

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITARIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Ana Isa Pérez Cordovés

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS PARA
O RECONHECIMENTO DE FÁRMACO ENANTIOMÉRICO
(CLORIDRATO DE SOTALOL)**

Rio de Janeiro

2017

Ana Isa Pérez Cordovés

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS PARA
O RECONHECIMENTO DE FÁRMACO ENANTIOMÉRICO
(CLORIDRATO DE SOTALOL)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Josino Costa Moreira
Katia Christina Leandro

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pérez Cordovés, Ana Isa

Desenvolvimento e avaliação de sensores voltamétricos para o reconhecimento de fármaco enantiomérico (cloridrato de sotalol) / Ana Isa Pérez Cordovés. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

116 f. : il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.

Orientadores: Josino Costa Moreira, Katia Christina Leandro

1. Enantiopatia. 2. Nanopartículas. 3. Sotalol. 4. Controle de Qualidade. I.
Titulo

Development and evaluation of voltammetric sensors for the recognition of
enantiomeric drug (sotalol hydrochloride)

Ana Isa Pérez Cordovés

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS PARA
O RECONHECIMENTO DE FÁRMACO ENANTIOMÉRICO
(CLORIDRATO DE SOTALOL)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Armi Wanderley da Nobrega (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Priscila Tamiasso Martinhon (Doutora)
Universidade Federal de Rio de Janeiro

Eliane Monsores Miguel (Doutora)
Consórcio CEDERJ – Universidade a Distância

Josino Costa Moreira (Doutor) – Orientador
Escola Nacional de Saúde Pública

Katia Christina Leandro (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A mima

A Dany y Diana

AGRADECIMENTOS

Este momento é muito especial e importante, porque um trabalho científico não é fruto de uma pessoa só e agradecer mais que tudo é um dever.

Tem sido um trabalho de muito tempo e, desculpem aquelas pessoas que mereçam ser incluídas e não estão simplesmente por esquecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, pois que seria de mim sem a fé Nele.

Ao Prof. Percio, quem me ofereceu seu apoio, estendeu a primeira mão profissional no Brasil e confiou sempre em mim.

A meu orientador o Prof. Josino, quem apareceu no momento certo, quando o mundo estava desabando a meus pés.

A meus colegas com quem comecei meu doutorado na PUC. Essa turma espetacular com quem cursei as primeiras matérias, com quem passei dias e noites de estudo, Eles suportaram meus choros, desfrutaram minhas alegrias, e sofreram minha saída da PUC, tanto quanto eu. Não colocarei nomes por temor a esquecer de alguém que deveria estar, a todos eles, muito obrigada.

A meus amigos da turma do INCQS Angelica, Ana Paula, Gilda, Roberto, que formaram parte de esta etapa final de meu doutorado e colaboraram muito comigo.

A Katia além de Coordenadora da pós, amiga e sempre disposta a me ajudar em cada momento. Quem confiou em mim sempre, muito obrigada.

Impossível não agradecer a quem devo os resultados experimentais deste trabalho, os recursos para desenvolver a pesquisa, e além do apoio material todo o apoio emocional, a ela, a professora. Valnise, minha eterna gratidão. Ela soube me passar sua experiência na área da eletroquímica, e o mais difícil, brindar seu tempo que é bem precioso pra ela.

Em geral ao grupo de Eletroquímica do IQ/UNESP, campos de Araraquara, ao Prof. Nelson, a Profa. Hideko a todos os integrantes do grupo, Felipe, Guillermo, Juliano, Elsa, Barbara, Marcos, Juliana, Mariele, a eles minha gratidão.

A meus amigos de Araraquara em geral, cubanos e brasileiros todos, que me acolheram e me apoiaram por 8 meses e ajudaram a ser mais feliz minha estância, a Abel, Paulo, D Dita e Joseani, a Alexander e Daylin, Vivian, Jorge, Michael, Mayte, Celia, a todos eles muito obrigada.

Quisera então, permitiram me, neste momento, agradecer, não só as pessoas que tiveram que ver com a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, mas também a todos aqueles que na minha vida pessoal contribuíram à força espiritual para qualquer das minhas ações. A minha formação como profissional não teria sido concretizada sem o apoio incondicional da minha família.

Seria impossível neste momento não agradecer a ela.....a minha mãe, *mima*, sem quem não teria começado nem acabado nada na vida. Ela foi minha força, meu apoio a cada minuto, quando tudo pareceria não dar certo, quando a duvida se ainda estava no caminho correto tomavam conta de mim, foi ela quem incitava a seguir pra frente, a não deixar o caminho profissional e abandonar meus sonhos. Até seu ultimo momento não permitiu que abandonasse a minha carreira. Por ela estou aqui hoje, por ela sou a pessoa que sou e chegue aonde cheguei.

Minha irmã Silvia, teus conselhos, apoio econômico e moral a cada segundo de minha vida, são até hoje muito importantes. Agradeço pelo teu amor incondicional, tua força, e a tua confiança em mim.

