como impedância, cronopotenciometria e voltametria. Cada uma destas técnicas possui seu próprio intervalo ideal para a medição da constante de velocidade. Para reações eletródicas lentas, a técnica de voltametria cíclica é utilizada para medir a constante de velocidade devido à sua reprodutibilidade e sua simplicidade operacional [36,37].

2.2.4 Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica é uma técnica eficiente para compreender o comportamento eletroquímico de espécies eletroativas, investigar reações químicas acopladas e estudar superfícies de eletrodos. Além disso, ela fornece informações valiosas sobre a reversibilidade de um sistema, relacionada à troca de elétrons com eletrodo, bem como aspectos termodinâmicos, mecanismos de reação, cinética, etc [31,33,34].

Na voltametria cíclica, ocorre uma varredura de potencial em um sentido e, em seguida, no sentido inverso, formando uma onda triangular. A resposta final é representada graficamente por um voltamograma [32].

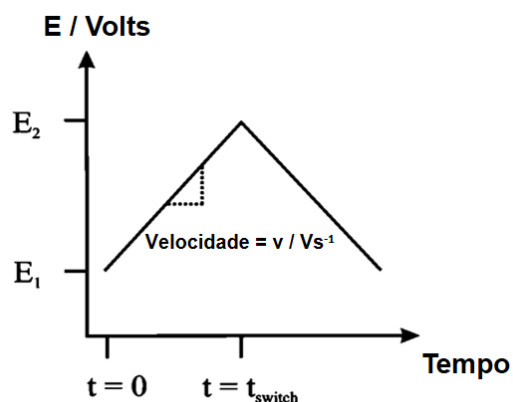


Figura 7: Forma de onda aplicada ao eletrodo de trabalho (ET) na voltametria cíclica (CV) [32].

No voltamograma apresentado na **Figura 7** é possível observar os processos de oxidação e redução que ocorrem nos eletrodos de trabalho. Esses processos são caracterizados pela corrente de pico anódica (I_{pa}) e corrente de pico catódica (I_{pc}). Além disso, são indicados o potencial de pico anódico (E_{pa}) e o potencial de pico catódico (E_{pc}). A separação dos potenciais de pico (ΔE_p) fornece informações sobre o processo e indica se o mesmo é reversível, semi-reversível ou irreversível [30].

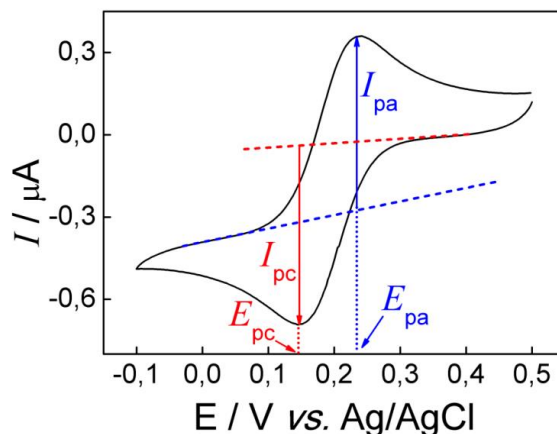


Figura 8: Representação esquemática de um voltamograma cíclico [30,32].

Para classificar um voltamograma como reversível, alguns critérios devem ser identificados:

a) Separação de pico, ΔE_p

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \sim 59/n \text{ mV} \quad (\text{Equação 10})$$

sendo n = número de elétrons transferidos

A separação de $59/n$ mV para ΔE_p deve ser independente da velocidade de varredura, mas ligeiramente dependente do potencial de inversão E_s . O potencial intermediário entre os dois potenciais de pico é o valor do potencial formal do par redox ou potencial de meia onda $E_{1/2}$.

$$E_{1/2} = (E_{pa} - E_{pc})/2 \quad (\text{Equação 11})$$

b) Corrente de pico, I_p

Os valores de I_{pa} e I_{pc} são iguais para um sistema reversível na ausência de efeitos cinéticos que alterem esse comportamento, resultando em uma relação I_{pa}/I_{pc} igual à unidade. No entanto, é importante ressaltar que essa condição é válida somente quando os coeficientes de difusão das espécies oxidada e reduzida são iguais.

O comportamento reversível ou irreversível observado depende da velocidade de varredura, e para uma varredura suficientemente rápida, em princípio, todos os processos podem parecer eletroquimicamente irreversíveis [32]. Isso ocorre porque em velocidades baixas permitem a reconstituição da camada de difusão ao redor do eletrodo, com material proveniente de regiões mais distantes. Conseqüentemente, a camada de difusão permanece espessa. Por outro lado, em velocidades de varredura mais altas, não há tempo suficiente para essa recomposição, resultando em uma camada de difusão muito mais fina.

A espessura da camada de difusão desempenha um papel fundamental no controle da taxa de transporte de material eletroativo para o eletrodo. Assim, a corrente de pico, I_p , aumenta à medida que a velocidade de varredura, v , cresce, devido à reposição mais rápida de material. Essa relação, válida tanto para processos reversíveis como irreversíveis, é descrita pela equação de Randles-Sevcik, que apresenta uma dependência da raiz quadrada da velocidade de varredura: [32,34].

$$\text{Sistema reversível} \quad I_p = 0.446nFCA\sqrt{nFvD}/RT \quad (\text{Equação 12})$$

$$\text{Sistema irreversível} \quad I_p = 0.496\sqrt{n' + \beta}FCA\sqrt{nFvD}/RT \quad (\text{Equação 13})$$

Onde I_p é a corrente de pico, n é o número total de elétrons transferidos, n' é o número de elétrons antes da etapa determinante da velocidade, β é o coeficiente de transferência de carga anódica, F é a constante de Faraday em Coulomb mol⁻¹, C é a concentração em mol cm⁻³, A a área do eletrodo em cm², v é a velocidade de varredura em V s⁻¹, R é a constante do gás em JK⁻¹ mol⁻¹, T é a temperatura em K e D é o coeficiente de difusão (cm s⁻¹).

A técnica é amplamente empregada para estudos redox do mecanismo de reação, no acompanhamento dos produtos formados no eletrodo e na detecção de intermediários [35]. Assim, a voltametria cíclica é preferencialmente utilizada para obtenção de informações qualitativas em processos que envolvem reações homogêneas. Para medidas quantitativas (especialmente para a determinação de baixas concentrações), as técnicas amperométricas de pulso são mais precisas, visto que são capazes de suprimir boa parte do processo capacitivo que afeta a precisão das medições envolvendo a voltametria cíclica. [31,35].

2.2.5 Amperometria

A amperometria é uma técnica em que o eletrodo de trabalho é mantido a um potencial constante, no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica de compostos eletroativos de interesse. A vantagem em relação às técnicas voltamétricas é o aumento da relação corrente faradaica/corrente capacitiva. Por não haver alteração do potencial, a corrente de carga (ou descarga) da dupla camada elétrica é virtualmente zero, de forma que praticamente apenas a corrente faradaica é registrada [33,35].

Para processos amperométricos com finalidades analíticas, pode ser utilizada a cronoamperometria, que consiste na aplicação de um degrau de potencial seguido do monitoramento da corrente em função do tempo, em condições estacionárias. O sinal de excitação é o degrau de potencial, conforme mostrado na **Figura 9**, em que o potencial do eletrodo de trabalho varia de um valor em que não há qualquer processo faradaico, V_1 , para um potencial fixo V_2 , em que o processo faradaico de interesse ocorre. Após a aplicação do novo potencial, a concentração da espécie eletroativa (analito) diminui na

superfície do eletrodo devido ao seu consumo. O potencial é mantido em V_2 por um tempo determinado e a corrente é medida ao final de cada ciclo, condição onde a contribuição capacitiva é mínima [30].

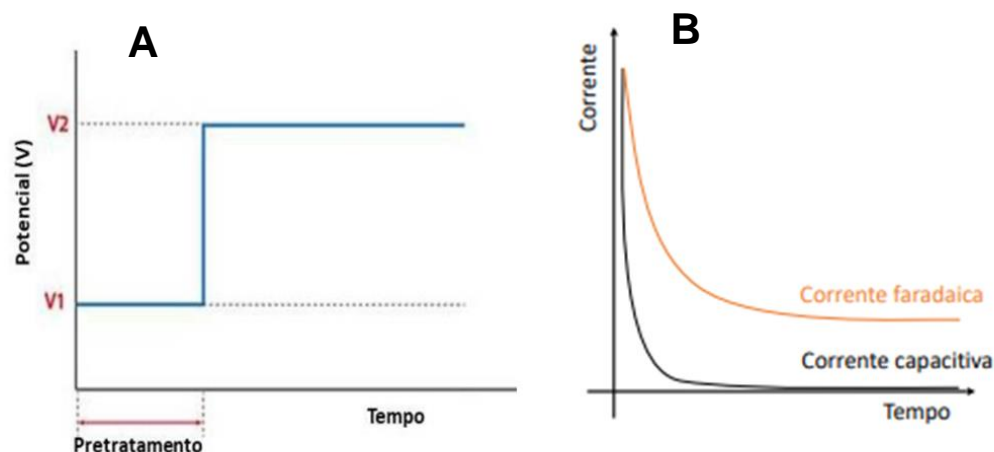


Figura 9: (a) Perturbação aplicada no eletrodo de trabalho; (b) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial [30].

A **Figura 9 B** apresenta o comportamento de decaimento das correntes (capacitiva e faradaica) em função do tempo ao ser aplicado um degrau de potencial, demonstrando que a corrente obtida a partir da ocorrência do processo faradaico parte de um determinado valor máximo esperado em $t=0$ (onde, tanto a corrente faradaica como a corrente capacitiva atingem valores máximos) e decaem com o tempo. A queda da corrente capacitiva é exponencial, ao passo que a corrente faradaica decai linearmente, sendo previstos na equação de Cottrel [30].

$$I = nFAC\sqrt{D} / \sqrt{\pi t} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde,

I = corrente

n = número de elétrons envolvidos na reação

F = Constante de Faraday

A = Área efetiva do eletrodo

C = Concentração da espécie eletroativa na solução

D = Coeficiente de difusão

t = Tempo

As informações fornecidas permitem determinar o coeficiente de difusão e a área efetiva do eletrodo usando **Equação 14**. A associação da amperometria com sistemas FIA favorece a obtenção de sinais com a menor contribuição da corrente capacitiva e conseqüentemente com elevada sensibilidade.

2.2.6 Modificação de superfície: Sensores de grafite de lápis

A fabricação de eletrodos utilizando lápis de escrita/desenho como fonte de grafite (em inglês chamados de *pencil drawing* ou *pencil lead* ou *pencil graphite electrode*) se constitui em uma fonte alternativa de sensores. Grafites de lápis são classificados pelo grau de dureza que apresentam. Esse parâmetro varia de acordo com a composição do lápis, em uma escala de 9H a 8B, em que as letras H e B significam “*hardness*” (duro, em uma tradução livre) e “*blackness*” (mole) [38]. O grafite utilizado na fabricação de

lápiz é tipicamente composto de 65 % de grafite e os 35 % restantes por argila e agentes aglutinantes, como cera, resina ou polímeros.

Assim, a alteração da superfície de um eletrodo faz com que esse passe a oferecer maiores recursos para análises eletroanalíticas. A manipulação das propriedades dos eletrodos pode levar a uma variedade de efeitos, como a eletrocatalise, a prevenção de envenenamento da superfície, a seletividade e a pré-concentração [39,40].

O grafite é um alótropo de carbono, ou seja, sua estrutura é composta apenas por átomos desse elemento. Até a década de 1980, os únicos alótropos de carbono conhecidos eram a grafite e o diamante. No entanto, com o avanço da microscopia, ainda nos anos 1980 foram descobertos os fulerenos, no início da década seguinte os nanotubos de carbono e na metade da primeira década deste século o grafeno. O grafeno pode ser descrito como uma camada monoatômica de carbono, semelhante á estrutura da grafite. Grafite consiste em várias lamelas de grafeno sobrepostas [38].

Embora o grafeno seja formado puramente por carbono, assim como o diamante, esse alótropo do carbono possui alta condutividade elétrica devido a orbitais sp^2 , que se conectam aos átomos de carbono por meio de forças intermoleculares relativamente fracas, em uma ligação pi, permitindo uma movimentação na rede cristalina.

O grafeno apresenta diversas propriedades físicas que o tornam promissor na substituição de diversos materiais usados em larga escala. Entre essas propriedades, destacam-se a condutividade elétrica e térmica, propriedade ótica e resistência mecânica [41].

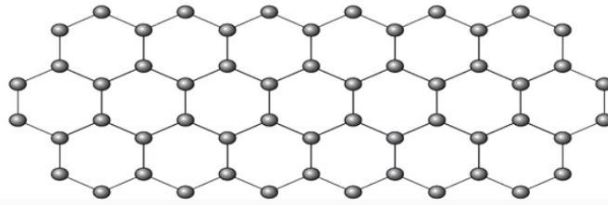


Figura 10: Representação da estrutura do grafeno [41].

Comumente, a síntese desses materiais tem como material de partida o grafite qual é frequentemente oxidado usando agentes oxidantes fortes, como KMnO_4 , KClO_3 , H_2O_2 , entre outros, e ácidos concentrados fortes, como H_2SO_4 e HNO_3 . Em seguida, ocorre um processo de esfoliação/redução, que pode ser realizado por meio de tratamento térmico, químico ou eletroquímico [42].

Nesta dissertação, descreve-se uma técnica de tratamento a laser para induzir precursores altamente condutivos em superfície de grafite por ação direta, em uma etapa única, sem a necessidade de um ambiente controlado [43,44]. Esse processo é rápido e conveniente para padronizar a otimização de superfícies de carbono, permitindo uma ampliação em escala para produção em massa e a miniaturização do dispositivo sem a necessidade de reagentes [45]. Além disso, o tratamento térmico do laser pode remover materiais não condutores das superfícies e especialmente melhorar o desempenho eletroquímico.

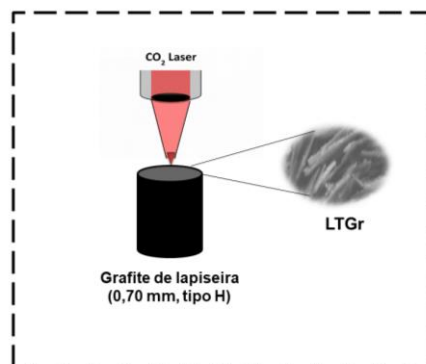


Figura 11: Representação da pirólise em superfície de grafite com laser de CO₂.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Gerais

Os objetivos desta dissertação foram compreender o comportamento eletroquímico da indapamida empregando voltametria cíclica para aplicação em FIA com detecção amperométrica, além de elaborar uma proposta para o mecanismo de oxidação.

3.2 Objetivos Específicos

1 - Estudo por VC para compreender o comportamento eletroquímico da IND e obter uma faixa de potencial ideal para evitar o “envenamento” da superfície do eletrodo de trabalho.

2 - Preparo de eletrodos (LTGr) com o uso de Laser de CO₂.

3 - Caracterização da superfície do LTGr por meio de espectroscopia Raman, Microscopia eletrônica de varredura e eletroquímica.

4 - Estudos por FIA utilizando GCE ou LTGr como eletrodo de trabalho.

5 - Quantificação da IND em formulação farmacêutica e urina sintética.

6 - Proposta de mecanismo de oxidação utilizando eletrodo de carbono vítreo.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada de um sistema de purificação Milli-Q (Merck, França, modelo de sistema Direct-Q, resistividade $\geq 18,2$ M Ω cm). Soluções tampão fosfato (PBS) 0,10 mol L⁻¹ foram preparadas solubilizando e diluindo, respectivamente, a quantidade adequada de NaH₂PO₄ e H₃PO₄ (Synth, Diadema, Brasil) em água deionizada. Os valores de pH foram ajustados adicionando solução de NaOH 3,0 mol L⁻¹. Os principais reagentes utilizados neste estudo estão listados na **tabela 1**:

Tabela 1: Reagentes utilizados

Reagentes	Procedência
Fosfato de sódio	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	Synth
Dihidrogenofosfato de potássio	Synth
Cloreto de sódio	Synth
Sulfato de sódio	Synth
Ferricianeto de Potássio	Caal
Ferrocianeto de Potássio	Carlo Erba
Ureia	Sigma-Aldrich
Dopamina	Sigma-Aldrich
Cloreto de cálcio di-hidratado	Merck

Glicose	Merck
Ácido Ascórbico	Merck
Indapamida	Merck

Nos estudos voltamétricos iniciais, a IND foi preparada na concentração de 1,0 mmol L⁻¹, solubilizada em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ em (pH = 12). As soluções estoque de IND foram preparadas antes de cada experimento para evitar qualquer oxidação prévia da droga.

Para os estudos envolvendo FIA, foi escolhido como eletrólito de corrida o tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 12), e as amostras de IND para a construção da curva linear foram diluídas no mesmo carreador. A urina sintética foi preparada seguindo o trabalho de *Silva et al.* [46], constituída por: 0,58 g NaCl, 0,32 g KCl, 0,22 g CaCl₂.2H₂O, 0,45 g Na₂SO₄, 0,28 g KH₂PO₄, 0,20 g NH₄Cl e 5,0 g de ureia. Os sais foram transferidos para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água deionizada.

Para a caracterização voltamétrica do LTGr, foram utilizadas duas diferentes sondas eletroquímicas: ferrocianeto e dopamina. As soluções de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} foram preparadas em solução aquosa de KCl 0,10 mol L⁻¹, enquanto que dopamina 1,0 mmol L⁻¹ foi dissolvida em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 4,7). Com ambas as sondas foi verificado o bom desempenho do LTGr.

Para as otimizações iniciais do sistema FIA, optou-se por utilizar 1,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} preparado em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ com pH = 12. Este meio foi escolhido pelo fato de ser o mais favorável para a análise de IND.

Para estudar os mecanismos envolvidos nos processos de oxidação da IND, foi escolhido o dimetilsulfóxido como meio para a solubilização inicial do fármaco. Por fim, no estudo de mecanismo utilizando GCE, utilizou-se uma solução estoque de 0,05 mol L⁻¹ de IND preparada em Dimetilsulfóxido (DMSO). Adicionou-se 200 µL dessa solução em 10 mL de tampão fosfato para obter uma concentração final de 1,0 mmol L⁻¹ na célula eletroquímica.

4.2 Instrumentação

4.2.1 *Medidas Eletroquímicas*

Para os estudos eletroquímicos, foi utilizado um potenciostato-galvanostato µAUTOLAB tipo 3 III (EcoChemie, Holanda) e um arranjo convencional de três eletrodos. Como eletrodo de trabalho foram utilizados GCE ou LTGr, um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl (sat.) construído no próprio laboratório [47] e um contraeletrodo de platina. Estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram conduzidos com o potenciostato PGSTAT 128N com o módulo FRA2.

Antes dos experimentos, o GCE foi submetido a limpeza, realizada mediante polimento com alumina de granulometria de 1,0 µm, seguida por 3,0 minutos em banho ultrassônico.

4.2.2 *Análises em Fluxo*

Nos experimentos de FIA, foi explorada a detecção amperométrica, utilizando uma célula de fluxo construída em parte no próprio laboratório. O sistema constituído por depósito de eletrólito, responsável pela propulsão do líquido (frasco de polietileno de 1

L, cujo fundo foi removido). Na borda superior deste frasco, foi adaptada uma peça circular especialmente construída em uma impressora 3-D, que tem função de suportar um balão de 500 mL com eletrólito, posicionado invertido no depósito, como representado na **figura 12**. No fundo do frasco, no centro da tampa, foi feito um orifício, onde o tubo de polietileno foi adaptado.

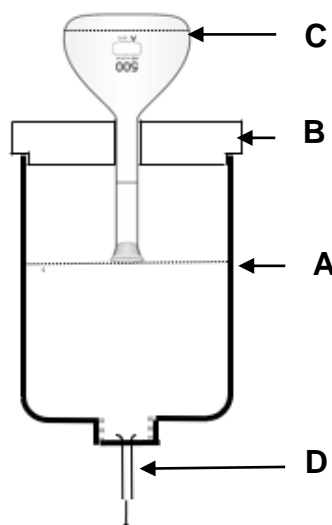


Figura 12: Sistema gravimétrico com controle de nível constituído de (A) um frasco de polietileno (1 L); (B) suporte de PLA impresso em impressora 3-D; (C) balão volumétrico de 500 mL em posição invertida para manter o nível da solução constante; (D) tubo de polietileno adaptado na tampa do frasco para conduzir o eletrólito.

O tubo de polietileno (~1,8 metros) conduz o eletrólito do depósito até uma válvula de injeção confeccionada em acrílico [48] com um loop de amostragem que determina o volume injetado. O fluxo do fluido é impulsionado pela gravidade, sendo o reservatório de eletrólito posicionado na altura adequada para definir o fluxo desejado [20,49]. O

injetor comutador (**Figura 3**) [48] foi usado para introduzir as soluções padrões e amostras, que foram aspiradas manualmente com o auxílio de uma seringa. A partir da válvula de injeção, a solução é conduzida até a célula de detecção eletroquímica, constituída de um eletrodo de carbono vítreo comercial embutido em um bloco Kel-F. Um segundo bloco de acrílico com tamanho idêntico foi construído, com perfurações (3,0 mm) nos quatro cantos do bloco, exatamente em frente aos furos no bloco de Kel-F conforme a **figura 13 A**. No centro do bloco, foi feito um furo cônico para encaixar o eletrodo de referência, alinhado o centro do eletrodo de trabalho. Dois furos foram feitos alinhados com a região central da célula, com ângulos opostos de 45°. O primeiro foi um canal (1,5 mm) onde foi fixado o tubo de entrada do fluxo. No lado oposto, foi perfurado o canal de escoamento com 2,5 mm e inserido um tubo de inox para atuar como eletrodo auxiliar. Uma fina lâmina de Teflon teve a função de espaçador e de vedante, (espessura de 0,15 mm) determinando o volume da célula [50,51]. A **Figura 13 A** apresenta esquematicamente a célula em fluxo construída.