A meus filhos por quem faço tudo e faria de novo. Sua felicidade é quem me faz tomar cada decisão na minha vida, inclusive àquela que me levou a começar meu doutorado.

RESUMO

Existe um número significativo de substâncias farmacologicamente ativas, que apresenta em sua estrutura um carbono assimétrico. Em geral, devido às dificuldades de separar os enantiômeros estes fármacos são comercializados como misturas racêmicas apesar de se conhecer que diferentes enantiômeros podem possuir diferentes atividades farmacológicas, farmacocinéticas e perfis toxicológicos. Atualmente os métodos analíticos mais utilizados para a determinação de fármacos são a CLAE e para a separação dos enantiômeros a CLEA-FEQ. A necessidade de se desenvolver novas alternativas capazes de resolverem, com vantagens, estes problemas, tem despertado o interesse da comunidade científica para a determinação de fármacos opticamente ativos tanto sob a forma de racemato mas principalmente de seus enantiômeros separadamente. Esta demanda resulta de uma necessidade de se conhecer mais aprofundadamente os aspectos cinéticos, dinâmicos e toxicológicos destes fármacos. O **cloridrato de Sotalol** antiarrítmico e beta-bloqueador é um exemplo de uma destas substâncias. Este medicamento é administrado a pacientes sob regime de dose múltipla sob a forma de racemato mas sabe-se que seu isômero R(-) Sotalol. é cerca de 50 vezes mais ativo que o S(+) Sotalol, Neste estudo desenvolveu-se um método para a determinação da mistura racêmica usando a técnica voltamétrica de pulso diferencial tendo como eletrodo de trabalho um eletrodo compósito modificado com nanopartículas magnéticas carboxiladas (GECE). Neste procedimento o sotalol é pré-concentrado na superfície do GECE e determinado em solução tampão de fosfato a pH 7,0. Voltogramas obtidos com o uso deste eletrodo comparados com o eletrodo sem modificação mostraram correntes anódicas pelo menos 5 vezes maiores. O sensor desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas, para determinação de Sotalol que permitiu limite de detecção de $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e uma faixa linear entre $0,2$ e $12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A metodologia desenvolvida foi otimizada e apresentou ótimos resultados em matrizes farmacêuticas (comprimidos comerciais) e biológicas (urina). Numa tentativa de se analisar separadamente os enantiômeros, foi eletrossintetizado um filme de polipirrol sobre um eletrodo de ouro na presença de um ácido quirál (ácido carbosulfóxido). Esta tentativa não produziu bons resultados. No entanto, o GECE desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas, para determinação de Sotalol na suas formas enantioméricas separadas (R,S Sotalol) usando a técnica VDP e previa formação de um complexo de coordenação tetraédrico com Zn(II). Em avaliações preliminares obteve-se limite de detecção e limite de determinação aceitáveis, o que sugere boas perspectivas para esta análise sendo necessário aprofundar os estudos para sua otimização e futura aplicação.

Palavras-chave: Voltametria, nanopartículas, enantiômeros, Sotalol.

ABSTRACT

There are a significant number of pharmacologically active substances which have asymmetric carbon in their structure. In general, due to the difficulties of separating the enantiomers, these drugs are marketed as racemic mixtures although it is known that different enantiomers may have different pharmacological, pharmacokinetics and toxicological activities. Currently the most widely used analytical methods for the determination of drugs are the HPLC and for the separation of the enantiomers to HPLC. The need to develop new alternatives capable of solving these problems with advantages, has aroused the interest of the scientific community for the determination of optically active drugs both in the form of the racemate but mainly of its enantiomers separately. This demand results from a need to know more in depth the kinetic, dynamic and toxicological aspects of these drugs. Antiarrhythmic and beta-blocking Sotalol hydrochloride is an example of one of these substances. This medicinal product is administered to patients on a multiple dose regimen in the form of a racemate but it is known that its isomer R(-) Sotalol is about 50 times more active than S(+) Sotalol. In this study a method was developed for the determination of the racemic mixture using the differential pulse voltammetric technique having as working electrode a composite electrode modified with carboxylated magnetic nanoparticles (GECE). In this procedure the sotalol is preconcentrated on the surface of the GECE and determined in phosphate buffer solution at pH 7.0. Voltammograms obtained with the use of this electrode compared to the electrode without modification showed anodic currents at least 5 times higher. The developed sensor presented sensitive, stable and selective responses for the determination of Sotalol, which allowed a detection limit of $1.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and a linear range between 0.2 and $12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The developed methodology was optimized and presented excellent results in pharmaceutical matrices (commercial tablets) and biological (urine) matrices. In an attempt to analyze the enantiomers separately, a polypyrrole film was electro-synthesized on a gold electrode in the presence of a chiral acid (carbosulfoxide acid). This attempt did not produce good results. However, the developed GECE presented sensitive, stable and selective responses for the determination of Sotalol in its separate enantiomeric forms (R, S Sotalol) using the VDP technique and after formation of a tetrahedral coordination complex with Zn (II). Preliminary evaluations obtained an acceptable limit detection and limit of determination, which suggests good prospects for this analysis and it is necessary to deepen the studies for its optimization and future application.