Para utilizar os eletrodos LTGr, uma célula que possui semelhança com os princípios de walljet foi construída no laboratório. Para tal, um tubo de acrílico (diâmetro 30 mm) foi colado sobre uma base de acrílico. No centro desta base foi feito um furo com diâmetro adequado para fixar uma pipeta de Eppendorf (azul) de 1,0 mL. Uma pequena porção da ponta da pipeta foi cortada, para adaptar o tubo de polietileno para a entrada do fluxo de solução. No outro extremo, uma tampa com três furos foi confeccionada. No centro da tampa foi feito um furo com 0,80 mm, que favorece o posicionamento do grafite exatamente em frente do tubo de entrada do jato da solução. Os eletrodos de referência

e auxiliar foram posicionados nos furos laterais do grafite, como representado na **figura 13 B**.

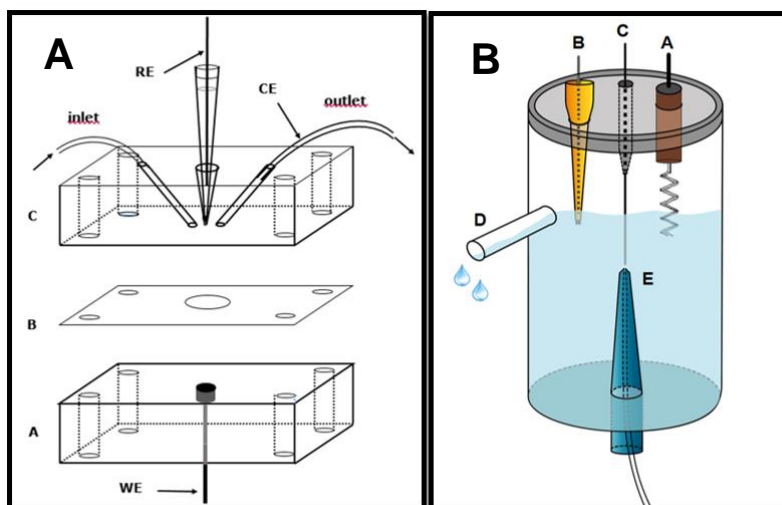


Figura 13: (A) Célula de fluxo constituída por: A- Bloco comercial Kel-F contendo eletrodo de GCE; B- Espaçador; C- Bloco de Plexiglass (construído em nosso laboratório) para completar a célula de fluxo. Um grupo de quatro furos foi feito no espaçador (B) e no bloco superior (C) Quatro parafusos (não mostrados) tem a função de unir todas as partes. As soluções entram na célula pela esquerda (entrada), passam na minúscula câmara definida pelo furo central feito no espaçador e são conduzidas para a saída. O eletrodo de referência é posicionado exatamente à frente do eletrodo de trabalho e um tubo inox inserido no canal de saída funcionando como contra eletrodo. (B) Célula de fluxo acoplado ao LTGr, A – eletrodo auxiliar, B – eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl_(sat.)), C - eletrodo de trabalho (LTGr), D – saída de fluxo e E – pipeta.

4.2.3 Medidas cromatográficas

Para poder comparar os resultados, foram feitas análises por HPLC, sendo seguidos os procedimentos descritos na literatura [49,50]. Para as medidas cromatográficas foi utilizado o HPLC Shimadzu LC- 2030, equipado com uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M), sílica RP18, diâmetro de partícula de 5,0 μm , 250 \times 4,6 mm. A detecção utilizada foi espectrofotometria UV-Vis. A análise foi feita utilizando fase móvel isocrática (60 % de acetonitrila + 40 % de solução aquosa). A porção aquosa foi constituída por 1,7 g de dihidrogenofosfato de potássio + 1,0 mL de trimetilamina em 2,0

L de água deionizada. O pH desta solução foi ajustado para 3,0 por adição de ácido fosfórico concentrado. Após o preparo, a solução foi filtrada com papel de filtro qualitativo 80 g m⁻², porosidade 3,0 microns.

4.2.4 Espectroscopia Raman

O mapeamento Raman de superfícies de grafite não tratado (NTGr) e tratado com laser (LTGr) foi obtido usando o espectrômetro Renishaw Invia Raman. Uma área de 11 × 11 µm foi digitalizada com um laser de comprimento de onda de 532 nm com potência de 100 % em conjunto com uma lente de 5,0 vezes de aumento; tempo de exposição e acúmulo foram 1,0 a 5,0 segundos, respectivamente.

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV, microscópio JEOL JSM-7401F) de NTGr e LTGr foram obtidas usando um feixe de elétrons com 5 kV de intensidade, uma distância de trabalho de 8,0 mm, um detector de elétrons secundário inferior, em diferentes ampliações (× 1.000 × 10.000 × 25.000).

5 PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo de amostras

O padrão de IND foi preparado em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ com pH = 12 para aplicação em FIA usando GCE ou LTGr.

Para demonstrar a viabilidade da quantificação da indapamida, foram selecionadas duas amostras reais: comprimidos de formulação farmacêutica contendo

indapamida (NatriliX) e urina sintética [48]. A dissolução direta dos comprimidos em meio aquoso não ocorre facilmente. A melhor abordagem encontrada foi pesar um grupo de comprimidos, em seguida, macerá-los completamente e pesar a quantidade apropriada de pó para transferir para um balão volumétrico, conforme ilustrado na (Figura 14) [48].



Figura 14: Esquema do preparado da solução de comprimido de indapamida.

A urina sintética foi preparada seguindo o trabalho de Silva *et al* [46]. Os sais foram transferidos para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água deionizada.

Para realizar a análise cromatográfica da indapamida, uma solução padrão foi preparada adicionando 10 mg do sal puro a um balão volumétrico de 200 mL. Em seguida, 120 mL de fase móvel foram adicionados ao frasco e a mistura foi sonicada por 10 minutos para dissolver o composto. Após a dissolução, o volume foi completado com a fase móvel. A solução foi filtrada e 5,0 mL do filtrado foram diluídos para 25 mL com fase móvel.

5.2 Determinação de IND

Inicialmente, realizou-se um estudo por voltametria cíclica para entender o comportamento eletroquímico da IND. Utilizou-se uma solução padrão de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do fármaco em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{pH} = 12$ como eletrólito de suporte. As condições experimentais foram as seguintes: eletrodo de trabalho (ET) = GCE ou LTGr, eletrodo auxiliar (EA) = platina, eletrodo de referência (RE) = $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat.})}$, potencial inicial (E_i) = $0,0 \text{ V}$, potencial final (E_f) = $0,80 \text{ V}$, velocidade de varredura (v) = 50 mV s^{-1} , degrau de potencial = $0,0024 \text{ V}$ e intervalo de tempo = $0,049 \text{ s}$. O estudo realizado na faixa de potencial de $E_i = -0,20 \text{ V}$ a $E_f = 0,20 \text{ V}$ foi bem-sucedido, uma vez que nesta faixa de potencial, apenas o primeiro processo voltamétrico ocorreu e não foram observados problemas de envenenamento. Nessas condições, foram feitos os estudos que serão apresentados mais à frente.

A quantificação de IND nas amostras farmacêuticas e na urina sintética foi realizada utilizando o sistema FIA proposto, através da construção de curvas analíticas com diferentes soluções padrões. Cada solução (amostra e padrões) foi injetada pelo menos três vezes, e os resultados foram expressos como a média do sinal obtido.

O limite de detecção (LOD) foi obtido experimentalmente, injetando-se diferentes concentrações de IND na faixa linear de 100 nmol L^{-1} a 5000 nmol L^{-1} . O LOD escolhido foi o sinal que apresentou uma intensidade 3,0 vezes maior que a linha de base.

5.3 Tratamento a laser de eletrodos de grafite (LTGr) de lapiseiras

Os eletrodos de disco de grafite foram preparados usando minas de grafite cilíndricas de dureza H com diâmetro de 0,7 mm. Tais minas foram cobertas (em cerca de 70% de sua extensão) com tinta acrílica. A ponta recoberta da minas foi lixada e então polida em papel ofício até se obter uma superfície circular lisa e brilhante, originando o eletrodo de disco de grafite. Para possibilitar o tratamento a laser do eletrodo os finos cilindros de grafite foram espetados verticalmente em massa de modelar colocada na base da cortadora a laser. A distância entre a extremidade do grafite e a lente por onde sai o fino feixe de laser foi de 10 mm. A varredura por laser cobriu uma área de $4,0 \times 4,0$ mm usando 50 % da potência máxima e taxa de varredura de $1,0 \text{ mm s}^{-1}$. Nos experimentos, apenas a área da base de uma das extremidades do cilindro de grafite entrava em contato com a solução eletrolítica, visto que a área lateral laterais estavam isoladas pela tinta acrílica [45].

5.3.1 Investigação eletroquímica da superfície do eletrodo (LTGr)

Os voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite não tratados (NTGr) e tratados (LTGr) foram realizados em de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em solução aquosa de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e de dopamina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão de acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . Estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) empregando eletrodos de grafite não tratados (NTGr) e tratados (LTGr) foram realizados no potencial de circuito aberto usando Ag/AgCl/KCl_(sat.) como eletrodo de referência em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $4,0 \text{ mmol}$

L⁻¹ preparado em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹ aplicando potencial alternado com amplitude de 10 mV e operando na faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz.

5.4 Proposta de mecanismo de oxidação da IND

Visando entender os mecanismos envolvidos no processo de oxidação da IND, voltamogramas cíclicos foram realizados no intervalo de (- 0,40 V a 0,80 V), com velocidades de varredura variando de 0,0020 a 1,0 V s⁻¹. Voltamogramas de onda quadrada (SWV) foram obtidos no intervalo de 0,0 V a 0,80 V. Os parâmetros experimentais foram: degrau de potencial de 2,0 mV, amplitude de pulso de 20 mV e frequência de 50 Hz, resultando em uma velocidade de varredura de 0,10 V s⁻¹. Um estudo de efeito de pH se estendeu de 2,0 a 12 para melhor avaliar a dependência do meio na transferência de carga. Destaque-se que após cada VC a superfície do eletrodo de GCE precisava ser polida novamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Parte I – Detecção amperométrica de indapamida em GCE

Essa parte desta dissertação tem como foco a discussão dos resultados da determinação da IND por FIA amperométrica em GCE. Este estudo deu origem a artigo publicado na revista “Electroanalysis” [50].

6.1.1 Comportamento eletroquímico da IND

No estudo do comportamento eletroquímico da IND por VC, foram avaliados diversos dados para compreender seu processo de oxidação. A faixa de potencial adequada foi determinada, assim como a corrente de pico em função da velocidade de varredura. Também foram analisados a presença de pares redox, a reversibilidade dos processos e a ocorrência de processos adsorptivos.

A **Figura 15** apresenta os resultados dos CVs em solução de IND registrados em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 12$) a uma velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , dentro da janela de potencial de 0,0 a 0,8 V. Foram observados três processos de oxidação (**Figura 15 A**), identificados como processo I ($E_{\text{pa},1} \sim 0,15 \text{ V}$), processo II ($E_{\text{pa},2} \sim 0,40 \text{ V}$) e processo III ($E_{\text{pa},3} \sim 0,60 \text{ V}$) em relação ao $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat.})}$ e nenhum processo de redução.

Posteriormente, foi testada a repetibilidade do sinal (corrente de pico) realizando ciclagens na mesma faixa de potencial (**Figura 15 B**). No segundo ciclo, observou-se um intenso bloqueio da superfície do eletrodo, possivelmente produto da adsorção do analito/produtos da reação na superfície do eletrodo. No terceiro ciclo foi o efeito de "envenenamento" da sua superfície se intensificou.

Esses resultados são uma indicação para o fato de a literatura apresentar poucos estudos voltamétricos da indapamida.

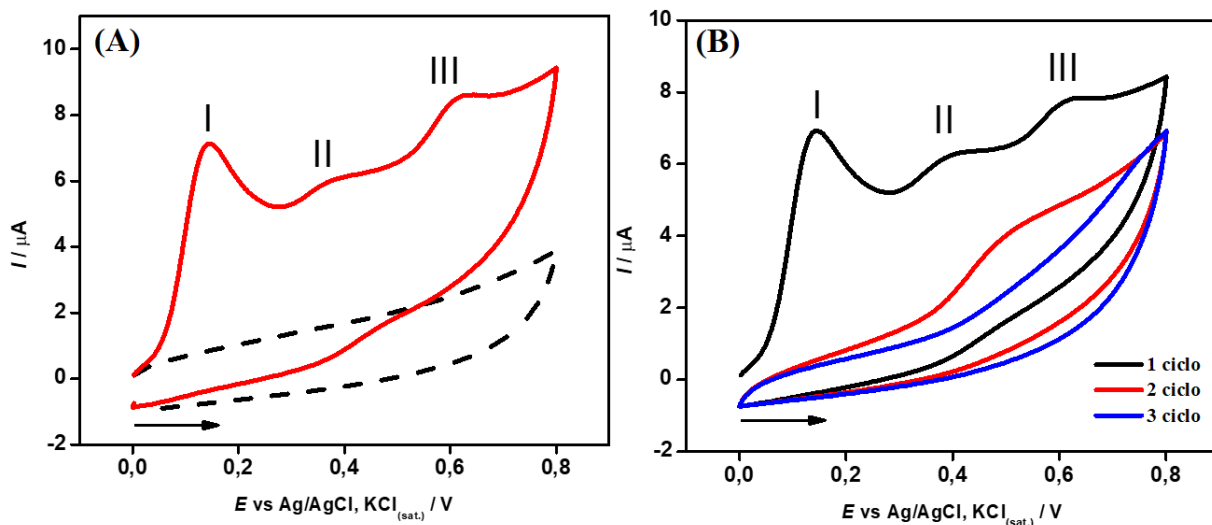


Figura 15: (A) Voltamogramas cíclicos de: tampão fosfato, (pH = 12), $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (tracejado); solução de IND $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato, (pH 12), $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho). (B) Três ciclos em sequência na mesma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de IND em tampão fosfato, pH = 12, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.), $E_i=0,0 \text{ V}$, $E_f=0,80 \text{ V}$, potencial de parada = $0,0 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, step potencial = $0,0024 \text{ V}$ e intervalo de tempo = $0,049 \text{ s}$.

Com estes experimentos ficou evidente que o bloqueio ocorre devido à adsorção dos produtos gerados na oxidação. Passou-se então a buscar uma condição favorável de trabalho [52,53]. Após diversas tentativas, descobriu-se que restringindo a janela de potencial entre $E_i = -0,20 \text{ V}$ a $E_f = 0,23 \text{ V}$, (onde apenas o primeiro processo ocorre), o envenenamento da superfície do eletrodo não ocorre. Na **Figura 16 A** é apresentado o CV em meio de tampão fosfato, pH 12, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (tracejado) e o CV registrado após a adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de IND (vermelho). Na **Figura 16 B** é apresentado o resultado de repetidos ciclos até o mesmo E_f de $0,23 \text{ V}$. Tais resultados evidenciam que, contornados os problemas de envenenamento mediante limitação do potencial, pode-se obter excelente repetibilidade do voltamograma, tornando possível explorar métodos voltamétricos e amperométricos para quantificar IND.

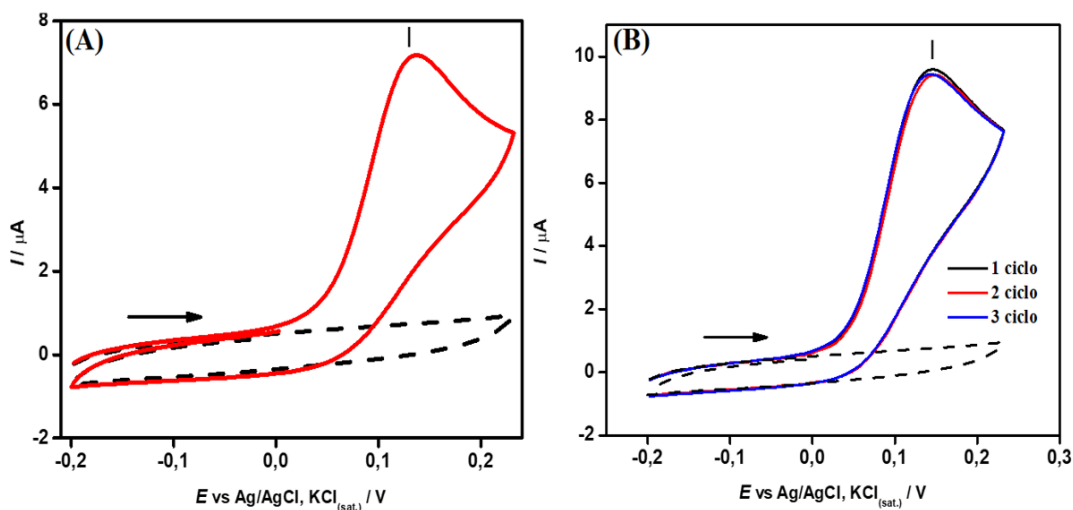


Figura 16: (A) Voltamogramas cíclicos registrados em tampão fosfato (pH = 12) 0,10 mol L⁻¹ (tracejado) e após a adição 1 mmol L⁻¹ de IND em tampão fosfato (pH=12) 0,1 mol L⁻¹ (vermelho) (B) Três ciclos repetidos na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de IND. Condições experimentais: igual a descrita (Figura 15). A solução foi agitada após cada voltamograma.

O comportamento eletroquímico da IND foi estudado em diferentes velocidades de varredura, variando de 5,0 a 100 mV s⁻¹, na faixa de potencial do processo I, com a finalidade de avaliar se o processo envolvido era adsorativo ou difusivo. Os resultados obtidos estão ilustrados na **Figura 17**. Nos experimentos onde foi variada a velocidade de varredura, foi constatado que os potenciais de pico anódico, E_{pa,1}, não sofreram alterações (**Figura 17 A**). A **Figura 17 B** mostra a variação da corrente de pico de oxidação em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Tais resultados mostram que as correntes de pico apresentaram uma relação linear proporcional, indicando que os processos são controlados por difusão. A relação linear pode ser expressa como $[I(\mu A)] = 0,530 + 16,5 [\text{indapamida} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, R²=0,998.

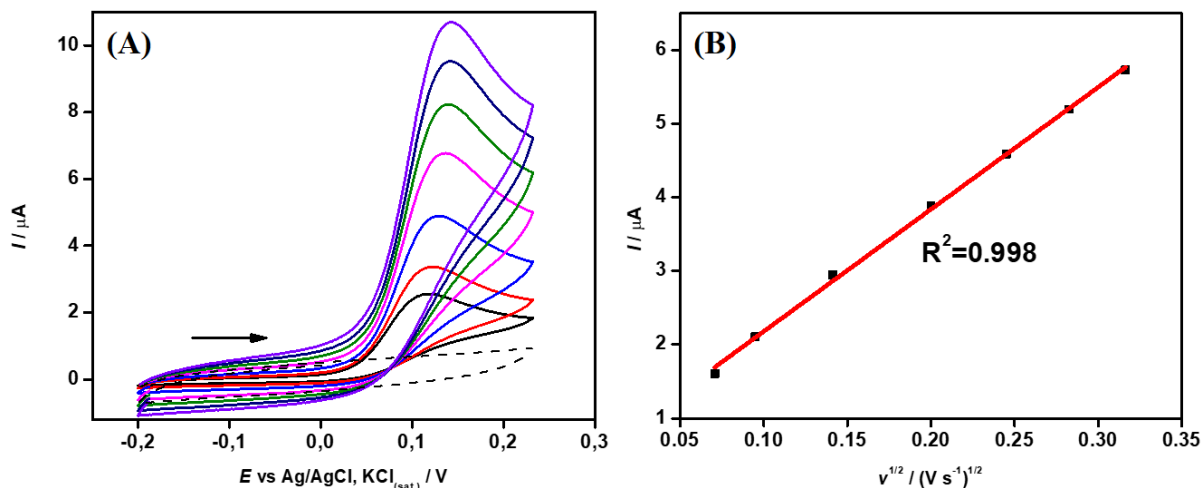


Figura 17: (A) VC em diferentes velocidades de varredura: (--) branco ; (-) 5; (-) 9; (-) 20; (-) 40; (-) 60; (-) 80 e (-) 100 mV s^{-1} e (B) Relação linear de I_p vs $v^{1/2}$. Sem limpeza do eletrodo entre as medidas. Voltamogramas registrados em GCE, em solução de IND $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=12). Condições experimentais similares a figura 15.

De acordo com equação de Randles-Sevcik, sabe-se que realizando o duplo log dos dados apresentados na **figura 17 B**, pode-se inferir se o processo é predominantemente difusivo ou se é adsortivo. De acordo com os autores: [54].