Key words: Voltammetry, nanoparticles, enantiomers, Sotalol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estrutura química dos isômeros óticos do sotalol [R(-) e S(+)-(N-[4-[1-hidroxi 2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]-metasulfonamida)]......	21
Figura 2	Desenho de célula com 3 eletrodos. (Versão extraída de Pacheco, W. F. et al.. 2013) (A) Eletrodo de referencia, (B) Eletrodo de trabalho(C)Contraeletrodo.....	30
Figura 3	Tipos de voltametrias em função da forma de aplicação do potencial.....	32
Figura 4	Produção bibliográfica relacionada com o uso de sensores eletroquímicos para análise de fármacos.....	34
Figura 5	Número de artigos relacionados com a utilização de nanoparticulas como sensores na eletroquímica.....	37
Figura 6	Estrutura molecular dos polímeros condutores mais empregados em sensores quirais;polipirrol(PPy),politiofeno(PTh) e polianilina(PANI)..	44
Figura 7	Exemplos da literatura de reconhecimento quiral através da formação de complexos com zinco.....	47
Figura 8	Esquema de extração do Sotalol em comprimidos comerciais.....	55
Figura 9	Cromatograma CLAE- DAD obtido para 1mg ml ⁻¹ de (A) Sotalol padrão e (B) Sotalol extraído de comprimidos comerciais usando sistema de cartuchos LiChroprep RP18.....	56
Figura 10	Sensor eletroquímico formado pelo eletrodo composto (GEC)/nanopartícula modificada.....	57
Figura 11	Resumo do procedimento de síntese da malha polimérica sobre a superfície do eletrodo de ouro.....	60
Figura 12	Eletrodo de ouro A) sim modificar B) modificado.....	61
Figura 13	Imagens de microscopias eletrônica de transmissão (TEM) obtidas para: (A) nanopartícula magnéticas modificadas com carboxilatos e (B) nanopartícula com o fármaco.....	64
Figura 14	Espectro de FTIR do cloridrato de sotalol (a) nanopartícula magnética (c) e nanopartícula em contato com sotalol (b).....	65

Figura 15	Difratograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética de Fe_2O_3	66
Figura 16	Voltamograma cíclico obtido para solução tampão fosfato (pH7) sobre eletrodo de Compósito (ECE), a velocidade de varredura (v) = 50mV s^{-1} a) sim solução do Sotalol b) solução de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Sotalol.....	67
Figura 17	Voltamograma cíclico para $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de fármaco em solução tampão fosfato 0.10 mol L^{-1} (pH 7) velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} . a) sobre eletrodo compósito (ECE) antes b) e após modificação com nanopartículas magnéticas carboxiladas(MNPs).....	68
Figura 18	A) Voltamogramas cíclicos de oxidação do fármaco Sotalol em solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e, solução tampão fosfato (pH 7).registrados sobre os eletrodos compósitos em diferentes velocidades de varredura do potencial entre $E_i = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = 1,2 \text{ V}$. B) Voltamogramas cíclicos obtidos entre os potenciais. $E_i = 0,3 \text{ V}$ $E_f = 0,9 \text{ V}$	69
Figura 19	Relação entre as correntes de pico e $v^{1/2}$ medidas para o primeiro e o segundo picos e respectivas equações. A – relações obtidas para o primeiro pico $E_1(\text{V}) = 2,2075 (v^{1/2}) - 6,4636$. B - Relações obtidas para o segundo pico $E_2(\text{V}) = 2,2793 (v^{1/2}) - 7,786$	70
Figura 20	Comparação entre os comportamentos reportados na Figura 19.....	70
Figura 21	Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação do fármaco Sotalol sobre o eletrodo de carbono vitreo para $0,05 \text{ V s}^{-1}$ numa solução tampão Briton Robinson entre os pH 2-12 a) pH 12,0; b) pH 10,0; c) pH 8,0; d) pH 7,0; e) pH 6,0; f) pH 4,0 e g) pH 2,0.....	71
Figura 22	Espectro de massas obtidos para amostras-padrão de Sotalol.....	72
Figura 23	Espectros de massas obtidos para amostras-padrão de Sotalol pré-oxidadas a potencial de (A) $0,85 \text{ V}$ e (B) $1,0\text{V}$	73
Figura 24	Voltamogramas ciclicos obtidos para solução $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Sotalol em: (A) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ da solução de tampão fosfato (pH 7) e (B) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ da solução tampão B-R . Velocidade de varredura (v) de 20 mVs^{-1}	75

Figura 25	Relação entre a corrente de pico e $v^{1/2}$ e voltamogramas cíclicos para $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.....	76
Figura 26	Voltamogramas cíclicos de uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl para os eletrodos a) eletrodo de carbono vítreo, b) eletrodo GCE e c) eletrodo GCE/MNPs.....	77
Figura 27	Voltamogramas cíclicos (a) e em pulso diferencial (b) de uma solução $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de Sotalol em 0.1 molL^{-1} de solução tampão fosfato (pH 7.0.	78
Figura 28	Voltamograma de pulso diferencial registrado para $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de concentração de Sotalol em $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de solução-tampão fosfato (pH 7.0) e concentrações de a) 2×10^{-4} b) 3×10^{-4} c) 4×10^{-4} d) 5×10^{-4} mg de nanoparticulas sob as condições otimizadas e já descritas.....	80
Figura 29	Perfil dos voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o sensor nas condições eletroquímicas: $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ m V}$ e <i>velocidade de varredura</i> = 50 mVs^{-1} . a) $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, c) $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, d) $6,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e) $8,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, f) $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	81
Figura 30	Curva analítica obtida a partir dos dados apresentados na Fig. 29. Barra de erros correspondente a triplicatas das análises.....	81
Figura 31	A) Perfis voltamétricos em diferencial de VDP dos resultados obtidos com o sensor desenvolvido na faixa de concentrações compreendida entre 25×10^{-5} e $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. B) curva analítica correspondente aos voltamogramas mostrado em (A) sob as condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3 \text{ V}$; $E_f = 1,2$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ m V}$ e $SR = 50 \text{ mVs}^{-1}$	82
Figura 32	A) Voltamogramas obtidos para amostras de água contaminadas propositalmente com 1.96 mol.L^{-1} do Sotalol e submetidas a adição de padrão B) Curva de adição de padrão e recuperação do padrão.....	83

Figura 33	Curva de adição de padrão e curvas voltamétricas obtidas em VDP com o sensor desenvolvido para as amostras do fármaco, nas condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3$ V; $E_f = 1,2$; $f = 50$ s ⁻¹ , $a = 70$ m V e $SR = 50$ mVs ⁻¹ . (n=3).....	85
Figura 34	Curva de adição de padrão e voltamogramas obtidos em VDP para as amostras de urina, nas condições de análise propostas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3$ V; $E_f = 1,2$; $f = 50$ s ⁻¹ , $a = 70$ m V e $SR = 50$ mVs ⁻¹ . (n=3).....	87
Figura 35	Resposta voltamétrica do sistema pirrol/H ₂ SO ₄ e do sistema pirrol/CSA, na presença de uma solução de Fe(CN) ₆ ^{3/4} 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ...	89
Figura 36	Voltamogramas obtidos em diferentes velocidade de varredura para a) sistema pirrol/H ₂ SO ₄ e b) sistema pirrol/CSA, solução de Fe(CN) ₆ ^{3/4} 10 ⁻³ mol.L ⁻¹	91
Figura 37	Gráficos de ΔE vs velocidade de varredura (v), (I Fe 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , II Fe 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) a) sistema pirrol/H ₂ SO ₄ e b) sistema pirrol/CSA.....	93
Figura 38	Gráficos de I_{pa}/I_{pc} versus velocidade de varredura, elétrodo modificado pirrol/H ₂ SO ₄ , (I [Fe] 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , II [Fe]10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	94
Figura 39	de I_{pa}/I_{pc} v versus a velocidade de varredura, eletrodo modificado pirrol/CSA (I [Fe]10 ⁻³ mol L ⁻¹ II [Fe] 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹).....	94
Figura 40	Espectro UV – Visível dos complexos de Zn (II) com a mistura racêmica (-), Zn(II) com o R(-) Sotalol (-) e do Zn(II) com S(+) Sotalol (-).....	95
Figura 41	Espectros de dicroísmo circular dos complexos formados com a mistura (azul), com R(-) Sotalol (preto, e com S(+) Sotalol (vermelho).B – Espectros de dicroísmo circular das interações entre os complexos R e S e as nanopartículas utilizadas para modificação do eletrodo proposto.....	96
Figura 42	Espectro de FTIR da, nanoparticula magnética (a) nanoparticula em contato com Zn (b) e nanoparticula em contato com Zn /Sotalol (c)...	97
Figura 43	Espectro RMN/HMBC de sotalol (A) e sotalol em contato com a solução de zinco(B).....	98
Figura 44	Espectro RMN protônica de Sotalol (azul) e R (-) Sotalol/Zn em contato com a solução de zinco(B).....	98