- (1) $\text{Log } I_p$ vs $\text{log } v$ (relação linear, com inclinação de reta $\sim 0,50$, processo difusivo)
- (2) $\text{Log } I_p$ vs $\text{log } v$ (relação linear, com inclinação de reta $\sim 1,0$ processo adsortivo).

Pela avaliação do item (2), uma inclinação típica de processo difusivo (**Figura 18**), ou seja, $\sim 0,50$ confirmando a conclusão do critério (1).

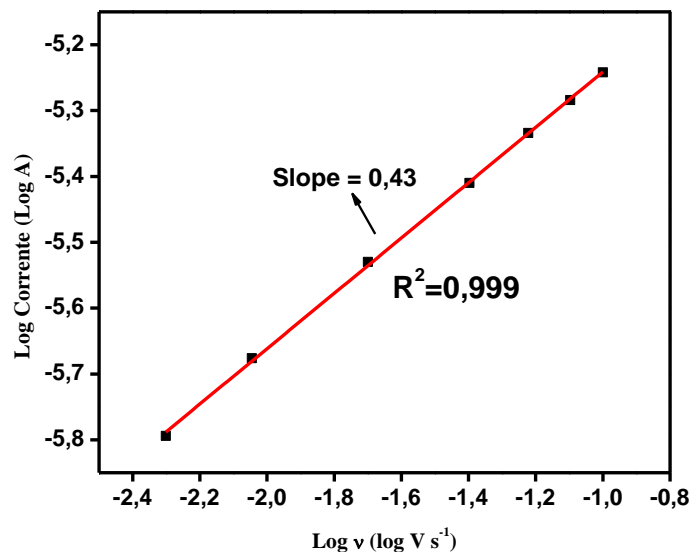


Figura 18: Variação do logaritmo das correntes de pico ($I_{pa,1}$), em função do logaritmo da velocidade de varredura. Dados obtidos a partir dos voltamogramas registrados com GCE, em solução de IND $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=12$). $[I(\mu\text{A})] = -4,82 + 0,420 [\text{indapamida} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, $R^2=0,999$. Condições experimentais: igual (Figura 20).

A **Figura 19 A** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em GCE para concentrações crescentes de IND ($1,0$ a $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=12$). É importante destacar que, durante todos os experimentos realizados para construir a curva de calibração, não foi necessário renovar a superfície do eletrodo. Essas condições demonstram que a superfície do eletrodo não sofre qualquer efeito de envenenamento decorrente dos produtos do 1° processo de oxidação da IND.

Na **Figura 19 B**, é apresentada a variação da corrente de pico anódica em função da concentração de IND. Foi observada uma relação linear para o intervalo de concentrações avaliado, que pode ser descrita pela seguinte equação: $[I(\mu\text{A})] = 0,877 + 3,39 [\text{indapamida} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, com um coeficiente de correlação igual a $0,996$.

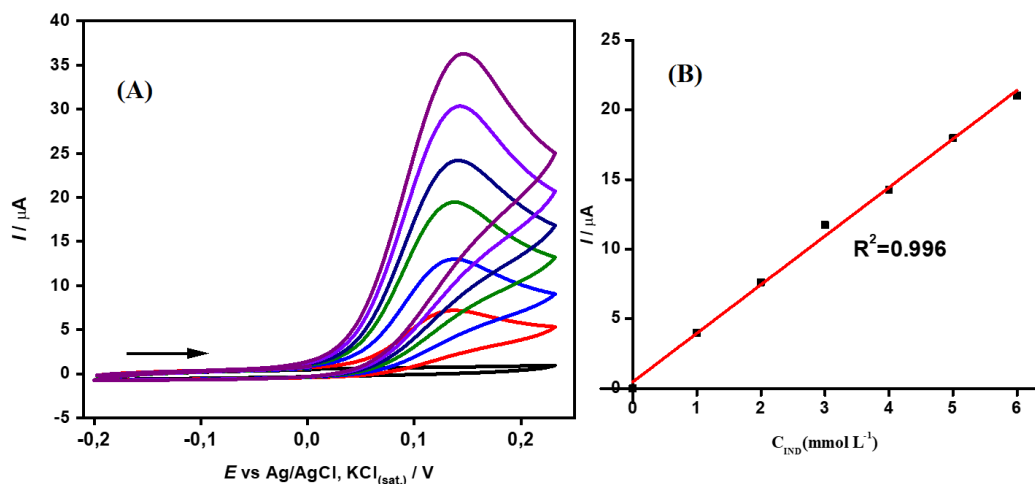


Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo de 0 a 6 mmol L^{-1} de IND. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.), $E_i = -0,2 \text{ V}$, $E_f = 0,2 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, step potencial = $0,0024 \text{ V}$ e intervalo de tempo = $0,049 \text{ s}$. **(A)** diferentes concentrações: (--) eletrólito de suporte apenas; (-) 1; (-) 2; (-) 3; (-) 4; (-) 5 e (-) 6 mmol L^{-1} de IND **(B)** Relação linear de I_p vs concentração de IND.

6.1.2 Aplicação analítica: FIA

6.1.2.1 Otimização dos parâmetros do sistema de fluxo

Os parâmetros essenciais para otimizar as análises em fluxo foram o potencial, a vazão e o volume de solução a ser injetado. O potencial de trabalho ideal foi selecionado com base em um estudo hidrodinâmico abrangendo potenciais entre $0,14 \text{ V}$ e $0,24 \text{ V}$ (incrementos de potencial de $0,01 \text{ V}$). Para os experimentos hidrodinâmicos realizados entre $0,14 \text{ V}$ e $0,16 \text{ V}$, a corrente registrada foi praticamente zero. Em $0,17 \text{ V}$, já houve aparecimento de alguma corrente e em $0,18 \text{ V}$, a corrente máxima foi quase atingida. Experimentos realizados com potenciais entre $0,19 \text{ V}$ e $0,24 \text{ V}$ resultaram em sinais muito semelhantes. Com base nesses resultados, o potencial de $0,20 \text{ V}$ foi adotado para os experimentos subsequentes.

A vazão foi otimizada no intervalo de 1,0 a 6,0 mL min⁻¹. No intervalo de 1,0 e 4,0 mL min⁻¹, o sinal aumentou com a vazão [53]. Para vazões mais altas, observou-se um pequeno declínio na corrente de pico e, mais importante, uma diminuição significativa na repetibilidade. Com base nesses resultados, a vazão de 4,0 mL min⁻¹ foi selecionada para as medições subsequentes.

Para otimizar o volume injetado, foi feito um estudo utilizando alças de amostra com volumes variando de 25 a 200 µL. Os volumes de 25 a 125 µL resultaram em sinais crescentes, porém, para volumes maiores (150, 175 e 200 µL), o sinal ainda aumentou, porém de forma bastante moderada. Devido ao considerável aumento no tempo de lavagem nessas últimas três alças de amostragem, o volume de 125 µL foi escolhido como o mais adequado para este estudo.

6.1.2.2 Demonstração da seleção adequada do potencial de trabalho

Conforme mencionado anteriormente, a definição do potencial de trabalho foi crucial para o sucesso do presente estudo. Vários experimentos foram conduzidos até descobrir uma condição em que fosse possível trabalhar sem o envenenamento do eletrodo, qual seja, restringir a faixa de potencial, de -0,20 V a 0,20 V, onde ocorre apenas o processo I na superfície do eletrodo (**Figura 20 A**).

Para ilustrar esse aspecto também na detecção amperométrica em fluxo contínuo, realizamos experimentos de análise por injeção em fluxo em dois potenciais: +0,20 V e +0,50 V, e observamos diferenças significativas. Os experimentos realizados a 0,20 V aparentemente envolveram apenas a primeira etapa de oxidação. No entanto, quando o

potencial foi aumentado para 0,50 V, região da segunda onda representada na **Figura 20 B** os problemas de envenenamento do eletrodo se tornaram evidentes.

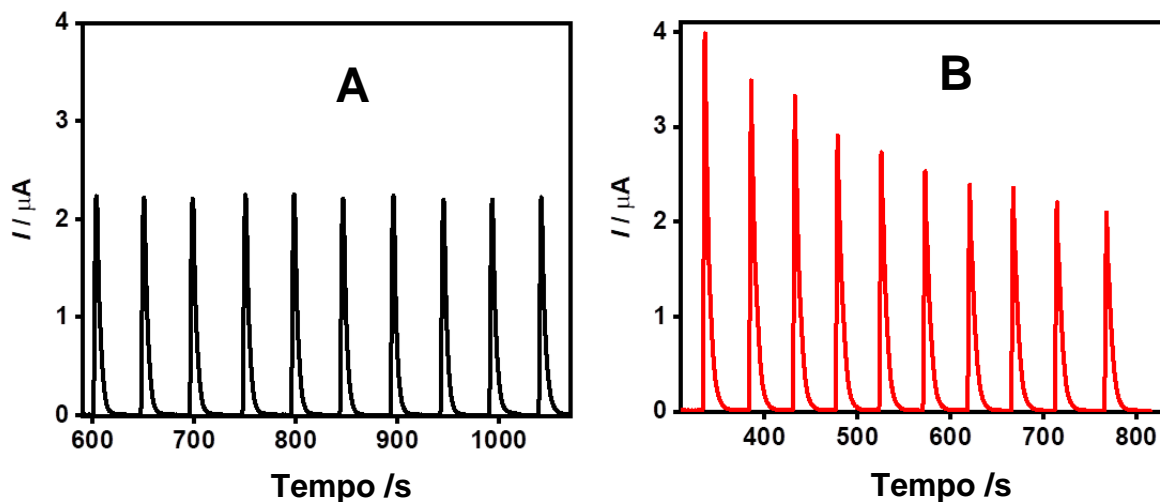


Figura 20: Experimentos de FIA com potencial fixo em: 0,20 V (A) e 0,50 V (B) para injeções de IND a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o sistema FIA de linha única com vazão $4,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume injetado de $125 \mu\text{L}$. Condições experimentais: sistema linha única, carreador = tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 12), detecção amperométrica: ET = GCE; EA = platina, RE = Ag/AgCl/KCl_(sat.).

6.1.2.3 Quantificação de IND em fármaco e urina sintética

Para a quantificação de indapamida em formulações farmacêuticas, optou-se pelo método de adição padrão. Esse procedimento permite minimizar o efeito de interferências causadas por outras espécies presentes na composição do medicamento farmacêutico, pressupondo que nenhuma seja eletroativa no potencial de 0,2 V. Um grupo de comprimidos foi pesado, pulverizado e 205 mg (que contem nominalmente 1,5 mg de indapamida) foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL e diluído em tampão fosfato pH = 12 ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Com base na informação do rótulo da formulação,

o teor de IND esperado dessa solução era de $16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Uma solução de indapamida ($5,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada imediatamente antes das medições. Adições de 2,00 a $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ dessa solução foram usadas para construir a curva analítica mostrada na **Figura 21**. A resposta linear pode ser descrita pela seguinte equação: $(I/\mu\text{A}) = 0,159 + 0,00988 [\text{Indapamida} (\mu\text{mol L}^{-1})]$, com um coeficiente de correlação de 0,995.

Para determinar o limite de detecção experimental, soluções contendo de $1,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram injetadas e o sinal transiente registrado. Na concentração de $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de indapamida, o sinal amperométrico é pelo menos 3 vezes maior que o ruído, e a recuperação da indapamida foi de 98,0%.

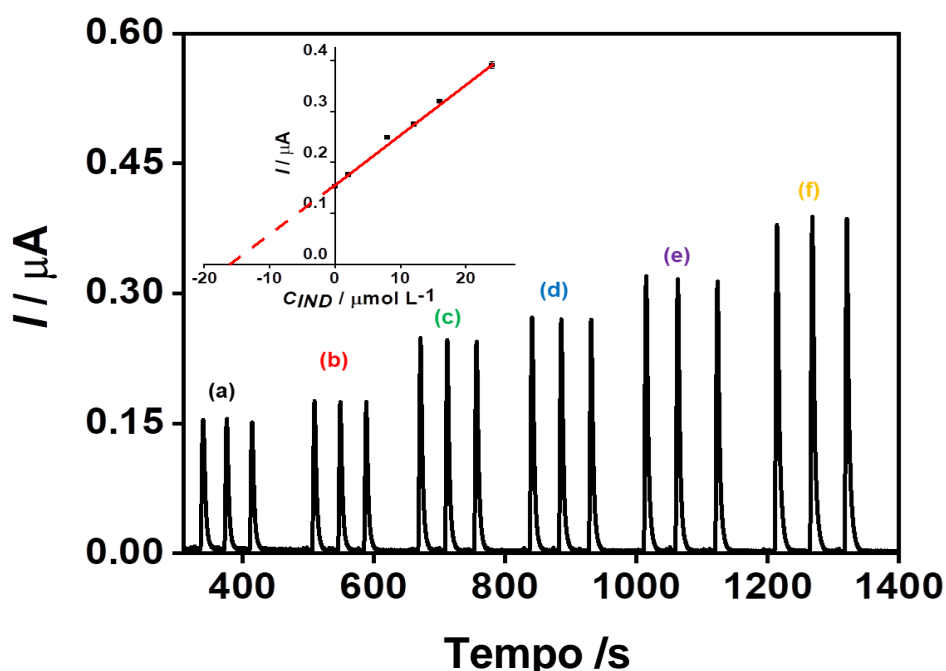


Figura 21: Registros de uma série de injeções de uma solução contendo (a) sinais transientes obtidos em triplicata para: amostra farmacêutica; (b) amostras farmacêuticas mais $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (c) amostras farmacêuticas acrescidas de $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (d) amostras farmacêuticas mais $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (e) amostras farmacêuticas acrescidas de $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida e (f) amostras farmacêuticas acrescidas de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida. Condições experimentais: Potencial = $0,2 \text{ V}$; Vazão = $4,0 \text{ mL min}^{-1}$; volume injetado: $125 \mu\text{L}$.

A viabilidade de quantificar a indapamida em amostras de urina sintética foi avaliada utilizando o mesmo sistema de fluxo. Foi preparada uma solução de urina sintética contendo $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida para ser testada. Em seguida, foram adicionados volumes de $5,00 \text{ mL}$ desta urina (enriquecida com IND) a seis balões volumétricos de $10,0 \text{ mL}$. Finalmente, para esses frascos foram transferidos volumes de indapamida que resultaram nas seguintes concentrações: 0 ; $5,00$; $10,0$; $20,0$; $25,0$ e $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados da análise destas soluções estão registrados na **Figura 22**.

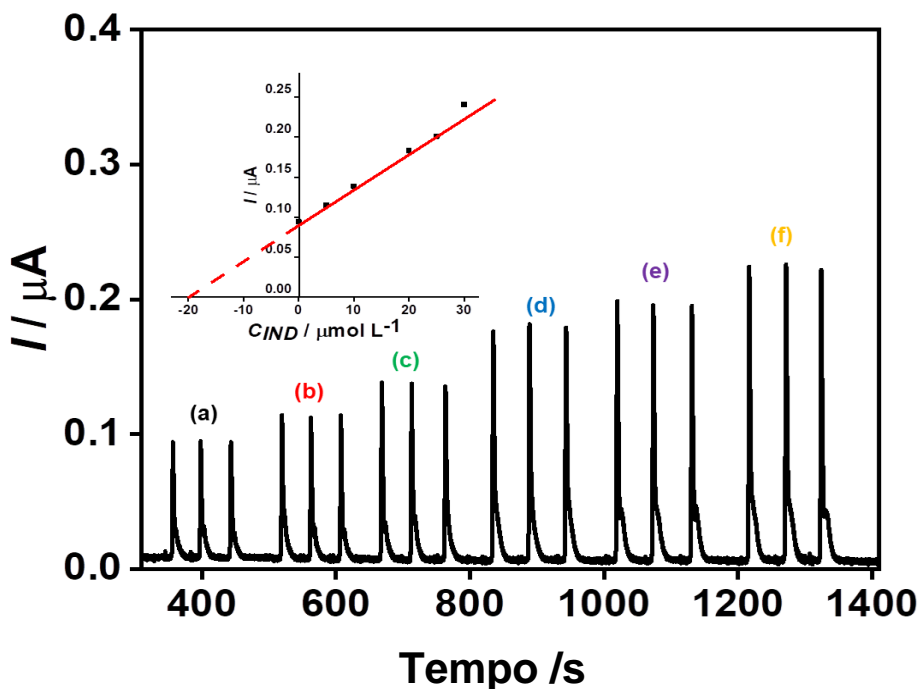


Figura 22: Análise de indapamida em amostra de urina sintética. (a) Amostra sintética contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (b) o mesmo que (a) mais $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (c) o mesmo que (a) mais $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (d) o mesmo que (a) mais $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida; (e) o mesmo que (a) mais $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida e (f) o mesmo que (a) mais $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de indapamida. Condições experimentais idênticas às da Figura 24.

Conforme demonstrado na **Figura 22**, foi obtida uma boa linearidade. A resposta linear obtida na série apresentada acima é descrita pela equação: $[I(\mu\text{A})] = 0,0918 +$

0,00469 [indapamida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)], com um coeficiente de correlação de 0,991. O limite de detecção experimental (LOD) foi de $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e foi calculada uma recuperação de indapamida de 97,8%.

6.1.2.4 Determinação da IND por HPLC

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizado para quantificar a indapamida, a fim de comparar os resultados com o método proposto neste trabalho. Foi preparada uma solução estoque de indapamida com concentração de $5,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, que foi diluída na mesma solução carreadora para gerar padrões na faixa de 5,00 a $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A amostra foi preparada dissolvendo um comprimido (0,211 g) em 250 mL de fase móvel, resultando em uma concentração nominal de $17,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. A análise dos padrões gerou a equação: ($[\text{área}] = 269 + 514 [\text{Indamida}]$), onde [Indamida] é a concentração do analito em $\mu\text{mol L}^{-1}$, $R^2 = 0,996$. O limite de detecção (LOD) foi estimado em $4,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (3,30 SDw/yb). A análise do conteúdo do comprimido resultou em uma recuperação de 103% [55], como ilustrado na **Figura 23**.

Os resultados obtidos pelas duas técnicas concordaram de forma consistente entre si e com os valores indicados na bula da indapamida. Os dados obtidos pelos dois métodos foram bastante similares [56,57].

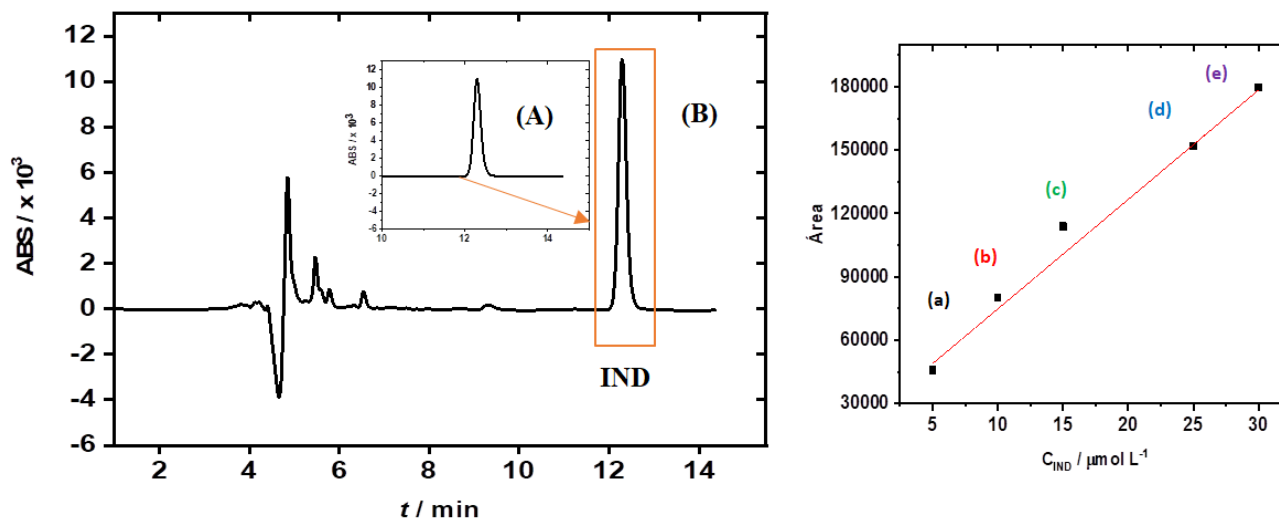


Figura 23: Cromatograma típico: (A) Solução padrão de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IND; (B) curva de calibração (5,00; 10,0; 15,0; 25,0 e 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de IND. Soluções foram dissolvidas em fase móvel isocrática (60 % de acetonitrila + 40 % de solução aquosa).

6.1.2.5 Estudos de interferentes

Para avaliar a interferência de cada componente presente na urina sintética no sinal da indapamida, foi preparada uma solução contendo uma concentração fixa do fármaco + tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 12) e comparada com soluções contendo exatamente a mesma quantidade de indapamida, tampão fosfato e a concentração de cada espécie, semelhante ao seu conteúdo na urina sintética. As espécies testadas foram: cloretos (sódio, potássio e cálcio), amônio, sulfato, uréia e fosfato. A **Tabela 2** apresenta os resultados, nos quais o sinal medido na presença dos componentes sintéticos da urina diminui em todos os casos. É importante lembrar que, com a adição de sais, a viscosidade do meio aumenta, o que é um fator importante que causa alguma atenuação da corrente de pico amperométrica porque diminui a difusão da indapamida para superfície do eletrodo e também reduz a vazão do sistema FIA, vez que propellido

diferença de pressão. A corrente capacitiva também contribui para a diminuição do sinal, pois os sais estão em concentração relevante em relação à indapamida.

Tabela 2: Avaliação do efeito da adição de possíveis interferentes à urina sintética sobre o sinal da indapamida ($16 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Interferente (INT)	Concentração (mol L^{-1})	Razão (IND/INT)	Varição sinal da corrente (%)
NaCl	0,050	1:3125	$-3,85 \pm 0,03$
KCl	0,021	1:1313	$-1,92 \pm 0,04$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0075	1:469	$-7,21 \pm 0,02$
Na_2SO_4	0,016	1:1000	$-1,92 \pm 0,04$
NH_4Cl	0,019	1:1188	$-8,85 \pm 0,01$
Urea	0,42	1:26250	$-11,25 \pm 0,01$
KH_2PO_4	0,010	1:625	$-3,85 \pm 0,02$

Considerando o caso de maior diferença, a quantidade de uréia foi 26250 vezes maior que a concentração de indapamida. Em termos de concentração, isso equivale a $0,42 \text{ mol L}^{-1}$, acima da concentração de uréia reportada em biofluidos, que vai de $0,0015$ a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Isso significa que, enquanto o carreador possui uma concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a solução injetada contém a $0,52 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,42 \text{ mol L}^{-1}$ de ureia + $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato). Essa variação certamente afeta uma série de parâmetros, incluindo a corrente capacitiva resultante, bem como a vazão e a difusão do analito até o eletrodo [58].

Estudos que envolvem a quantificação de indapamida por métodos voltamétricos são relativamente raros e o motivo é bem claro: os processos de envenenamento de eletrodos sólidos pela indapamida são extremos (como mostrado na **Figura 15**). Os

estudos eletroanalíticos existentes para a quantificação de indapamida foram coletados e estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Estudos voltamétricos envolvendo a quantificação de IND

Técnica	Eletrodo	LOD mol L⁻¹	Faixa linear mol L⁻¹	Ref
SWV	BDDE	$5,6 \times 10^{-8}$	$9,9 \times 10^{-8} - 4,3 \times 10^{-6}$	[59]
SWAD	HMDE	$2,9 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^{-12} - 2,0 \times 10^{-7}$	[60]
ACSV	HMDE	$5,0 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-7}$	[61]
AS	CPE	$5,0 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-7}$	[62]
DPV	CPE	$1,0 \times 10^{-7}$	$6,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	[17]
FIA-amperometric	GCE	$3,0 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-5}$	Este trabalho

ABREVIATURAS – **SWV**: Voltametria de onda quadrada; **SWAD**: Voltametria de onda quadrada por adsorção; **ACSV**: Voltametria de *stripping* adsortiva catódica; **AS**: *stripping* adsortiva; **DPV**: Voltametria de pulso diferencial; **FIA-amperométrico**: Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica; **BDDE**: Eletrodo de diamante dopado com boro; **HMDE**: Eletrodo de mercúrio de gota pendente; **CPE**: Eletrodo de pasta de carbono; **GCE**: Eletrodo de carbono vítreo.

Os dados apresentados na **Tabela 3** demonstram que os eletrodos de mercúrio são altamente eficientes, porém estão sendo banidos dos laboratórios de pesquisa [60,61]. A utilização de eletrodos de diamante dopados com boro [59] também apresenta resultados promissores devido às suas características, como uma ampla faixa de potencial de trabalho, baixa corrente de fundo, estabilidade prolongada, alta estabilidade

química e biocompatibilidade. Estudos utilizando eletrodos de pasta de carbono foram realizados usando diferentes técnicas. A voltametria de adsorção (ASV) [62] resulta em um limite inferior de detecção, apesar da região linear geralmente ser mais estreita. Utilizando DPV [17], o limite de detecção não foi tão favorável quanto o obtido pelo ASV, mas a região linear foi mais ampla em comparação ao estudo anterior. No nosso estudo, a análise por injeção em fluxo foi aplicada pela primeira vez para a quantificação de indapamida usando um eletrodo de carbono vítreo.

Os resultados obtidos demonstraram que o método proposto é altamente favorável para aplicações de controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Além disso, o limite de detecção (determinado experimentalmente) está abaixo do limite estabelecido pelo Comitê Olímpico Internacional [3], que corresponde a $6,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de IND. A velocidade e a precisão das análises são aspectos que devem ser destacados neste método.

6.1.3 Considerações finais da parte I

O método desenvolvido neste trabalho possibilitou a quantificação da indapamida por FIA com detecção amperométrica usando GCE. A seleção da faixa de potencial adequada foi um aspecto crucial para permitir a quantificação precisa do analito sem a ocorrência de envenenamento do eletrodo. Por meio de estudos iniciais utilizando voltametria cíclica, foi possível determinar a faixa de potencial ideal (entre -0,20 e +0,24 V) como região de trabalho para voltametria e + 0,20 para amperometria em fluxo.

Para a quantificação de indapamida em amostras farmacêuticas, optou-se pela técnica de análise por injeção em fluxo devido á vantagens como a possibilidade de

realizar análises rápidas e precisas. Os resultados obtidos foram consistentes com os valores indicados na bula do fármaco. Em adição, a mesma droga foi analisada por cromatografia, e os resultados obtidos por ambos os métodos foram bastante similares.

FIA também foi utilizada para a análise de urina sintética. Neste caso foi preparada uma amostra contendo uma concentração conhecida de IND. Sobre esta solução foram feitas adições de padrão. O valor recuperado na análise apresentou excelente concordância com o valor introduzido na amostra de urina sintética.

Em conclusão, o novo procedimento proposto neste estudo foi aplicado com sucesso para análise de indapamida, permitindo sua quantificação de forma precisa e confiável.

6.2 Parte II - Eletrodos de grafite de lapiseiras tratados a laser (LTGr) para quantificação amperométrica de indapamida

O tratamento de superfícies de eletrodos a laser é uma técnica conveniente, rápida, de uma etapa e ecológica usada para produzir superfícies mais condutoras em carbono, impregnado ou não com polímeros, por meio da pirólise local. Neste estudo, as minas de grafite de lápis foram tratadas com laser (LTGr) para melhorar o desempenho eletroquímico e produzir sensores de baixo custo e sensíveis. A melhoria foi avaliada por meio de técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizando $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e dopamina como sondas redox.

Os resultados eletroquímicos demonstraram que a superfície tratada apresenta uma significativa melhora na transferência de elétrons e uma menor resistência à transferência de carga. Os parâmetros da cortadora a laser foram otimizados para

alcançar um desempenho eletroquímico ótimo da mina de grafite, levando em consideração as características de grafite, potência do laser, taxa de varredura e distância focal do laser. O material resultante foi devidamente caracterizado por meio de espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelando uma superfície irregular composta por partículas cristalinas de grafite.

Além disso, como prova de conceito, o sensor desenvolvido foi aplicado na detecção de indapamida (IND) em urina sintética por FIA. Os resultados deste estudo deverão ser submetidos à publicação a seguir.

6.2.1 Fabricação do eletrodo (LTGr)

O tratamento a laser é uma técnica conveniente e rápida para produzir material com excelentes características para aplicações eletroanalíticas. Nos grafites estudados, a aplicação de laser atua na queima de material na superfície do grafite, dentre os quais polímeros ricos em carbono [42,63], ceras ou ainda na volatilização de materiais não condutores [64] utilizados na composição dos grafites para alcançar as características desejadas (dureza, coloração). Vários fatores foram otimizados para garantir um bom desempenho dos eletrodos de grafite de lapiseiras, incluindo o grau de dureza das minas de grafite e os parâmetros da cortadora a laser, como potência, taxa de varredura e distância focal.

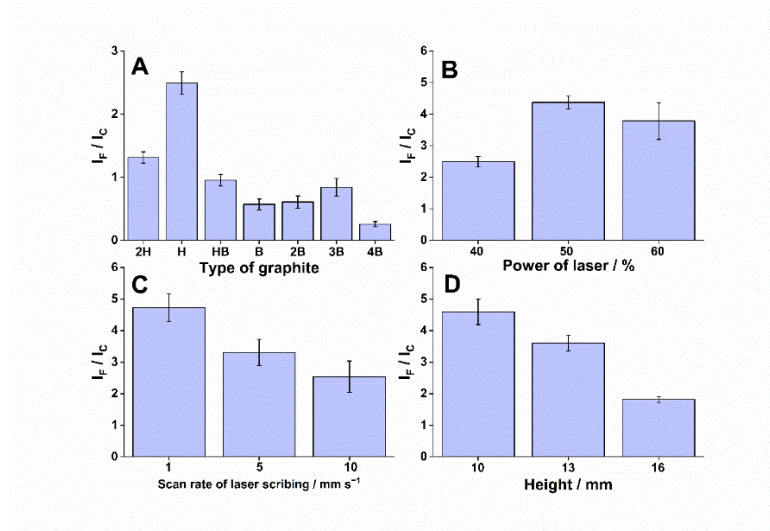


Figura 24: Escolha da dureza da mina de grafite e otimização dos parâmetros do tratamento com laser com base na razão entre corrente faradaica (I_F) e capacitiva (I_C). (A) tipo de grafite, (B) potência do laser, (C) taxa de varredura e (D) distância focal do feixe de laser (medida entre a lente e o grafite).

Vários tipos de grafite estão disponíveis no mercado, diferenciando-se em termos de maciez ou coloração (B de “black”) devido à maior quantidade de grafite em sua composição em relação à cera e argila, enquanto outros são mais duros (H de “hard”) ou mais claros devido à quantidade relativamente alta de cera e argila possuem [65]. Neste trabalho, o efeito do tratamento a laser foi avaliado em diferentes tipos de grafite, incluindo 4B, 3B, 2B, B, HB, H e 2H, como ilustrado na **Figura 24 A**. Quanto maior o grau do grafite do tipo B, mais intensa foi a corrente faradaica (I_F) da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, por possível combinação de fatores como maior teor de grafite na mina, menor compactação e maior porosidade, resultando em uma área de superfície eletroquímica maior. No entanto, a corrente capacitiva (I_C), que é função da área, também aumenta, o que é indesejável especialmente quando se utiliza técnicas com varredura de potencial ou amperometria pulsada. Daí a se procurar uma condição de compromisso expressa pela melhor razão I_F/I_C numa dada condição experimental fixa. Normalmente, uma maior

proporção de grafite produz menor resistência eletrônica [65], por isso grafites com concentrações relativamente altas são usados em eletroquímica [66]. No entanto, devido ao tratamento a laser, eles apresentaram uma relação (I_f/I_c) menos favorável que as minas H. Além disso, devido à sua maciez, estas minas rachavam mais facilmente com o tratamento a laser, comprometendo a repetibilidade. Dessa forma, o melhor compromisso entre corrente faradaica e capacitiva, bem como resiliência ao tratamento térmico a laser, foi obtido com grafite tipo H, seguido pelo H2 e pelo HB.

Para o tratamento a laser, os parâmetros da cortadora a laser foram otimizados visando a fabricação dos eletrodos. A potência do laser influencia diretamente na remoção de impurezas que prejudicam o desempenho eletroquímico. Potência inferior a 40 % não trataram adequadamente as superfícies do grafite, mantendo-as semelhantes às superfícies de grafite não tratadas. Por outro lado, potência mais altas resultaram em um tratamento adequado, mas acima de 50 % causaram rachaduras nas minas. Portanto, optou-se por utilizar 50 % como a potência mais favorável para o tratamento das minas (**Figura 24 B**).

Outro parâmetro otimizado foi a taxa de varredura da cortadora a laser (**Figura 24 C**). Quanto mais lento o ritmo, maior o tempo de exposição do substrato ao tratamento a laser. Assim, definiu-se a taxa de varredura de $1,00 \text{ mm s}^{-1}$ como a mais adequada.

Por fim, verificou-se a que a distância focal do laser (**Figura 24 D**). O melhor foco da máquina a laser estava posicionado a uma altura de 8,00 mm da superfície do grafite. No entanto, nesta condição, a potência do laser foi tão concentrada que as minas de grafite rachavam. Condições desfocadas aumentam o diâmetro do ponto de incidência

do laser, dispersando a energia e permitindo múltiplas passagens na mesma área durante a varredura [67]. Portanto, definiu-se a altura adequada como 10,0 mm.

6.2.2 Caracterização do LTGr

O tratamento a laser proporcionou uma melhora significativa no desempenho eletroquímico do grafite. A separação pico a pico (ΔE_p) da sonda redox de esfera interna $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ foi reduzida de 467 mV para 112 mV (**Figura 25 A**). A ΔE_p da dopamina diminuiu de 249 mV para 138 mV (**Figura 25 B**), indicando uma transferência de elétrons mais rápida [66,68]. A melhoria nos sinais eletroquímicos dessas sondas indica fortemente que o tratamento a laser removeu compostos que prejudicam a transferência de elétrons, como argila e cera, e introduziu grupos oxigenados na superfície do grafite.

Esses resultados são consistentes com trabalhos anteriores que relataram que o tratamento a laser do grafite introduz frações de oxigênio, restaura ligações duplas de carbono e remove aditivos da mina de grafite, resultando em uma melhoria na transferência de elétrons [66]. Outro parâmetro crítico a ser avaliado é a intensidade da corrente, que aumentou em ambos os casos (**Figura 25A-25B**), indicando uma exposição de mais locais ativos e/ou ampliação da área efetiva devido ao tratamento a laser [66].

A espectroscopia de impedância fornece evidências adicionais da melhoria na transferência de elétrons. Conforme é mostrado na (**Figura 25 C**), a resistência à transferência de elétrons diminuiu significativamente de $60,0 \Omega \text{ cm}^2$ para $10,0 \Omega \text{ cm}^2$ devido ao tratamento a laser do grafite tipo H. Além disso, as intensidades das correntes de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ registradas em diferentes taxas de varredura se ajustam à equação de

Randles-Sevcik, sugerindo que o processo eletroquímico foi controlado pela difusão da sonda, e o valor de ΔE_p permaneceu constante mesmo com o aumento da taxa de varredura (Figura 25 D).

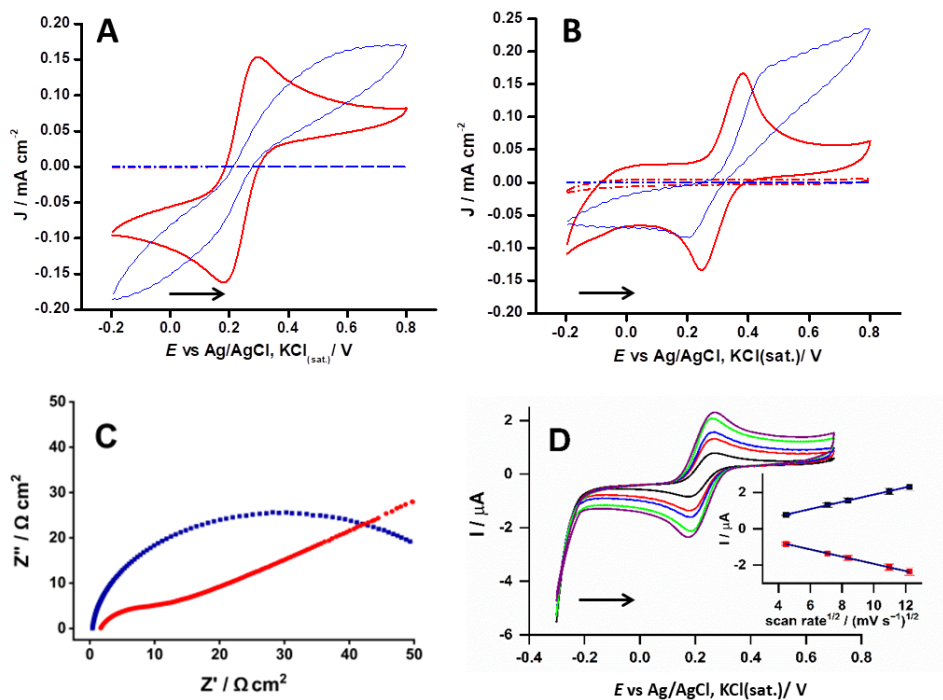


Figura 25: Voltamogramas cíclicos (CVs) registrados com uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ usando grafite tipo H não tratado - NTGr (azul) e tratado - LTGr (vermelho) sob a condição otimizada de 50,0 % da potência do laser, 1,00 mm s⁻¹ de taxa de varredura do laser e 10 mm de altura do laser na seguinte solução. (A) Solução aquosa de KCl 0,10 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-}; (B) Solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ com dopamina 1,0 mmol L⁻¹. (C) A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada no potencial de circuito aberto usando um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl contendo 4,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} usando eletrodos de grafite não tratados (azul) e tratados (vermelho) usando potencial alternado com uma amplitude de 10 mV operando na faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz. (D) Estudo em diferentes taxas de varredura em 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

O efeito do tratamento a laser na estrutura morfológica do eletrodo LTGr tipo H foi analisado por meio de FE-SEM. A superfície NTGr apresentou uma textura relativamente áspera e escamosa (Figura 26A- 26B). Após o tratamento otimizado a

laser (**Figura 26C-26D**), a superfície do eletrodo exibiu uma morfologia porosa mais complexa, com um aumento significativo de área superficial e a presença de plaquetas expostas de grafite mais evidentes (tactoides) [68][69]. De fato, o tratamento a laser introduziu mudanças morfológicas claramente visíveis, que corroboram uma melhoria na resposta eletroquímica [68].

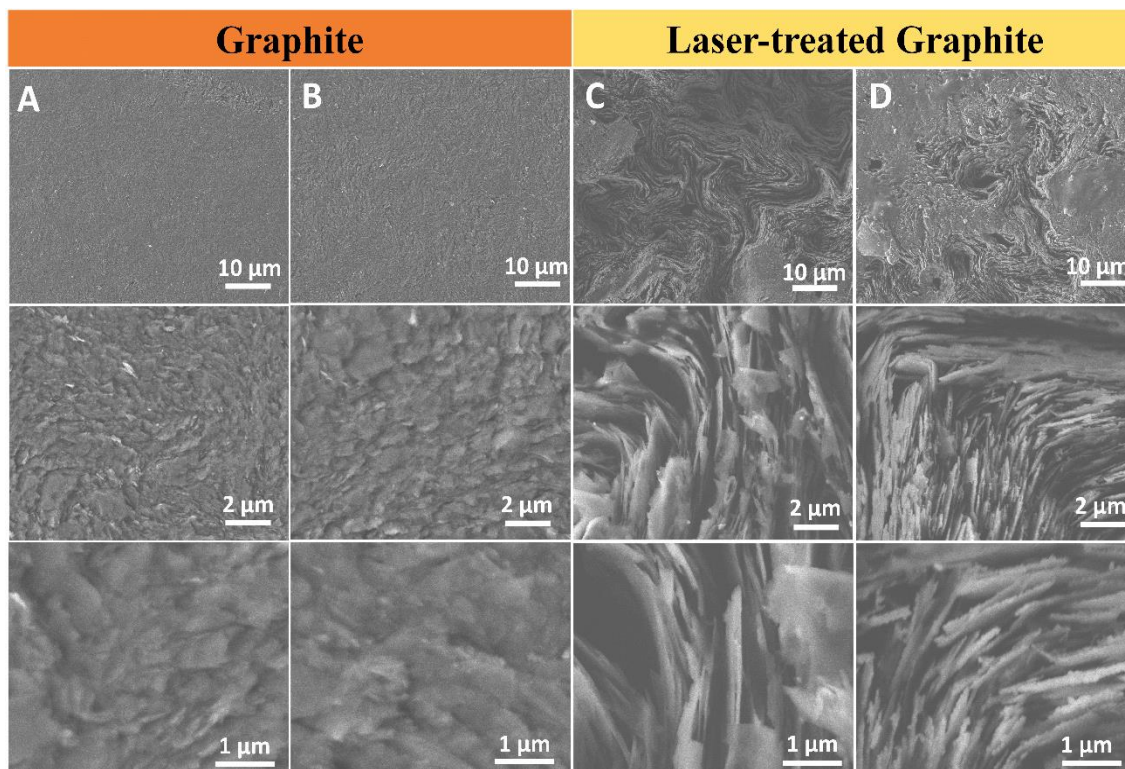


Figura 26: Imagens FE-SEM de grafite (A-B) não tratado e (C-D) tratado com laser de duas regiões diferentes e em ampliação crescente (as ampliações das imagens aumentam de cima para baixo: $\times 1000$, $\times 10\ 000$ e $\times 25\ 000$).

Complementarmente, foram obtidos resultados por meio da espectroscopia Raman, conforme mostrado na **Figura 27**. Nos espectros Raman, são representados dois picos distintos de materiais gráfiticos: as bandas D e G [68]. A banda G representa o carbono gráfitico sp^2 e corresponde ao alongamento simétrico C-C no plano. Por outro lado, a banda D representa o carbono desordenado sp^3 e está associada à distorção de

tamanho de cristalito finito presente no grafite policristalino e em materiais de carbono distorcido [68]. De fato, os espectros Raman indicaram que a razão I_D/I_G (intensidade de banda D em relação à intensidade da banda G) diminuiu de 0,43 para 0,090 após o tratamento a laser, indicando que a superfície tornou-se mais cristalina (**Figura 27 A**).