Figura 45	Voltamograma de pulso diferencial obtido para solução de Sotalol $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, / Zn (II) em tampão fosfato (pH 7) sobre o eletrodo de carbono epóxi modificado. A velocidade de varredura (v)= 50 mV s^{-1} (A) na faixa de potencial 0,3-1,2 V (B) na faixa de potencial -1,4 - 0 V para a) solução de Zn(II) em contato com Sotalol b) solução de Zn(II).....	100
Figura 46	Voltamogramas cíclicos da oxidação do sotalol (solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em contato prévio com solução de Zn (II) da mesma concentração em solução tampão fosfato (pH 7), registrados sobre o eletrodo compósito em diferentes velocidades de varredura do potencial, entre os potenciais $E_i = 0,3 \text{ V}$ $E_f = 1,2 \text{ V}$	101
Figura 47	Dependência da corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (A) e do potencial com a velocidade de varredura (B).....	102
Figura 48	Voltamogramas do complexo de Sotalol-Zn em tampão fosfato e $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ m V}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ obtidos com diferentes tempos de reação.....	104
Figura 49	Voltamogramas obtidos a partir de uma solução de Zn^{+2} ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) após a adição de concentrações crescentes de Sotalol. Condições voltamétricas otimizadas.....	105
Figura 50	Voltamogramas em pulso diferencial de solução-tampão de fosfato (PBS); de solução de mistura racêmica de sotalol (-), de R(-) Sotalol (-) e de S(+) Sotalol (-) obtidos com o eletrodo de carbono epóxi GEC (-) e com eletrodo de carbono epóxi modificado com a nanopartícula GEC/nano (--). Condições voltamétricas: $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ m V}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$	106
Figura 51	Voltamogramas dos complexos de Zn-sotalol em tampão fosfato de pH = 7,0 de a) solução $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn (II), b) Zn (II) - mistura racêmica de sotalol, c) Zn(II) e R(-) Sotalol, d) Zn (II) e S(+) Sotalol. Nas condições; $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ m V}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$	107
Figura 52	Estruturas prováveis dos complexos dos enantiômeros do sotalol com o Zn (II).....	107

Figura 53 Perfil voltamétrico em pulso diferencial do sensor enantioselectivo e as respectivas curvas de calibração dos dois enantiômeros do sotalol após complexação com íons Zn, nas condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = -1,4 \text{ V}$; $E_f = 0$; $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ m V}$ e $SR = 50 \text{ mVs}^{-1}$. Na faixa de concentrações ($25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)..... 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas propriedades físico químicas do Sotalol e de seu cloridrato.....	42
Tabela 2	Parâmetros da voltametria de pulso diferencial avaliados e melhor definição para a oxidação de sotalol em solução tampão de fosfato (pH7).....	79
Tabela 3	Comparação do sensor proposto com outros sensores reportados na literatura.....	84
Tabela 4	Resultados obtidos na análise de formulações farmacêuticas através do sensor eletroquímico desenvolvido e aqueles obtidos por CLAE.....	85
Tabela 5	Resultados obtidos na análise de urina humana através do sensor eletroquímico desenvolvido e aqueles obtidos por CLAE.....	87
Tabela 6	Área efetiva dos eletrodos de ouro antes e após a polimerização.....	89
Tabela 7	Resultados da aplicação da equação Randles-Sevcik ao estudo da influência da velocidade de varredura na corrente do pico catódico. ($\log i_p = \log k + m \log v$).....	91
Tabela 8	Resultado da aplicação da equação Randles-Sevcik ao estudo da influência da velocidade de varredura na corrente do pico anódico. ($\log i_p = \log k + m \log v$).....	92
Tabela 9	Parâmetros da voltametria de pulso diferencial correspondente a oxidação do complexo de zinco com Sotalol em tampão fosfato pH 7,0.....	103

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Processo de oxiredução.....	27
Equação 2	Relação corrente /Potencial.....	29
Equação 3	Equação de Anson.....	62
Equação 4	Equação da determinação da Área.....	62
Equação 5	Equação de protonação (I, II, III).....	73
Equação 6	Equação de Randles – Sevcik.....	75
Equação 7	Equação da corrente de pico.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Cronocoulometria
CD	Dicroísmo Circular
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CLAE-MS	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplada a Massas
CSA	Ácido Canforsulfônico
E	Potencial
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
EQM	Eletrodo Químico Modificado
FTIR	Microscopia InfraVermelho com transformada de Fourier
GC-MS	Cromatographia a Gases acoplado a Massas
GECE	Eletrodo Compósito de Grafite Epoxi
GECE/MNPs	Eletrodo Compósito de Grafite Epoxi modificado com Nanoparticula
LC-MS	Cromatographia Líquida acoplada a Massas
L-Mtx	L- Methotrexate
MIP	Polímero Molecularmente Impresso
MNPs	Nanoparticulas Magnéticas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANI	Polianilina
PPy	Polipirrol
Pth	Politiofeno
PhACs	Substâncias Farmacologicamente Ativas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmitância
UV-Vis	Ultravioleta Visível
VC	Voltametria Cíclica
VDP	Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	20
2.JUSTIFICATIVA.....	23
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 VIGILANCIA SANITARIA E LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	.24
3.2 QUIRALIDADE NA FARMACOLOGIA.....	25
3.3 ELETROQUIMICA.E ELETROANALITICA.....	27
3.4 VOLTAMETRIA. BREVE HISTÓRIA E FUNDAMENTOS.....	29
3.5 SENSORES ELETROQUÍMICOS NA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS.....	32
3.6 ELETRODOS COMPOSITO DE GRAFITE EPÓXI MAGNETICO (GECE).....	35
3.7 NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS (MNPs).....	35
3.8 FÁRMACOS β -BLOQUEADORES. SOTALOL.....	39
3.9 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE SOTALOL.ENANTIOSELETIVIDADE	42
3.10 BIODEGRADABILIDADE DE FÁRMACOS.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA.....	49
4.2. EQUIPAMENTO.....	49
4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	52
4.4 PROCEDIMENTOS.....	53
4.4.1 Construção do eletrodo magnético compósito (GECE).....	53
4.4.2. Síntese e modificação de nanoparticulas magnéticas (MNPs) com grupos carboxilatos.....	54
4.4.3. Procedimento de otimização para extração do sotalol de comprimidos.....	54
4.4.4. Construção do sensor para a determinação de sotalol	56
4.4.5. Análise de sotalol em amostras farmacêuticas comerciais.....	57