Além disso, a imagem de mapeamento Raman do eletrodo LTGr mostrou que, praticamente em toda a área mapeada (**Figura 27 B**), os valores da razão I_D/I_G são menores em comparados ao Gr não tratado (**Figura 27 C**). Esses resultados estão em concordância com os encontrados na literatura [68].

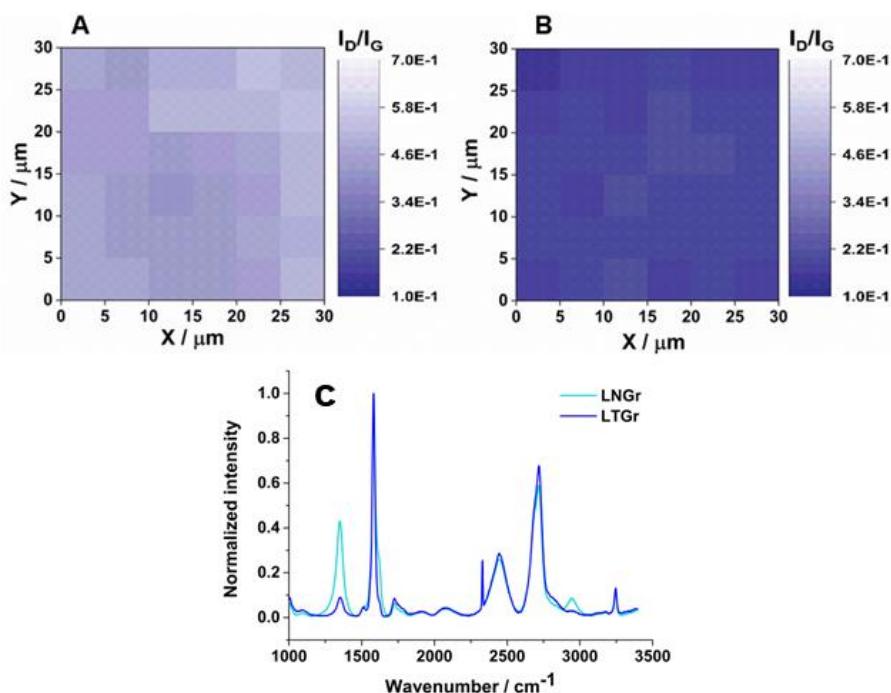


Figura 27: Mapeamento Raman de (A) NTGr e (B) LTGr, obtido usando um laser de comprimento de onda de 532 nm com uma lente de aumento $\times 5$, potência do laser de 100%, tempo de exposição de 5 s e acúmulo de 1 em uma área de $11 \times 11 \mu\text{m}$. (C) Espectro Raman ($\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$) de NTGr (linha ciano), LTGr (linha azul royal).

6.2.3 Detecção amperométrica em LTGr

Para medições eletroquímicas, foi feito uso de um tampão fosfato com concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 12$). Esse tampão foi continuamente transportado através do sistema FIA em uma única linha. O eletrodo de trabalho (LTGr) é lavado de forma permanentemente, garantindo um ambiente de medição adequado. A amostra a ser analisada é injetada na alça de amostragem de volume definido e, em seguida, é transportada pelo sistema. A detecção ocorre por meio da amperometria, na qual o analito é oxidado a $0,20 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl, sat})}$. Essa abordagem assegura uma boa reprodutibilidade ao sistema.

6.2.3.1 Otimizações das condições do sistema FIA

O par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ é utilizado como uma sonda eletroquímica em estudos de otimização dos principais parâmetros para as análises em fluxo. Foram realizados registros amperométricos para a injeção em triplicata de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em uma no sistema FIA. Este estudo preliminar teve a função de determinar as condições mais favoráveis, a serem utilizadas na detecção da indapamida em condições hidrodinâmicas. O volume da alça de amostragem foi investigado na faixa de $50,0$ a $200 \mu\text{L}$, sendo observado um aumento contínuo na resposta analítica até $150 \mu\text{L}$. Ao contrário do que foi observado no estudo anterior, utilizando GCE, houve uma pequena diminuição na corrente para volumes acima de $150 \mu\text{L}$. Desta forma, a alça de amostragem de $150 \mu\text{L}$ foi escolhida para este estudo. A vazão foi otimizada no intervalo de $0,20$ a $1,6 \text{ mL min}^{-1}$, alterando-se a altura do reservatório de solução. O sinal analítico

aumentou linearmente com a vazão até 0,80 mL min⁻¹. Para vazões superiores, o sinal continuou a crescer, de forma menos acentuada, até alcançar 1,60 mL min⁻¹. Foi verificado que nesta última condição a reprodutibilidade das medidas era bastante satisfatória e esta condição foi adotada para os estudos seguintes.

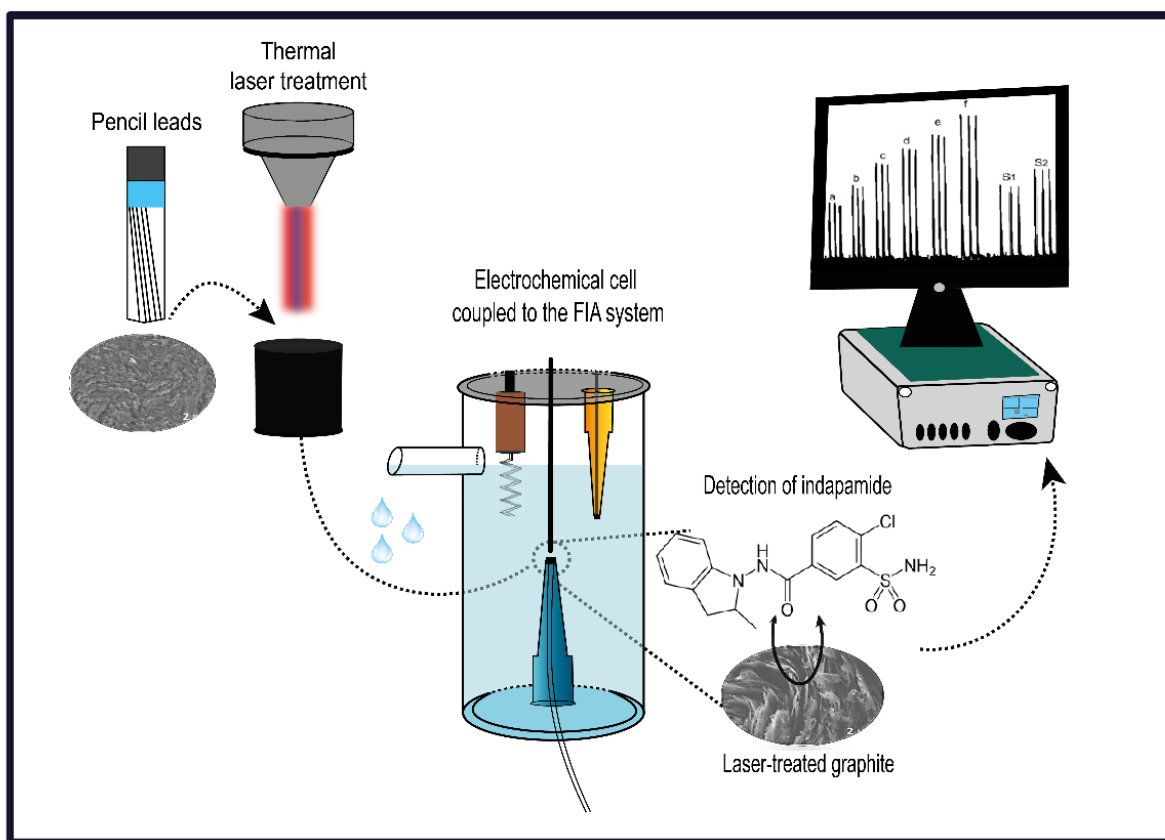


Figura 28: Representação esquemática da determinação da IND em FIA amperométrico usando LTGr.

6.2.3.2 Parâmetros analíticos

Sob condições ideais, a repetibilidade da injeção foi avaliada por meio de injeções sucessivas de 1,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ aplicando um potencial fixo de 0,35 V vs Ag/AgCl/KCl_(sat.). Este sistema permite 72 injeções por hora (tempo de análise para cada

injeção: 50 segundos. O desvio padrão relativo (RSD) para os sinais amperométricos dessas injeções foi de 2,4% (n = 10).

A repetibilidade também foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos para três eletrodos de trabalho distintos. Para cada eletrodo foram realizadas 10 injeções consecutivas de 1,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados demonstram boa repetibilidade com RSD 1,8 % [18].

Para avaliar o efeito de memória, foi construída uma curva de calibração utilizando concentrações crescentes e decrescentes de IND, variando sua concentração entre 10,0 a 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme ilustrado na **Figura 29 A**. A regressão linear para as concentrações crescentes ($I_p = 0,048 [\text{IND}] + 0,162$, $R^2 = 0,999$) e decrescentes ($I_p = 0,050 [\text{IND}] + 0,162$, $R^2 = 0,996$) demonstrou sensibilidades semelhantes, como pode ser observado na **Figura 29 B**. Além disso, a precisão da quantificação da IND também foi avaliada em um estudo de repetibilidade, com 10 injeções de 1,0 mM de IND, conforme mostrado na **Figura 29 C**. Os valores do desvio padrão relativo (RSD) encontrados foram de 0,70 %, o que indica que o método apresenta uma boa repetibilidade [70,71].

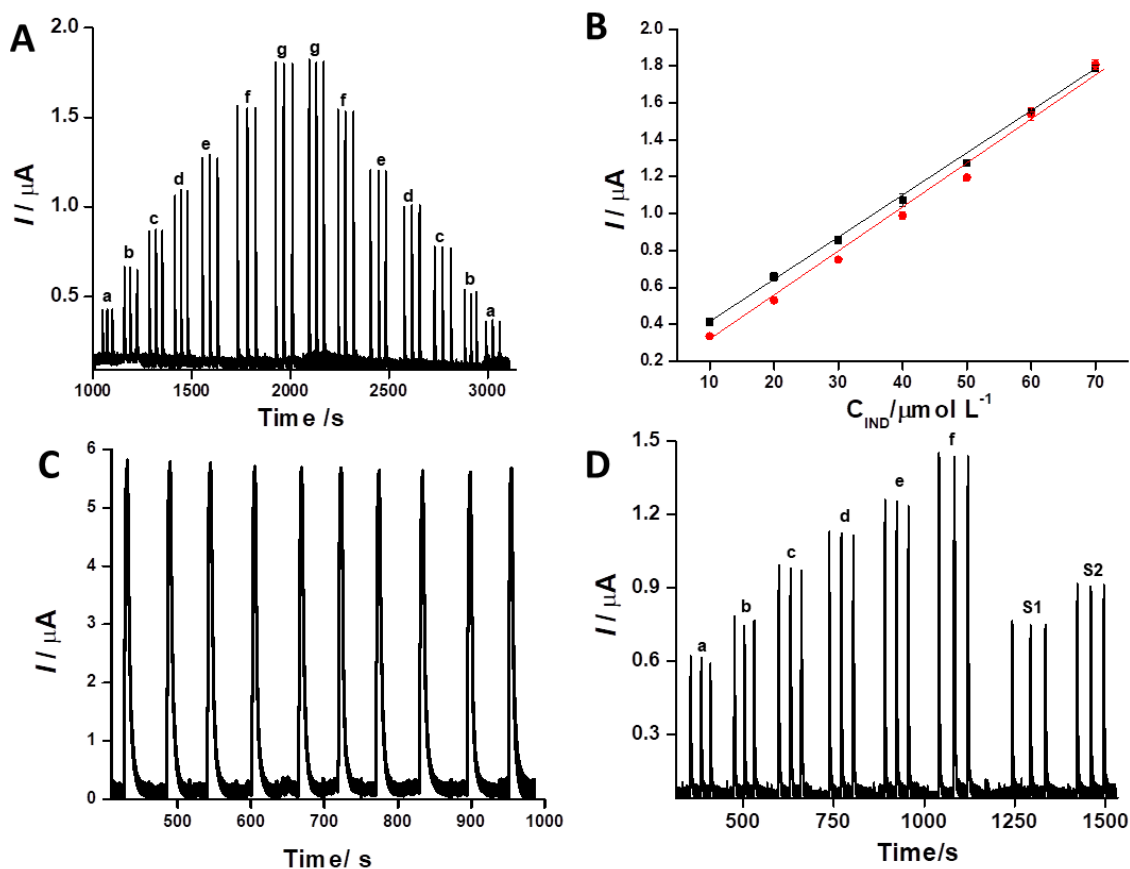


Figura 29: (A) Curvas analíticas com LTGr para concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de (a) 10,0 (b) 20,0 (c) 30,0 (d) 40,0 (e) 50,0 (f) 60,0 e (g) 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Ajustes lineares nas curvas de calibração com aumento e diminuição da concentração de IND. (C) Estudos de repetibilidade ($n=10$) de 1,0 mM IND. (D) Amperograma para determinação de IND pelo sistema FIA em urina sintética enriquecida. Curva analítica (a) 20,0 (b) 30,0 (c) 40,0 (d) 50,0 (e) 60,0 (f) 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (S1) amostra 1 e (S2) amostra 2. Condições experimentais : tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH=12), alça de amostragem de 150 μL , vazão de 1,60 mL min⁻¹ e potencial +0,20 V vs Ag/AgCl KCl_(sat.).

6.2.3.3 Determinação de IND em urina sintética

O presente estudo utilizou o eletrodo de trabalho (LTGr) para desenvolver um sensor descartável visando a detecção de IND por FIA em amostras de urina sintética,

conforme mostrado pelas respostas amperométricas na **Figura 29 D**. Foi possível obter uma curva de calibração na faixa linear de 20,0 a 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um ajuste linear ($I_p = 0,0160 [\text{IND}] + 0,278$, $R^2=0,996$). Duas amostras de urina sintética enriquecida com IND foram injetadas, com concentrações de 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 1) e 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 2), conforme ilustrado na **Figura 29 D**. Obtiveram-se recuperações de 94,5 e 94,7 %, e um limite de detecção (LOD) experimentalmente obtido de $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. [72].

Um estudo de interferência foi realizado usando uma proporção de 1:1 de IND para cada agente interferente (20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os interferentes avaliados foram uréia, glicose (Glu), dopamina (DOP) e ácido ascórbico (AA). Observou-se variações na resposta analítica do IND, variando de 4,80 a 12,1%, sendo que a DOP apresentou uma variação maior, de 25,0 %. Essa maior interferência pode ser explicada pelo fato de que o potencial de oxidação desse composto é próximo ao do IND. No entanto, uma alternativa que poderia ser utilizada é a amperometria múltipla pulsada, que reduz a interferência de outras espécies eletroativas e permite realizar testes de determinações simultâneas [59,73].

O desempenho eletroanalítico do dispositivo proposto neste trabalho para a determinação de IND foi comparado com outros sensores mencionados na literatura. Como mostrado na **Tabela 3**, o limite de detecção é semelhante aos trabalhos que utilizaram GCE e pasta de carbono (CPE), mas difere dos trabalhos que empregaram eletrodos de mercúrio, que infelizmente estão em desuso em laboratórios de pesquisa [62] [61]. O dispositivo LTGr apresenta um excelente desempenho eletroquímico, conforme evidenciado nos estudos mencionados, além de possuir baixo custo e ser

facilmente disponível. O LOD obtido neste estudo é comparável ao do GCE por meio do método dinâmico, apresentando comportamento semelhante [59].

6.2.4 Considerações finais da parte II

O tratamento a laser demonstrou ser uma técnica eficaz, rápida e conveniente para melhorar o desempenho eletroquímico de minas de grafite, eliminando materiais não condutores e pequenas partículas de grafite menos cristalinas, resultando em significativa melhora da transferência de elétrons. Isso foi avaliado por meio de voltamogramas cíclicos (CVs), utilizando dopamina e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sondas redox, e por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), na presença do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Os resultados eletroquímicos mostraram uma diminuição nas diferenças de pico a pico nos CVs e uma menor resistência à transferência de carga após o tratamento a laser. Esse tratamento resultou em uma superfície mais irregular e de área maior, composta por partículas cristalinas, que foram caracterizadas por meio de espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Utilizando a técnica FIA, a mina de grafite tratada a laser foi aplicada com sucesso na detecção de indapamida como prova de conceito em urina sintética. Portanto, o tratamento a laser mostrou-se um procedimento conveniente para melhorar o desempenho eletroquímico de materiais eletrodos, evidenciando seu potencial para a fabricação em massa de eletrodos econômicos com desempenho diferenciado.

6.3 Parte III - Mecanismo eletroquímico da indapamida em GCE

Nesta seção, é apresentada uma proposta para o mecanismo de eletrooxidação da IND, com base em estudos de voltametria que demonstram um mecanismo do tipo eletroquímico-químico (EC). Os dados obtidos indicam que ocorre uma transferência irreversível de elétrons em duas etapas, ao invés de um processo de dois elétrons em uma única etapa de transferência, como relatado na literatura [72]. Além disso, observou-se que as etapas eletroquímicas e químicas são dependentes do pH e estão envolvidas em um processo de múltiplas etapas conhecido como transferência de elétron acoplado a próton. Essa conclusão foi obtida por meio de dados experimentais e análise de Tafel, bem como previsões baseadas no modelo de Randles-Sevcik.

O mecanismo de oxidação da indapamida foi investigado por voltametria, começando com a utilização de voltametria cíclica (VC) com velocidades de varredura variáveis para observar o comportamento dos processos de oxidação. Em seguida, a voltametria de onda quadrada (SVW) foi empregada para investigar a reversibilidade dos processos redox, bem como a presença de reações químicas acopladas. Por fim, previsões teóricas, combinadas com os dados experimentais, foram utilizadas para elucidar o mecanismo e identificar o número de elétrons envolvidos em cada processo [74–76].

6.3.1 Voltametria cíclica e de onda quadrada: o comportamento eletroquímico da indapamida

Para investigar o comportamento da IND, foram realizados voltamogramas cíclicos da solução de IND 1,0 mM em uma mistura de DMSO e tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ com pH = 12, em diferentes velocidades de varredura. A **Figura 30** ilustra esses resultados, revelando a presença de três processos de oxidação distintos, denominados processos I, II e III.

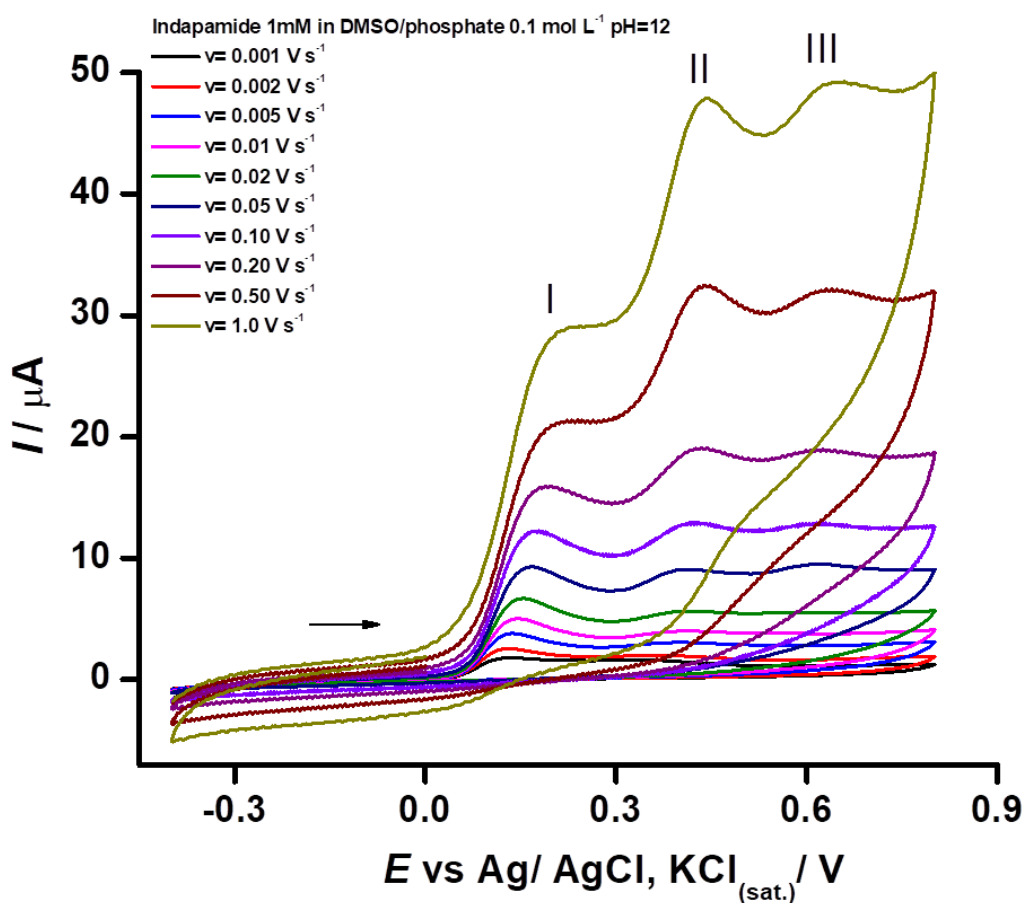


Figura 30: Voltamogramas cíclicos (VCs) (1º ciclo) típicos obtidos em soluções de indapamida em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 12 em diferentes velocidades de varredura, de 0,0010 a 1,0 V s⁻¹. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.), E_i = -0,4 V, E_f = 0,8 V. O eletrodo de trabalho foi polido após a obtenção de cada voltamograma.

A análise dos voltamogramas revela que, na faixa de velocidade de varredura de 0,0010 e 0,0020 V s^{-1} , apenas os processos I e II são observados. Acima de 0,0050 V s^{-1} , surge um terceiro pico de oxidação (processo III), sendo que entre 0,010 a 0,050 V s^{-1} o processo II começa a diminuir em intensidade enquanto o processo III se torna mais proeminente. Acima de 0,050 até 1,0 V s^{-1} , ambos os processos de oxidação apresentam picos bem definidos, porém irreversíveis, pois os potenciais de pico se deslocam com o aumento da velocidade de varredura.

No estudo mencionado na parte I [50], uma faixa de potencial foi estabelecida na qual a espécie eletroativa não adsorve no eletrodo. Esta faixa de potencial de trabalho foi utilizada para verificar se seria possível detectar algum pico de redução após inversão do potencial de varredura. Detectou-se a formação de um processo de redução adicional (processo IV), como ilustrado na **Figura 31 A**.

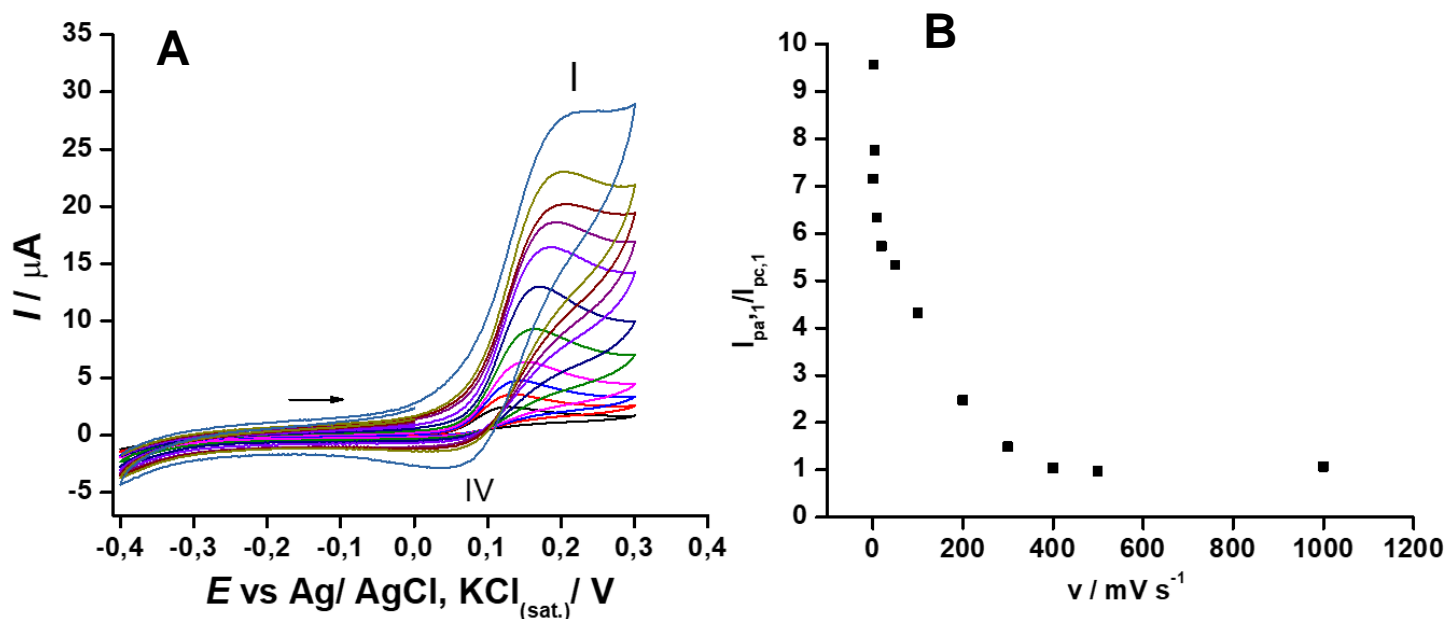


Figura 31: Voltamogramas cíclicos (VCs) (1º ciclo) obtidos com GCE em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH = 12 contendo 1,0 mmol L^{-1} de IND. (A) Janela restrita no processo I em diferentes velocidades 0,0020 a 1,0 V s^{-1} ; (B) Relação $i_{\text{pa},1} / i_{\text{pc},1}$ em função da taxa

de varredura (v) no primeiro processo de oxidação. Condições experimentais similares aquelas descritas na figura 30.

Na **Figura 31 B**, pode-se observar que a relação entre as correntes de pico diminui à medida que a velocidade de varredura aumenta, alcançando um valor próximo da unidade, entre 400 e 1000 mV s^{-1} . Esses resultados sugerem que, em altas velocidades de varredura, ao menos parte do produto formado na oxidação (processo I) é reduzido no processo IV. Estes resultados sugerem, que à baixa velocidades de varredura, o produto de oxidação formado é consumido por uma reação química acoplada, seguindo um mecanismo do tipo eletroquímico-químico (EC) [74].

Para compreender as etapas envolvidas nos processos eletroquímicos detectados, foram realizados voltamogramas de onda quadrada (SWV). A **Figura 32** mostra que, no processo I, as correntes direta e reversa possuem intensidades semelhantes e potenciais de picos de oxidação em aproximadamente 0,20 V [75].

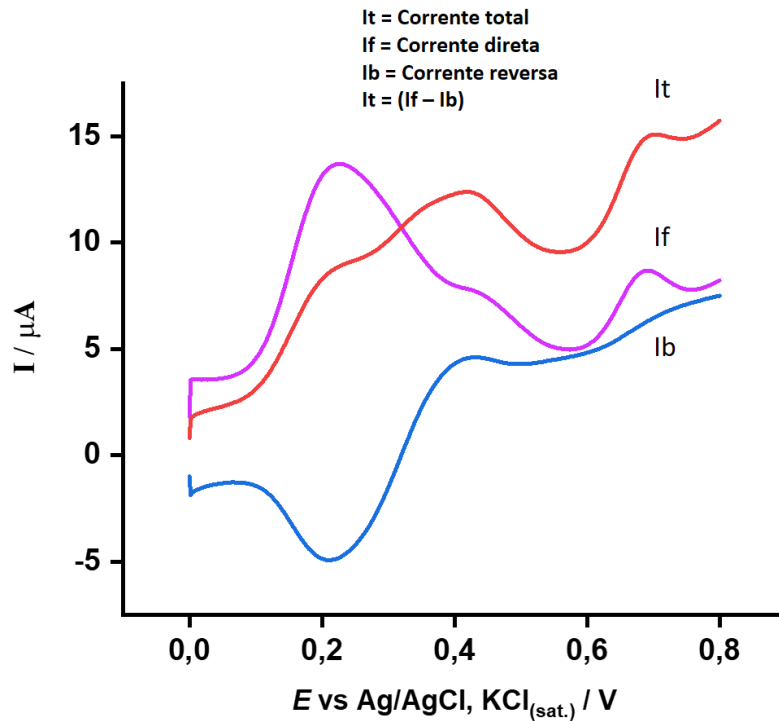


Figura 32: SWV obtido em soluções de indapamida em DMSO/tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH=12. Condições experimentais: varredura de 0,0 a 0,80 V, velocidade de varredura de 0,10 V s⁻¹

O resultado obtido na **Figura 32** está em concordância com o observado na VC restrita no processo I.

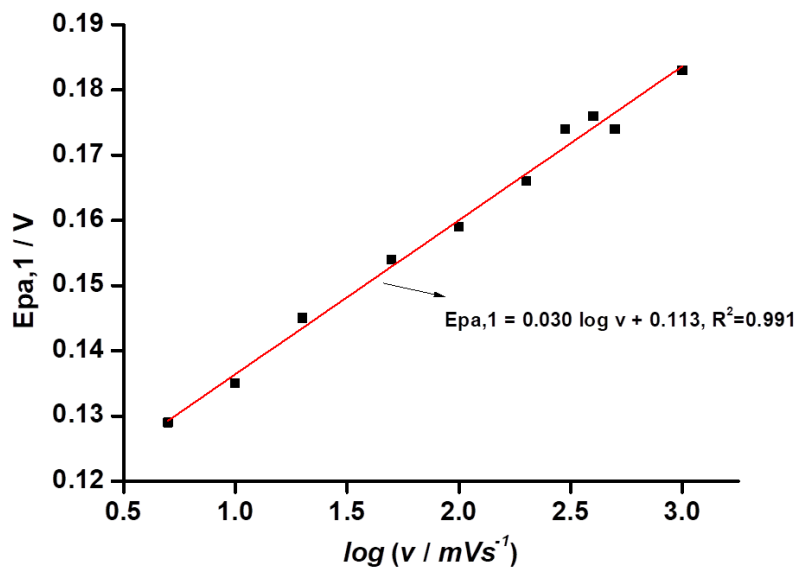


Figura 33: Gráfico $E_{pa,1}$ vs $\log v$ obtido em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH}=12$ contendo 1 mmol L^{-1} de IND. ($E_{pa,1} = 0,030 \log v + 0,113$, $R^2 = 0,991$).

De acordo com Nadjo e Saveant, um possível mecanismo EC é esperado quando o potencial de pico anódico ($E_{pa,1}$) aumenta linearmente com o aumento da velocidade de varredura (v), e a inclinação dessa relação é de 30 mV por década de aumento na velocidade de varredura, v . Isso significa que o perfil voltamétrico depende das velocidades relativas das etapas eletroquímicas e químicas envolvidas. Se a reação química é rápida, a espécie oxidada ou reduzida é rapidamente removida da região próxima ao eletrodo. Em baixas velocidades de varredura, pode-se não observar o processo, mas à medida que a escala de tempo diminui (a velocidade de varredura aumenta) o processo reverso torna cada vez mais nítido. [54].

6.3.2 Equação de Randles-Sevcik e discriminação do mecanismo de oxidação

As equações de Randles-Sevcik são utilizadas para fazer previsões teóricas e discriminativas do mecanismo eletroquímico do processo de transferência de carga. A **Equação 12** descreve o comportamento teórico de um processo reversível, enquanto a **Equação 13** descreve o comportamento teórico de um processo irreversível de múltiplas etapas.

A **Figura 34** compara as previsões teóricas de Randles-Sevcik para dois mecanismos diferentes: uma oxidação de dois elétrons com a primeira etapa determinante e outra com transferência de um elétron. Os resultados experimentais são plotados para mostrar o melhor ajuste aos dados [76].

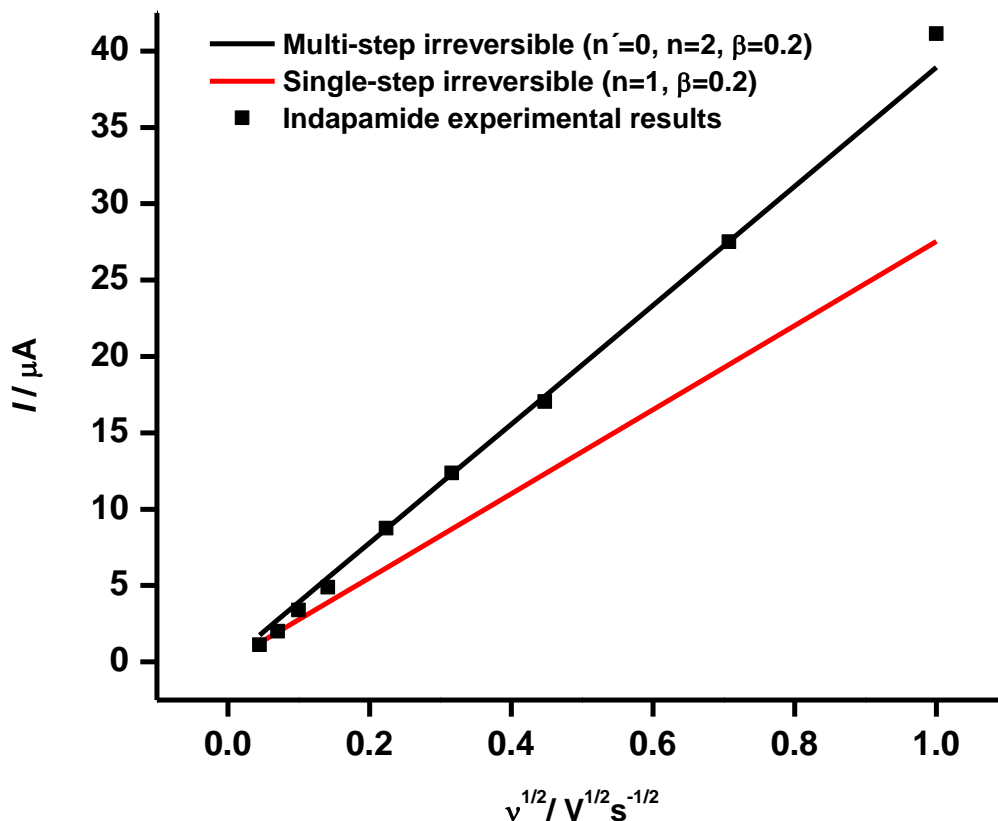


Figura 34: Gráfico de corrente de pico de oxidação de indapamida em função da raiz quadrada das taxas de varredura, em comparação com os gráficos teóricos das equações de Randles-Sevcik (quadrado preto - valores de corrente de pico experimentais IND; **linha preta** – processo irreversível de várias etapas, em que $n'=0$ (sendo n' o número de elétrons antes da etapa determinante da velocidade), $n= 2$ (n é o número total de elétrons transferidos), $\beta=0,2$ (coeficiente de transferência de carga anódica); **linha vermelha** - irreversível $n=1$ $\beta = 0,2$, área do eletrodo = $0,0314 \text{ cm}^2$, $D = 4,31 \times 10^{-5} \text{ cms}^{-1}$.

Como decorre dos dados apresentados na **figura 34**, os valores experimentais se ajustam ao caso irreversível de várias etapas, com a velocidade de transferência de carga da primeira etapa sendo a etapa determinante do processo.

6.3.3 A influência do pH na etapa química da IND

A influência do pH no perfil voltamétrico dos processos eletroquímicos foi avaliada obtendo-se voltamogramas cíclicos em soluções de IND em diferentes valores de pH e velocidade de varredura. A **Figura 35** mostra a influência do pH do meio no perfil voltamétrico, onde à medida que o pH aumenta, os três processos começam a ocorrer e apresentar picos mais definidos.

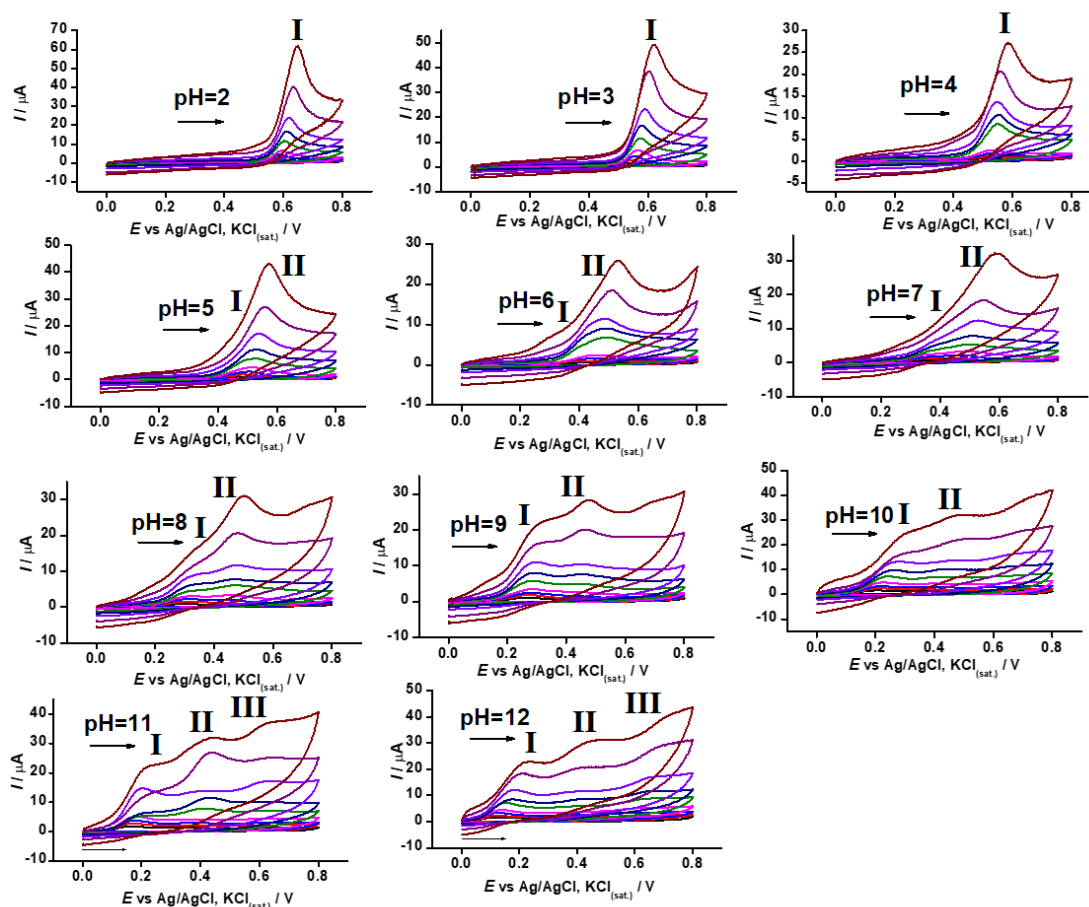
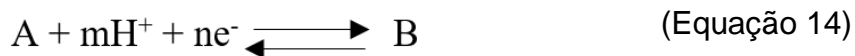


Figura 35: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de indapamida 1 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em valores de pH de 2,0 a 12 em diferentes velocidades de varredura de $0,0020$ a $1,0 \text{ V s}^{-1}$.

Pelos voltamogramas apresentados na **figura 35**, é possível observar que os potenciais de pico de oxidação obtidos são dependentes do pH, como de fato deveriam ser, uma vez que a adição ou remoção de um elétron de uma determinada molécula orgânica pode induzir a incorporação ou perda de um próton [78]. Considerando uma redução generalizada que envolve m prótons e consome n elétrons:



$$E^{\circ}_{f,\text{eff}} = E^{\circ}_f(A/B) - 2.303 \frac{mRT}{nF} \text{pH} \quad (\text{Equação 15})$$

$E^{\circ}_{f,\text{eff}}$ é o potencial formal “efetivo”, $E^{\circ}_f(A/B)$ é o potencial formal, m é o número de prótons, n é o número de elétrons, R é a constante do gás em $\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$ e T é a temperatura em K [27].

O potencial varia de $2,303 \times mRT/nF$ por unidade de pH, e no caso onde $m=n$ isso corresponde a 59 mV, ou seja, o mesmo número de prótons e elétrons são transferidos [79].

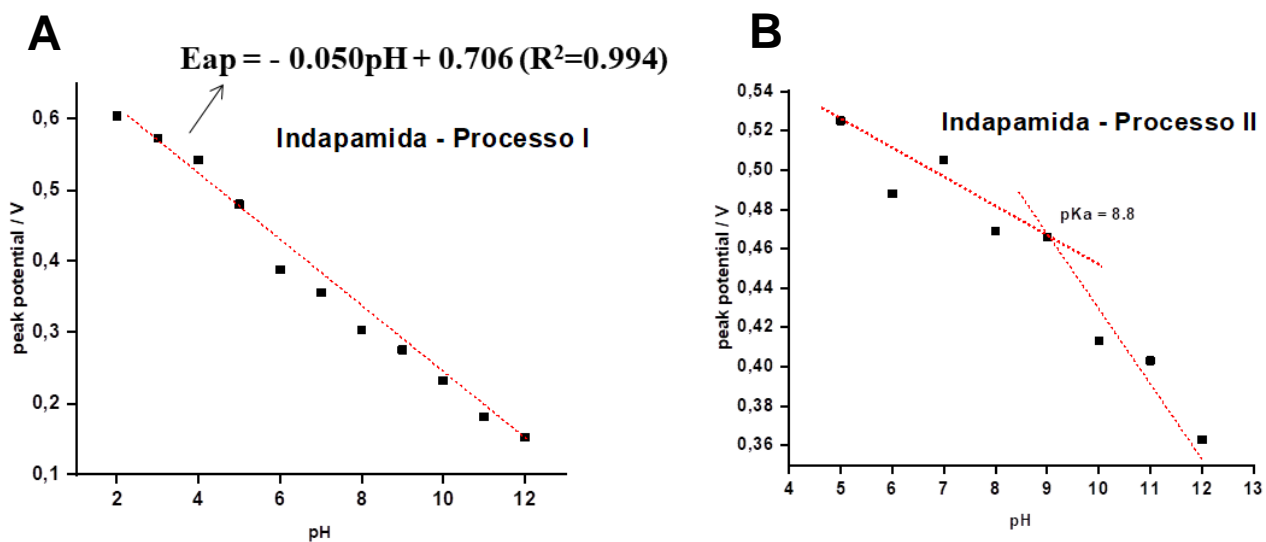


Figura 36: Diagrama de Pourbaix (Potencial de pico em função do pH) dos processos IND. A) Processo I – inclinação $E_{p,1} = -0,050\text{pH} + 0,706$, $R^2=0.994$, B) Processo II.