4.4.6. Determinação de sotalol (mistura racêmica) em amostras de urina.....	58
4.4.7. Tentativa de construção do sensor para sotalol enantioseletivamente. Modificação do eletrodo de ouro	59
4.4.8 Construção de um sensor para a determinação de Sotalol enantioseletivamente via formação de complexo.	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS COM GRUPOS CARBOXILATOS.....	64
5. 2 OXIDAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE CLORIDRATO DE SOTALOL.....	66
5.3 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE POTENCIAL (U).....	68
5.4 E STUDO DO PH.	70
5. 5 EFEITO DE ELETRÓLITO SUPORTE.....	74
5.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ELETRODO	75
5.7. OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SENSOR.....	77
5.7.1 Ajuste das condições instrumentais.....	78
5.7.2. Efeito da concentração da nanopartícula magnética (MNPs).....	79
5 .8 QUANTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL	80
5.9 APLICAÇÃO DO SENSOR NA ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS ..	84
5.10 APLICAÇÃO DA METODOLOGÍA PROPOSTA NA ANÁLISE DE SOTALOL EM URINA HUMANA.....	86
5.11 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELECTRODO DE OURO, PARA A DETERMINAÇÃO ENANTIOMERICA DE SOTALOL.....	87
5.12 DETERMINAÇÃO ENANTIOSELETIVA DE SOTALOL COM O ELETRODO DESENVOLVIDO	95
5. 12.1 Caracterização Físico-Química do complexo	95
5. 12. 2 Oxidação voltamétrica enantioseletiva de cloridrato de sotalol pela formação de complexos com zinco	98
5.12.3 Estudo da velocidade de varredura.....	100
5.12.4 Otimização da resposta do sensor.....	103

5. CONCLUSÕES.....	110
RECOMENDAÇÃO.....	110
REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Atualmente sabe-se que uma grande parcela das substâncias farmacologicamente ativas apresenta isômeros óticos. No entanto as formas comerciais dessas substâncias geralmente as contém sob a forma de racematos e apenas com o desenvolvimento da ciência foi possível reconhecer que os enantiômeros apresentam atividades óticas distintas, bem como atividades biológicas diferenciadas. O desconhecimento do isomerismo nas moléculas levou à ocorrência de consequências graves para a saúde. Apesar de que atualmente os riscos de se usar estas espécies são amplamente conhecidos, ainda são comercializados fármacos sob a forma de racematos. Isto ocorre, pois a síntese enantioseletiva da maioria das moléculas apresenta altos custos e dificuldades práticas para produzir enantiômeros puros, pois requer técnicas de separação e determinação quiral específica, muitas vezes difíceis de serem encontradas.

Dentre as várias técnicas encontradas na atualidade para determinação de enantiômeros novas metodologias baseadas no uso de sensores eletroquímicos, têm sido descritas. Estas podem oferecer a seletividade e a sensibilidade necessárias para abordagens analíticas de fármacos e seus metabólitos em amostras complexas, de modo mais simplificado. Usualmente estas metodologias se caracterizam por apresentarem limites de detecção comparáveis com procedimentos mais elaborados e emprego de instrumentação complexa e de alto custo tais como a cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas. Além disso, podem responder a demandas analíticas crescentes oferecendo dispositivos confiáveis e de baixo custo para análises de enantiômeros de forma rápida. Neste contexto, seria altamente relevante buscar novos métodos analíticos aptos para a detecção de enantiômeros, bem como a detecção de sua forma racêmica em amostras complexas.