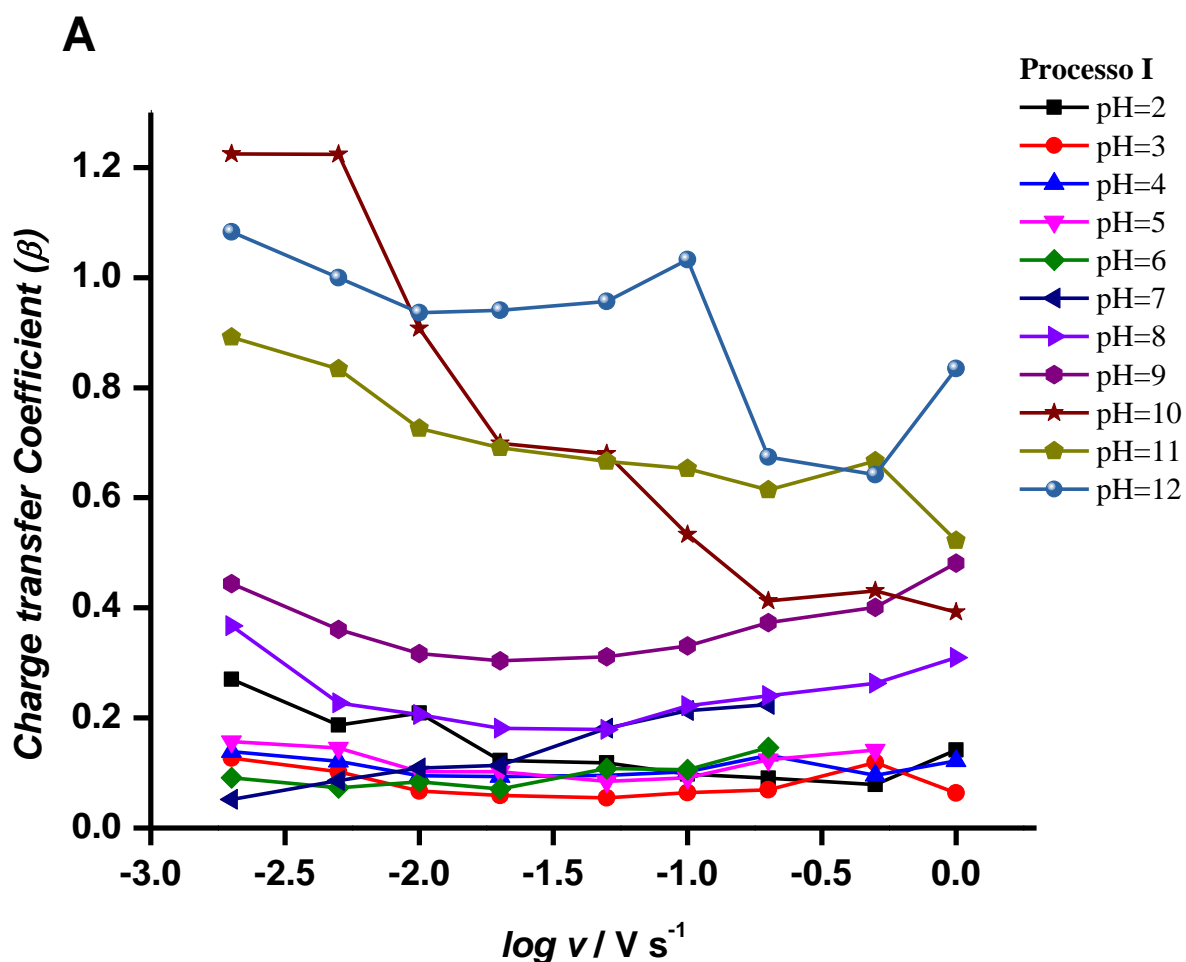
Na **Figura 36**, são apresentados os diagramas de Pourbaix para processos I e II. No processo I (**Figura 36 A**), observa-se uma diminuição do potencial com o aumento do pH, indicando um processo que envolve 1 prótons para cada elétron transferido. Na interseção de duas regiões na **Figura 36 B**, encontra-se o pKa da espécie formada na etapa química que consumiu o produto formado no primeiro pico de oxidação eletroquímica da IND. Na **Figura 36 B** curva do processo II apresenta uma quebra em torno de $\text{pH}=8,8$, sugerindo que este valor corresponda ao pKa IND, e quando comparado com a literatura, seu valor é próximo ao pKa 9,0 [16]. Além disso, a **Figura 36 A** mostra uma inclinação de 57 mV por década de pH, demonstrando que esse processo envolve o mesmo número de prótons e elétrons.

6.3.4 Oxidação eletroquímica dos processos I e II

Para elucidar os processos de oxidação denominados de I e II que foram observados nos voltamogramas cíclicos obtidos à diferentes velocidades de varredura em solução de 1 mM de IND é importante realizar uma análise de Tafel para assim obter informações sobre os coeficientes de transferência de carga para cada um dos processos, denominados de I e II. No caso da oxidação, esses coeficientes (β) são calculados utilizando a equação [79].

$$\beta (E) = \frac{F}{RT} \frac{d \ln I}{d E} \quad (\text{Equação 16})$$

Os valores de β para os processos I e II, calculados usando a Equação 16, foram representados como função do logaritmo da velocidade de varredura e comparados com os valores obtidos com base nas previsões teóricas de Randles-Sevcik. Ao comparar com o pH, observa-se a influência da mudança de mecanismo no processo eletroquímico, como mostrado na **Figura 37**.



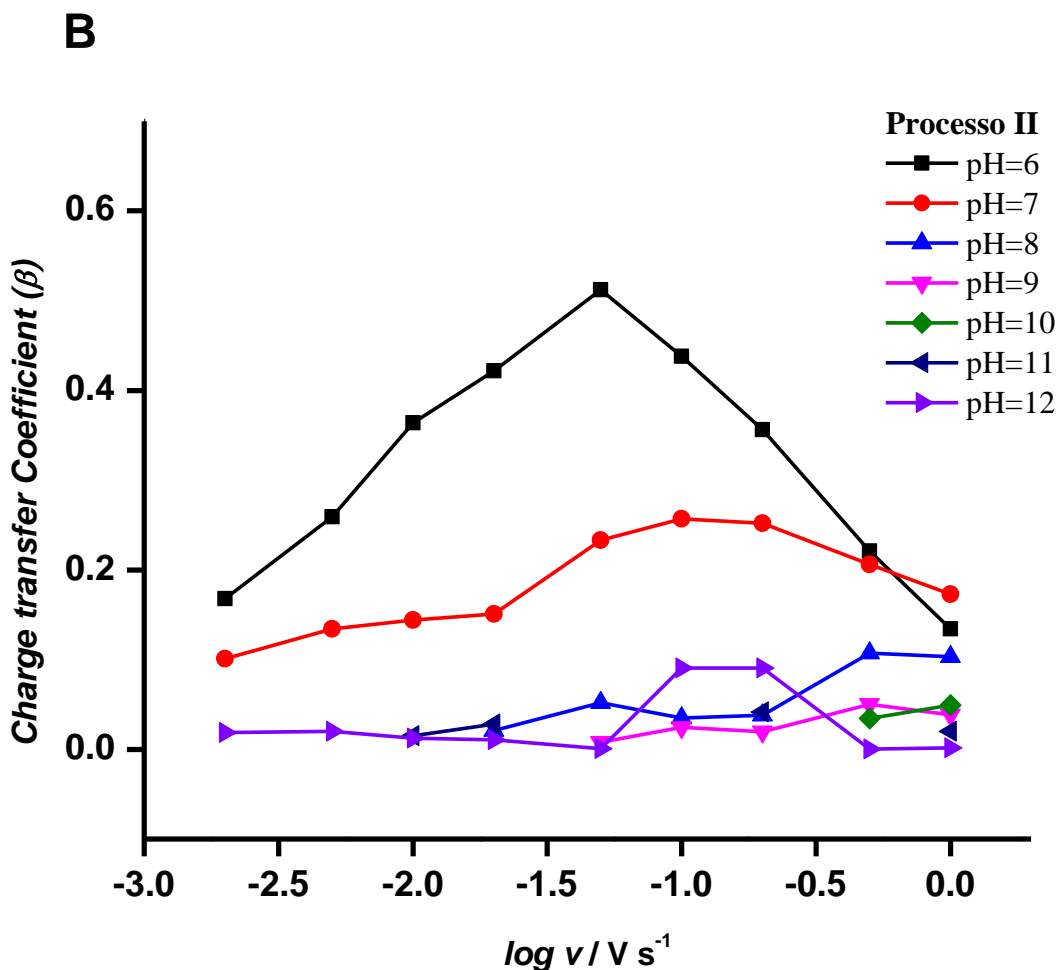


Figura 37: Valores de β diferentes valores de pH: A) processo I e B) processo II. Os voltamogramas foram obtidos em solução de IND $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o intervalo de potencial (-0,4 V a 0,8 V vs Ag/AgCl_(KCl, sat.)).

No processo I, conforme mostrado na **Figura 37 A**, observa-se um melhor desempenho na transferência de carga em um meio mais básico. No entanto, no processo II (**Figura 37 B**) indica-se o contrário, com um valor menor de β .

Portanto, de acordo com a equação de Randles-Sevcik, seria esperado um processo de dois elétrons em várias etapas antes da etapa determinante da velocidade ($n'=0$) para o processo I. Esse resultado está em concordância com os valores obtidos na análise de Tafel ($0 < \beta < 1$), o que indica que o primeiro processo é a etapa limitante.

6.3.5 Proposta de mecanismo

Com a análise de todos os dados obtidos, é proposto o respectivo mecanismo de oxidação eletroquímica, de acordo com a **Figura 38**.

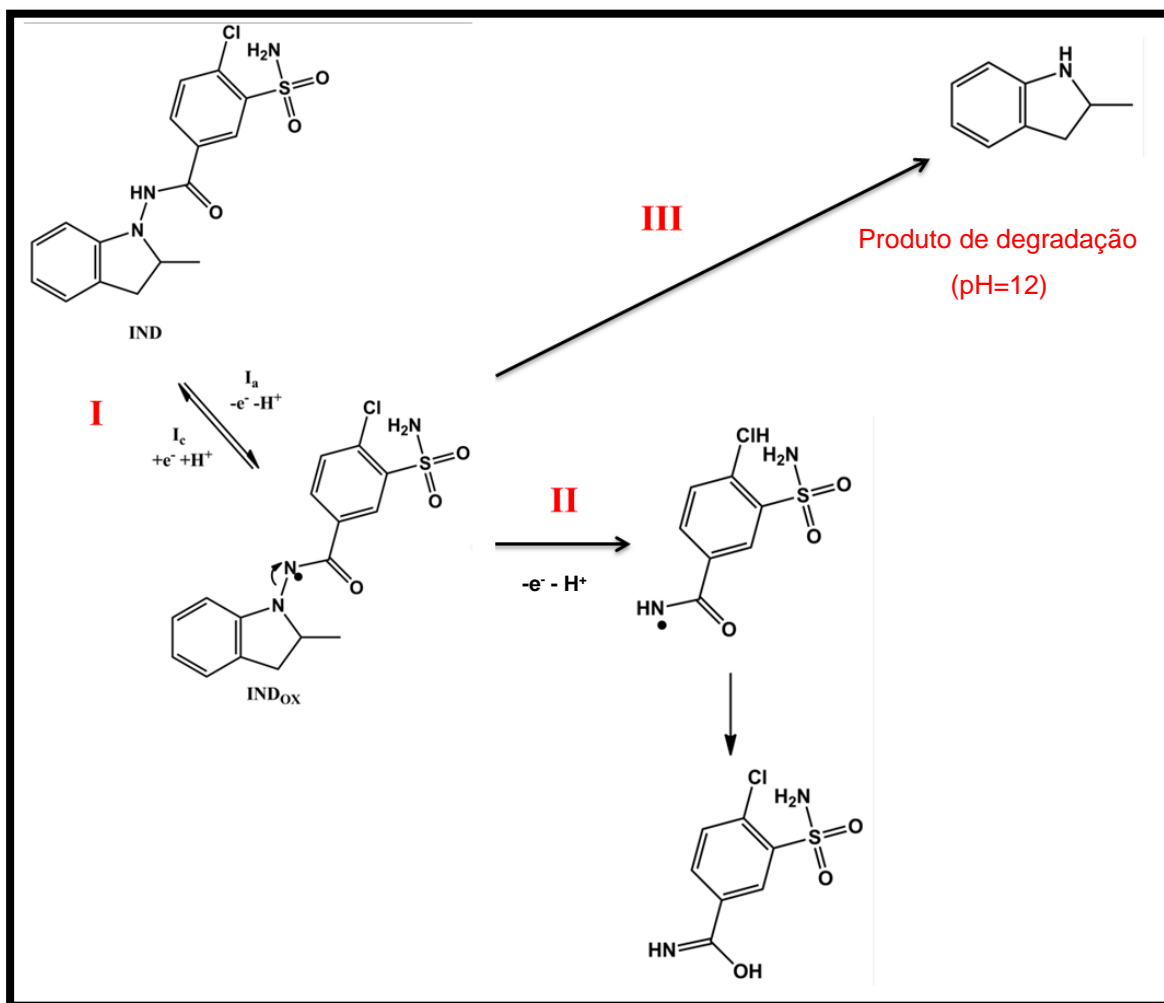


Figura 38: Mecanismo de oxidação eletroquímica proposto para os três processos IND.

Em conclusão, os dados obtidos sugerem um comportamento reversível com a formação de um pico de redução (IV) restrito ao processo I, como evidenciado pelos estudos de voltametria cíclica e onda quadrada. Com estudos teóricos baseados na

equação de Randles-Sevcik postula-se a presença de uma etapa de múltiplos passos envolvendo dois elétrons, mas não de maneira direta como relatado na literatura. Em vez disso, observa-se que a molécula perde primeiro um elétron na porção indolina e depois outro na porção do grupo sulfonamida. O processo III, como evidenciado na **Figura 30**, é observado em pH acima de 10, e acredita-se que seja resultado da degradação do princípio ativo.

Através da representação gráfica de Tafel, é possível obter uma ideia da transferência de carga no processo. Observa-se que no processo I há uma melhora na transferência de carga em um meio mais básico, com valores de Tafel próximo de 1. Esses valores indicam cineticamente que o estado energético dos produtos está próximo do estado de transição, o que resulta em uma barreira de ativação menor e facilita a reação. Porém, à medida que o meio se torna mais ácido, o valor de Tafel diminui para próximo de 0,1, como ilustrado na **Figura 37 A**.

Por outro lado, no processo II, ocorre o oposto, com uma diminuição de β à medida que o pH aumenta. Isso sugere uma mudança no mecanismo de reação com a variação do pH.

Esses resultados indicam uma clara mudança de mecanismo com a variação do pH, evidenciando a influência do ambiente ácido ou básico na cinética e na transferência de carga nos processos estudados.

6.3.6 Considerações finais da parte III

O mecanismo de oxidação eletroquímica da IND foi estudado usando voltametria cíclica (CV) em solução de PBS 0,10 mol L⁻¹ em diferentes pH. A indapamida é um

diurético proibido em casos de doping, e compreender os processos de oxidação é fundamental para uma possível aplicação eletroanalítica.

Observou-se que a IND apresenta três processos de oxidação I/II/III e um processo de redução (IV), que não foram relatados na literatura anteriormente. A formação dos produtos oxidados é favorecida em um meio mais básico, e a transferência eletrônica envolve um próton e um elétron, além de etapas químicas acopladas.

Com base na análise de Tafel, um mecanismo eletroquímico mais detalhado é proposto, permitindo uma melhor compreensão dos processos envolvidos na oxidação da indapamida.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram apresentados e discutidos métodos analíticos baseados em análise em fluxo para determinação de indapamida em produtos farmacêuticos e urina sintética.

Inicialmente, o estudo da IND foi realizado em eletrodos de carbono vítreo, onde foi observado que a oxidação dos subprodutos está associada ao envenenamento da superfície do eletrodo. Portanto, trabalhando em meio alcalino e explorando o processo I de oxidação, foi possível encontrar uma faixa ótima de trabalho.

Assim, o sistema de detecção amperométrica em carbono vítreo (GCE) e grafite tratado a laser (LTGr) foi aplicado em um sistema de fluxo, utilizando um potencial de 0,20 V vs Ag/AgCl/KCl_(sat.). Ambos os dispositivos apresentaram um bom desempenho na quantificação de IND, sendo métodos analíticos viáveis para testes doping, com boa sensibilidade, baixo custo e frequência analítica adequada.

Além disso, foi proposto um mecanismo de oxidação do fármaco com base em estudos voltámetricos usando o GCE. Foi desenvolvida a hipótese de que a molécula passa por uma etapa eletroquímica no primeiro processo, e em seguida, seu produto sofre uma etapa química, para depois ocorrer a etapa eletroquímica. No entanto, é importante ressaltar que esse estudo carece de comparação, por exemplo, com a espectroscopia de massas, para confirmar as observações eletroquímicas.

Portanto, esse trabalho demonstra uma ampliação das formas de detecção da IND e, além disso, fornece um entendimento mais completo dos processos que ocorrem na superfície do eletrodo.

8 PERSPECTIVAS

Os trabalhos desenvolvidos nesta dissertação abriram várias perspectivas para futuras pesquisas, incluindo:

- (1) **Parte I:** Uma possível análise utilizando amperométrica de multi-pulso variado como alternativa para estudos em amostras mais complexas, como amostras de urina real.
- (2) **Parte II:** Com o desenvolvimento de eletrodos à base de grafite de lápis, é possível explorar outras técnicas para a produção de eletrodos, como a imobilização de nanopartículas a laser, visando melhorar a transferência eletrônica.
- (3) **Parte III:** Para complementar as hipóteses eletroquímicas do mecanismo, é necessário realizar estudos adicionais na porção do processo III, a fim de investigar o que está ocorrendo. Por exemplo, seria importante realizar um

estudo mais completo utilizando espectroscopia UV-Vis para analisar a absorção de luz e identificar possíveis produtos intermediários. Além disso, seria interessante realizar experimentos em meio não-aquoso para investigar os possíveis produtos de hidrólise. Adicionalmente, acoplar o sistema eletroquímico à espectroscopia de massa seria uma abordagem promissora para comprovar as espécies intermediárias e obter evidências mais robustas para a elucidação do mecanismo. Esse tipo de análise permitiria identificar as massas moleculares das espécies presentes durante as reações e fornecer insights valiosos sobre os intermediários formados.

Essas são algumas direções promissoras para pesquisas futuras, que podem aprofundar ainda mais o conhecimento e a compreensão dos sistemas estudados nesta dissertação.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] G. Li, X. Zhang, Y. Tian, Z. Zhang, J. Rui, X. Chu, Pharmacokinetics and bioequivalence study of two indapamide formulations after single-dose administration in healthy Chinese male volunteers, *Drug Res (Stuttg)*. 63 (2013) 13–18. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1331181>.
- [2] K. Patel, U. Chhalotiya, H. Kachhiya, J. Patel, D. Shah, D. Nagda, Simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide and amlodipine besylate in newer combination of anti-hypertensive drugs in pharmaceutical dosage form by thin layer chromatography method, *Separation Science Plus*. 3 (2020) 175–184. <https://doi.org/10.1002/sscp.202000010>.
- [3] A.B. Cadwallader, X. de la Torre, A. Tieri, F. Botrè, The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis, *Br J Pharmacol*. 161 (2010) 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x>.
- [4] M.J. Legorburu, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, E. Ortiz, Quantitative determination of indapamide in pharmaceuticals and urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *J Chromatogr Sci*. 37 (1999) 283–287. <https://doi.org/10.1093/chromsci/37.8.283>.
- [5] J. Tang, J. Li, J. Sun, J. Yin, Z. He, Rapid and sensitive determination of indapamide in human blood by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study, *Pharmazie*. 60 (2005) 819–822.