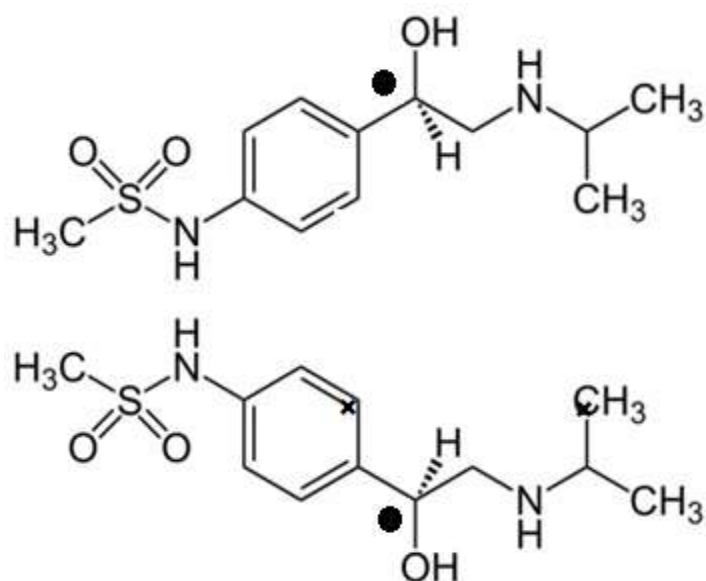
Objetivo

Síntese e desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas magnéticas modificadas com grupos carboxílicos, empregando

técnicas voltamétricas com o intuito de desenvolver métodos eletroanalíticos alternativos, versáteis, rápidos e econômicos para quantificar o fármaco cloridrato de sotalol em sua forma racêmica, bem como de seus enantiômeros simultaneamente.

Para isto pretende-se utilizar o cloridrato de sotalol, um β -bloqueador amplamente usado no tratamento de doenças cardiovasculares, como composto modelo comercializado em mistura racêmica. Esta substância possui enantiômeros com efeitos farmacológicos diferentes, cujas estruturas químicas são mostradas na figura 1. Após desenvolvimento e otimização do método pretende-se investigar sua aplicação na determinação do fármaco e suas formas enantioméricas em formulações farmacêuticas comerciais, em fluidos biológicos tal como urina humana em amostras biológicas e águas superficiais e residuais.

Figura 1 Representação das estruturas químicas dos isômeros óticos do sotalol [R(-) e S(+)-(N-[4-[1-hidroxi 2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]-metasulfonamida)] com a marcação do átomo de carbono assimétrico.



Para isto pretende-se cumprir os seguintes objetivos específicos

Objetivos específicos:

- Separar as formas enantioméricas do cloridrato de sotalol por cromatografia líquida, uma vez que as formas enantioméricas isoladas não são comercializadas.

- Modificar eletrodos compósitos a base de carbono/epóxi com nanopartículas magnéticas carboxiladas;
- Testar a pré-concentração e detecção de cloridrato de sotalol na sua forma de racemato na superfície do eletrodo construído;
- Desenvolver uma metodologia eletroanalítica com o eletrodo proposto para a determinação de cloridrato de sotalol, em diferentes amostras farmacêuticas e biológicas na sua forma de racemato;
- Construir e caracterizar o sensor eletroquímico à base de materiais nanoparticulados e complexo organometálico (complexação com zinco) para a determinação do cloridrato de sotalol nas suas duas formas enantioméricas.
- Aplicar a metodologia eletroanalítica, para a determinação individual das formas enantioméricas de cloridrato de sotalol, em diferentes amostras farmacêuticas e biológicas.

2. JUSTIFICATIVA

Fármacos quirais ainda são comercializados sob a forma de racemato, mesmo sendo conhecidas diferenças nas atividades farmacocinéticas, farmacológicas e perfis toxicológicos dos seus enantiômeros, pois usualmente a separação destas formas envolve alto custo e dificuldade prática.

Atualmente poucos fármacos quirais possuem estudos envolvendo a avaliação da eficácia, de efeitos tóxicos e a influência de diversos parâmetros sobre seus enantiômeros isoladamente, bem como métodos de determinação destes isômeros ativos em fluidos biológicos e outras matrizes.

A determinação de seus resíduos em águas é importante, pois muitos fármacos biologicamente ativos são encontrados em águas residuais e de superfície como resultado da excreção humana e veterinária e da eliminação incompleta dos fármacos das estações de tratamento de águas. Vários estudos reportam a ocorrência de inúmeros destes compostos no ambiente aquático o que tem sido reconhecido como uma das questões emergentes em química ambiental e na vigilância sanitária (Maurer, et al., 2007)

O presente trabalho justifica-se por buscar metodologias alternativas baseadas em métodos eletroanalíticos com alta versatilidade, rapidez, baixo custo e possibilidade de portabilidade para análise de cloridrato de sotalol em diferentes matrizes. Para isto propõe-se o uso de eletrodos compósitos modificados por nanopartículas magnéticas carboxiladas para pré-concentrar especificamente o fármaco por interações magnéticas ampliando sua detetabilidade e aplicação em amostras complexas como urina humana, formulações e amostras de água. Além disto, pretende-se explorar a versatilidade da técnica empregando a formação de complexos de Sotalol com zinco, com vistas a determinação das formas enantioméricas de cloridrato de sotalol.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão apresentados alguns conceitos relevantes sobre o papel da vigilância sanitária no controle dos medicamentos, algumas noções básicas de eletroquímica, e o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, bem como algumas informações sobre os eletrodos utilizados neste trabalho. Descreve-se também neste capítulo aspectos relacionados com os fármacos de interesse, especificamente os betabloqueadores.