- [6] Y. Zhang, Y. Lei, H. Lu, L. Shi, P. Wang, Z. Ali, J. Li, Electrochemical detection of bisphenols in food: A review, *Food Chem.* 346 (2021) 128895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128895>.
- [7] J. Wang, Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review, *Talanta.* 56 (2002) 223–231. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(01\)00592-6](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(01)00592-6).
- [8] S. Kurbanoglu, M.A. Unal, S.A. Ozkan, Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds, *Electrochimica Acta.* 287 (2018) 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.217>.
- [9] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, 1988.
- [10] A.Y. Litvin, I.E. Chazova, A.V. Aksenova, I.P. Kolos, Fixed-dose perindopril and indapamide combination: in hospital effectiveness in arterial hypertension patients with obstructive sleep apnoea syndrome, *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 5 (2023) 17–21. <https://cardiovascular.elpub.ru/jour/article/view/1526> (accessed April 11, 2023).
- [11] A. Bataillard, P. Schiavi, J. Sassard, Pharmacological Properties of Indapamide, *Clin Pharmacokinet.* 37 (1999) 7–12. <https://doi.org/10.2165/00003088-199937001-00002>.
- [12] M. Chaffman, R.C. Heel, R.N. Brogden, T.M. Speight, G.S. Avery, Indapamide. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension, *Drugs.* 28 (1984) 189–235. <https://doi.org/10.2165/00003495-198428030-00001>.
- [13] J. Sassard, A. Bataillard, H. McIntyre, An overview of the pharmacology and clinical efficacy of indapamide sustained release, *Fundam Clin Pharmacol.* 19 (2005) 637–645. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00377.x>.
- [14] P. Weidmann, Metabolic profile of indapamide sustained-release in patients with hypertension: data from three randomised double-blind studies, *Drug Saf.* 24 (2001) 1155–1165. <https://doi.org/10.2165/00002018-200124150-00006>.
- [15] Z. Lin, B.M.Y. Cheung, V. Tang, M.F. Tsoi, Incidence of severe hypokalaemia in patients taking indapamide, *Intern Emerg Med.* 18 (2023) 549–557. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03209-8>.
- [16] Z. Wojnarowska, K. Grzybowska, L. Hawelek, M. Dulski, R. Wrzalik, I. Gruszka, M. Paluch, K. Pienkowska, W. Sawicki, P. Bujak, K.J. Paluch, L. Tajber, J. Markowski, Molecular Dynamics, Physical Stability and Solubility Advantage from Amorphous Indapamide Drug, *Mol. Pharmaceutics.* 10 (2013) 3612–3627. <https://doi.org/10.1021/mp400116q>.
- [17] M.J. Legorburu, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, Electrochemical oxidation of the diuretic indapamide, *Electroanalysis.* 8 (1996) 280–284. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080314>.
- [18] W.-D. Chen, Y. Liang, H. Zhang, H. Li, Y. Xiong, G.-J. Wang, L. Xie, Simple, sensitive and rapid LC-MS method for the quantitation of indapamide in human plasma--application to pharmacokinetic studies, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 842 (2006) 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.024>.
- [19] H. Gao, H. Liu, X. Zheng, X. Cui, S. Bricout-Hennel, A. Lucien, P. Lauruol, Y. Wang, X.Y. Wang, H. Wang, C. Rui, Potential pharmacokinetic interactions in fixed-dose combinations of perindopril/indapamide/amlodipine compared with

- perindopril/indapamide and amlodipine in healthy Chinese volunteers, *Acta Materia Medica*. 2 (2023) 84–95. <https://doi.org/10.15212/AMM-2022-0045>.
- [20] K. Torrarit, S. Kongkaew, K. Samoson, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, K.H. Chang, A.F.L. Abdullah, W. Limbut, Flow Injection Amperometric Measurement of Formalin in Seafood, *ACS Omega*. 7 (2022) 17679–17691. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00515>.
- [21] R. Jarosova, K. Irikura, R.C. Rocha-Filho, G.M. Swain, Detection of Pyocyanin with a Boron-doped Diamond Electrode Using Flow Injection Analysis with Amperometric Detection and Square Wave Voltammetry, *Electroanalysis*. 34 (2022) 1902–1912. <https://doi.org/10.1002/elan.202100562>.
- [22] H. Madkour, M. Gadallah, B. Riveline, G.E. Plante, S.G. Massry, Indapamide is superior to thiazide in the preservation of renal function in patients with renal insufficiency and systemic hypertension, *The American Journal of Cardiology*. 77 (1996) B23–B25. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)89236-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)89236-3).
- [23] A. Lalande, S. Roux, M.-A. Denne, E.R. Stanley, P. Schiavi, D. Guez, M.-C. De Vernejoul, Indapamide, a Thiazide-Like Diuretic, Decreases Bone Resorption In Vitro, *Journal of Bone and Mineral Research*. 16 (2001) 361–370. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.2.361>.
- [24] M. Trojanowicz, *Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications*, World Scientific, 2000.
- [25] B. Karlberg, G.E. Pacey, *Flow Injection Analysis: A Practical Guide*, Elsevier, 1989.
- [26] D.T. Gimenes, J.M. de Freitas, R. a. A. Munoz, E.M. Richter, Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis*. 23 (2011) 2521–2525. <https://doi.org/10.1002/elan.201100126>.
- [27] C.E.S. Miranda, E. Carrilho, A.P. Gervasio, M.F. Giné, Flow injection analysis - capillary electrophoresis hyphenated systems (FIA-CE): challenges, applications and perspectives, *Quím. Nova*. 25 (2002) 412–419. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300014>.
- [28] F.S. Felix, L. Angnes, Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99 (2010) 4784–4804. <https://doi.org/10.1002/jps.22192>.
- [29] D.T. Gimenes, W.T.P. dos Santos, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection, *Electrochemistry Communications*. 12 (2010) 216–218. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.11.028>.
- [30] O. Fatibello-Filho, T.A. Silva, F.C. de Moraes, E. Sitta, *Eletroanálises: aspectos teóricos e práticos*, EdUFSCar, 2022.
- [31] W.T.P. dos Santos, D.T. Gimenes, E.M. Richter, L. Angnes, Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications, *Quím. Nova*. 34 (2011) 1753–1761. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000008>.
- [32] R.G. Compton, C.E. Banks, *Understanding Voltammetry (Third Edition)*, World Scientific, 2018.
- [33] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, 2023.

- [34] C. Batchelor-McAuley, E. Kätelhön, E.O. Barnes, R.G. Compton, E. Laborda, A. Molina, Recent Advances in Voltammetry, *ChemistryOpen*. 4 (2015) 224–260. <https://doi.org/10.1002/open.201500042>.
- [35] A.M.O. Brett, C.M.A. Brett, *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, 1ª edição, Almedina, 2000.
- [36] E.R.G. e N.R. Stradiotto, Métodos de Determinação de Parâmetros Cinéticos de Processos Eletródicos, *Química Nova*. 5 (1982) 38–42. http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=2788 (accessed March 30, 2023).
- [37] K.J. Vetter, *Electrochemical Kinetics: Theoretical Aspects*, Elsevier, 2013.
- [38] I.G. David, D.-E. Popa, M. Buleandra, Pencil Graphite Electrodes: A Versatile Tool in Electroanalysis, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017 (2017) e1905968. <https://doi.org/10.1155/2017/1905968>.
- [39] O.C. Compton, S.T. Nguyen, Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials, *Small*. 6 (2010) 711–723. <https://doi.org/10.1002/sml.200901934>.
- [40] Y.T. Liang, M.C. Hersam, Highly Concentrated Graphene Solutions via Polymer Enhanced Solvent Exfoliation and Iterative Solvent Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 17661–17663. <https://doi.org/10.1021/ja107661g>.
- [41] Z. Tang, H. Chen, X. Chen, L. Wu, X. Yu, Graphene Oxide Based Recyclable Dehydrogenation of Ammonia Borane within a Hybrid Nanostructure, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5464–5467. <https://doi.org/10.1021/ja300003t>.
- [42] W.A. Ameku, M. Negahdary, I.S. Lima, B.G. Santos, T.G. Oliveira, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, Laser-Scribed Graphene-Based Electrochemical Sensors: A Review, *Chemosensors*. 10 (2022) 505. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10120505>.
- [43] J. Li, X. Bo, Laser-enabled flexible electrochemical sensor on finger for fast food security detection, *Journal of Hazardous Materials*. 423 (2022) 127014. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127014>.
- [44] J.S. Nah, S.C. Barman, M.A. Zahed, Md. Sharifuzzaman, H. Yoon, C. Park, S. Yoon, S. Zhang, J.Y. Park, A wearable microfluidics-integrated impedimetric immunosensor based on Ti3C2Tx MXene incorporated laser-burned graphene for noninvasive sweat cortisol detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 329 (2021) 129206. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129206>.
- [45] A. Lurf, H. He, M. Forster, J. Klinowski, Structure of Graphite Oxide Revisited, *J. Phys. Chem. B*. 102 (1998) 4477–4482. <https://doi.org/10.1021/jp9731821>.
- [46] L.P. Silva, B.C. Lourencao, O. Fatibello-Filho, DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE BESILATO DE ANLÓDIPINO E HIDROCLOROTIAZIDA EM AMOSTRAS DE URINA SINTÉTICA UTILIZANDO UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO, *Quím. Nova*. 38 (2015) 801–806. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150077>.
- [47] J.J. Pedrotti, L. Angnes, I.G.R. Gutz, Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions, *Electroanalysis*. 8 (1996) 673–675. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>.
- [48] F.J. Krug, H. Bergamin F°, E.A.G. Zagatto, Commutation in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta*. 179 (1986) 103–118. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)84457-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84457-8).

- [49] B.F. dos Reis, M.F.G. Giné-Rosias, E. a. M. Kronka, Análise química por injeção em fluxo contínuo, *Química Nova*. 12 (1989) 82–91. <https://repositorio.usp.br/item/000791629> (accessed March 30, 2023).
- [50] T. Gomes, B. Gomes, J. Martins, L. Angnes, Amperometric detection of indapamide on glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. n/a (n.d.) e202200441. <https://doi.org/10.1002/elan.202200441>.
- [51] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 21 (2002) 199–210. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00307-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00307-2).
- [52] M. Trojanowicz, K. Kołacińska, Recent advances in flow injection analysis, *Analyst*. 141 (2016) 2085–2139. <https://doi.org/10.1039/C5AN02522B>.
- [53] S. Tvorynska, J. Barek, B. Josypczuk, High-performance amperometric biosensor for flow injection analysis consisting of a replaceable lactate oxidase-based mini-reactor and a silver amalgam screen-printed electrode, *Electrochimica Acta*. 445 (2023) 142033. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142033>.
- [54] J.-M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006.
- [55] S. Sethi, J. Martens, R. Bhushan, Chromatographic methods and approaches for bioequivalence study, drug screening and enantioseparation of indapamide, *Acta Chromatographica*. 1 (2023). <https://doi.org/10.1556/1326.2023.01123>.
- [56] G. Tiris, M. Mehmandoust, H.M. Lotfy, N. Erk, S.-W. Joo, E.-N. Dragoi, Y. Vasseghian, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, amlodipine, and telmisartan with spectrophotometric and HPLC green chemistry applications, *Chemosphere*. 303 (2022) 135074. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135074>.
- [57] A. El-Gindy, M.W. Nassar, K.A.-S. Attia, H.H. Abu-Seada, M. El-Ghandour, Stability-Indicating Hplc Method for Simultaneous Determination of Captopril, Indapamide, and Their Related Compounds, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37 (2014) 696–712. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.758138>.
- [58] B.G. Santos, J.M. Gonçalves, D.P. Rocha, G.S. Higino, T.P. Yadav, J.J. Pedrotti, P.M. Ajayan, L. Angnes, Electrochemical sensor for isoniazid detection by using a WS₂/CNTs nanocomposite, *Sensors and Actuators Reports*. 4 (2022) 100073. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100073>.
- [59] C.A.R. Salamanca-Neto, F.A. Yoshida, E.R. Sartori, J.T. Moraes, Boron-doped diamond electrode: a modification-free platform for sensitive square-wave voltammetric determination of indapamide hydrochloride, *Anal. Methods*. 10 (2018) 3347–3352. <https://doi.org/10.1039/C8AY01288A>.
- [60] Rapid Determination of Indapamide in Pharmaceuticals and Human Urine Using Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetric Technique, (n.d.). <https://platform.almanhal.com/Details/Articles/85729?lang=en> (accessed April 1, 2023).
- [61] A. Radi, Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of indapamide as copper complex at a hanging mercury drop electrode, *Chemia Analityczna*. (2003) 273–281. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-article-BPP1-0037-0011> (accessed April 1, 2023).

- [62] A. Radi, Stripping voltammetric determination of indapamide in serum at castor oil-based carbon paste electrodes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 24 (2001) 413–419. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00457-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00457-X).
- [63] L.F. Mendes, A. de Siervo, W. Reis de Araujo, T.R. Longo Cesar Paixão, Reagentless fabrication of a porous graphene-like electrochemical device from phenolic paper using laser-scribing, *Carbon*. 159 (2020) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.12.016>.
- [64] D.P. Rocha, V.N. Ataide, A. de Siervo, J.M. Gonçalves, R.A.A. Muñoz, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, Reagentless and sub-minute laser-scribing treatment to produce enhanced disposable electrochemical sensors via additive manufacture, *Chemical Engineering Journal*. 425 (2021) 130594. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130594>.
- [65] S. Kaneko, Y. Shimizu, T. Rachi, C. Kato, S. Tanaka, Y. Naganuma, T. Katakura, K. Satoh, M. Ushiyama, S. Konuma, Y. Itou, H. Takikawa, G. Tan, A. Matsuda, M. Yoshimoto, Multigraphene growth on lead-pencil drawn silver halide print paper irradiated by scanning femtosecond laser, *Jpn. J. Appl. Phys.* 55 (2015) 01AE24. <https://doi.org/10.7567/JJAP.55.01AE24>.
- [66] V. N. Ataide, W. A. Ameku, R. P. Bacil, L. Angnes, W.R. de Araujo, T.R.L. C. Paixão, Enhanced performance of pencil-drawn paper-based electrodes by laser-scribing treatment, *RSC Advances*. 11 (2021) 1644–1653. <https://doi.org/10.1039/D0RA08874A>.
- [67] L.F. Mendes, A. de Siervo, W. Reis de Araujo, T.R. Longo Cesar Paixão, Reagentless fabrication of a porous graphene-like electrochemical device from phenolic paper using laser-scribing, *Carbon*. 159 (2020) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.12.016>.
- [68] A.F. Alba, J. Totoricaguena-Gorriño, M.B. Sánchez-Ilárduya, L. Ruiz-Rubio, J.L. Vilas-Vilela, S. Lanceros-Méndez, F.J. del Campo, Laser-activated screen-printed carbon electrodes for enhanced dopamine determination in the presence of ascorbic and uric acid, *Electrochimica Acta*. 399 (2021) 139374. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139374>.
- [69] D.P. Rocha, V.N. Ataide, A. de Siervo, J.M. Gonçalves, R.A.A. Muñoz, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, Reagentless and sub-minute laser-scribing treatment to produce enhanced disposable electrochemical sensors via additive manufacture, *Chemical Engineering Journal*. 425 (2021) 130594. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130594>.
- [70] S. Ayaz, A. Üzer, Y. Dilgin, R. Apak, A novel flow injection amperometric method for sensitive determination of total antioxidant capacity at cupric-neocuproine complex modified MWCNT glassy carbon electrode, *Microchim Acta*. 189 (2022) 167. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05271-z>.
- [71] T.P. Lisboa, W.B.V. de Oliveira, C.C. de Souza, R.S. Oliveira, M.A.C. Matos, R.C. Matos, Development of a 3D disposable device for the electrochemical determination of diclofenac in different matrices, *Anal Bioanal Chem*. 415 (2023) 357–366. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04414-8>.
- [72] M.J. Legorburu, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, Electrochemical oxidation of the diuretic indapamide, *Electroanalysis*. 8 (1996) 280–284. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080314>.
- [73] A. Abdel Rahim, A. Gaber, S. Ahmed, Rapid Determination of Indapamide in Pharmaceuticals and Human Urine Using Square-Wave Adsorptive Stripping

- Voltammetric Technique, *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8 (2015) 105–118. <https://doi.org/10.12816/0025735>.
- [74] R.P. Bacil, E.A. de O. Marcondes Filho, K. de A. Dias, M.C. Portes, W.R. de Araujo, D. Oliveira-Silva, A.A. dos Santos, S.H.P. Serrano, The chemical interaction between the neurotransmitter dopamine and the antipsychotic drugs olanzapine and quetiapine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 881 (2021) 114946. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114946>.
- [75] R.P. Bacil, P.H.M. Garcia, S.H.P. Serrano, New insights on the electrochemical mechanism of epinephrine on glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 908 (2022) 116111. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116111>.
- [76] R.P. Bacil, R.M. Buoro, R.P. Da-Silva, D.B. Medinas, A.W. Lima, S.H. Serrano, Mechanism of Electro-Oxidation of Metamizole Using Cyclic Voltammetry at a Glassy Carbon Electrode, *ECS Trans*. 43 (2012) 251. <https://doi.org/10.1149/1.4704966>.
- [77] T. Gomes, B. Gomes, J. Martins, L. Angnes, Amperometric detection of indapamide on glassy carbon electrode, *Electroanalysis*. n/a (n.d.) e202200441. <https://doi.org/10.1002/elan.202200441>.
- [78] D. Li, C. Batchelor-McAuley, L. Chen, R.G. Compton, Electrocatalysis via Intrinsic Surface Quinones Mediating Electron Transfer to and from Carbon Electrodes, *J. Phys. Chem. Lett.* 11 (2020) 1497–1501. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b03638>.
- [79] D. Li, C. Lin, C. Batchelor-McAuley, L. Chen, R.G. Compton, Tafel analysis in practice, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 826 (2018) 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.08.018>.
- [80] M. Negahdary, W.A. Ameku, B.G. Santos, I. dos Santos Lima, T.G. de Oliveira, M.C. França, L. Angnes, Recent electrochemical sensors and biosensors for toxic agents based on screen-printed electrodes equipped with nanomaterials, *Microchemical Journal*. (2022) 108281.
- [81] M. Negahdary, N.F. Barros Azeredo, B.G. Santos, T.G. de Oliveira, R.S. de Oliveira Lins, I. dos Santos Lima, L. Angnes, Electrochemical Nanomaterial-based Sensors/Biosensors for Drug Monitoring, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 23 (2023) 295–315. <https://doi.org/10.2174/1568026623666221014154915>.
- [82] W.A. Ameku, M. Negahdary, I.S. Lima, B.G. Santos, T.G. Oliveira, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, Laser-Scribed Graphene-Based Electrochemical Sensors: A Review, *Chemosensors*. 10 (2022) 505. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10120505>.

APÊNDICE 1

Súmula Curricular:

Dados pessoais

Nome: Thawan Gomes de Oliveira

Data de Nascimento: 16 de novembro de 1997

Naturalidade: Brasil, São Paulo-SP

Educação

Técnico Profissionalizante: Técnico em Química pelo Instituto Técnico de Barueri (ITB), 2012-2014.

Ensino superior: Bacharelado em Química pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), 2017-2021.

Pós-graduação: Mestrando em Química Analítica pelo (IQ-USP), 2021-2023.

Monitorias

Estágio Supervisionado em Docência

Ao longo deste mestrado foram realizadas atividades de ensino na condição de monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) do IQ-USP.

Durante o primeiro semestre de 2022, o aluno participou do estágio supervisionado de docência como monitor da disciplina QFL0241 (Química Analítica Instrumental) oferecida ao curso de Farmácia (noturno e diurno).

Durante o segundo semestre de 2022, o aluno participou do estágio supervisionado de docência como monitor da disciplina QFL1212 (Química analítica II) oferecida ao curso de química noturno.

Trabalhos apresentados em congresso:

- 1- **T.G. Oliveira**, I.S. Lima, W.A. Ameku, J.M. Gonçalves, L. Angnes. *Laser-Scribed pencil lead electrode fabrication and their application in flow injection analysis (FIA)*. Livro de resumos da 46° Reunião Annual da SBQ, Águas de Lindóia, 2023.
- 2- **T.G.Oliveira**, B.G.Santos, J.M. Gonçalves, L. Angnes. *Amperometric detection of indapamide on glassy carbon electrode*. Livro de resumos da 46° Reunião Annual da SBQ, Águas de Lindóia, 2023.

Artigos Científicos:

- 1- **T.G. Oliveira**, B.G. Santos, J.M. Gonçalves, L. Angnes. *Electroanalysis*. 3 (2023)
- 2- M. Negahdary, W.A. Ameku, B.G. Santos, I. dos Santos Lima, **T.G. de Oliveira**, M.C. França, L. Angnes, *Microchemical Journal* (2022) 108281
- 3- M. Negahdary, N.F. Barros Azeredo, B.G. Santos, **T.G. de Oliveira**, R.S. de Oliveira Lins, I. dos Santos Lima, L. Angnes, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 23 (2023) 295–315
- 4- W.A. Ameku, M. Negahdary, I.S. Lima, B.G. Santos, **T.G. Oliveira**, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, *Chemosensors*, 10 (2022) 505
- 5- V.N. Ataide, L.A. Pradela-Filho, W.A. Ameku, M.N. Negahdary, **T.G. Oliveira**, B.G. Santos, T.R.L.C. Paixão, L. Angnes, *Microchimica Acta*, 190 (2023) 190-276.

6- W.B. Veloso, R.P. Bacil, R.M. Buoro, I.G.R. Gutz, T.R.L.C. Paixão, C.L. Lago, S.K. Sakata, W.A. Ameku, M.C. França, **T.G. Oliveira**, G.N. Meloni, M. Durazzo, L. Angnes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 393 (2023) 134130.

Coorientação de alunos de iniciação científica:

No decorrer do mestrado tive o prazer em ajudar na orientação de dois alunos de graduação:

- Rodrigo Santos Souza (Aluno do último semestre de Engenharia Química – Oswaldo Cruz). Período: 6 meses

Projeto: Estudo do comportamento eletroquímico da Finasterida para aplicação no tratamento de Alopecia androgenética (AAG)

- Mayara Orneles (Aluna do 3º ano de Química – IQUSP). Período: 6 meses

Projeto: Estudo do comportamento eletroquímico da Finasterida para aplicação no tratamento de Alopecia androgenética (AAG) – (continuação).