3.1 VIGILÂNCIAS SANITÁRIAS E A LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS

Medicamento se define como produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, conforme a Lei 5991/73, que dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, em seu Art. 4°. No entanto, um medicamento é muito mais que um produto farmacêutico; ele deve ser compreendido dentro do contexto histórico, socioeconômico e cultural no qual está inserido e que condiciona a sua utilização. Por serem tão largamente consumidos, e considerando-se que o seu uso inadequado ou incorreto pode acarretar até mesmo a morte - uma vez que estes produtos têm atividade farmacológica, toxicidade e efeitos colaterais - é fundamental garantir a sua qualidade, eficácia e segurança. assim como também o desenvolvimento de metodologias eficazes para seu controle em qualquer matriz (Reis de Souza, 2002).

A vigilância de produtos é uma das quatro grandes áreas de abrangência da vigilância sanitária (as demais são a vigilância sanitária de serviços de interesse à saúde, do meio ambiente e de processos de trabalho). A *Vigilância Sanitária de Medicamentos* envolve apenas uma categoria de produtos sob regime de controle

sanitário, os medicamentos que mesmo assim formam uma categoria muito importante, merecendo toda a nossa atenção e interesse.

No Brasil, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), desde o ano 2003 tem produzido resoluções regulando o desenvolvimento de novos fármacos estereoisoméricos <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/>. De acordo com a resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 135 de 29 de Maio de 2003, http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf, para o registro de medicamentos (genéricos ou não) devem ser enviados dados sobre os teores de estereoisômeros, no caso de fármacos que apresentam quiralidade cuja proporção possa afetar a segurança e eficácia do medicamento e no RDC nº 136, da mesma data, http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf, é regulado que entre as informações técnicas do princípio ativo a serem enviadas, deve se relatar a presença de possíveis enantiômeros. Já no ano 2009, através da RDC nº57, de 18 de Nov. a ANVISA. <http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico-sp-42924454/legislacao/1804-resolucao-rdc-no-57-de-18-de-novembro-de-2009.html>, passou a exigir a caracterização e quantificação de isômeros para o registro de insumos farmacêuticos ativos que possuem quiralidade, criando uma demanda crescente para métodos rápidos, precisos e sensíveis para a determinação da pureza enantiomérica.

Nesse contexto o presente trabalho tenta oferecer dentro da temática de vigilância sanitária um aporte ao controle de medicamentos ofertando uma nova metodologia, com menor custo, e boa sensibilidade, para a determinação de medicamentos quirais de uso comum.

3.2 QUIRALIDADE NA FARMACOLOGIA.

Foi necessário um século para se descobrir que a quiralidade desempenha um papel fundamental não só na vida de plantas e animais, também na indústria farmacêutica, agrícola e química e, conseqüentemente, na vigilância sanitária (Nguyen, et al., 2006)

Na indústria farmacêutica, mais da metade dos fármacos atualmente em uso são produtos quirais, sendo sua grande maioria comercializada na forma de racemato. Todas as proteínas, enzimas, aminoácidos, carboidratos, nucleosídeos e uma série de alcaloides e hormônios são substâncias quirais, o que explica que estamos sob a influência constante da quiralidade durante toda a evolução como resultada da natureza assimétrica do ambiente. A quiralidade dos compostos químicos, especialmente de compostos terapêuticos, é tema muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e nos órgãos fiscais de controle de qualidade de medicamentos na vigilância sanitária (Indra K. Reddy, 2004) (Burke, et al., 2002)

Sabendo-se que a venda de fármacos sob a forma de mistura racêmica ainda ocorre, é necessário saber qual é o estereoisômero responsável pela atividade e ter absoluta certeza que o outro estereoisômero, presente na mistura, não tenha nenhuma atividade biológica adversa (Singh, et al.) (Orlando, 2007). Do ponto de vista do consumidor, a administração de um fármaco em sua forma racêmica tem algumas desvantagens (varios, 2016) (Def, 2016). A dose a ser utilizada deve ser aumentada, pois somente uma parte dela tem o efeito farmacológico desejado mas o paciente ingere, a cada dose, uma percentagem às vezes significativa de uma substância química desnecessária.

O único fator, no nosso entender, que dificulta a venda de fármacos quirais em sua forma opticamente pura é o custo de uma síntese assimétrica. Normalmente, os métodos usados são caros, o que eleva o preço final do fármaco para o consumidor.

Para garantir a segurança e a eficiência dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento, é necessário isolar e examinar cada um dos enantiômeros separadamente. Além disso, é importante, também, o controle da composição estereoquímica desde a síntese até o consumo, envolvendo estudos farmacológicos, fabricação e controle de qualidade (Pallastrelli, 2013).

Atualmente, questiona-se sobre a validade de continuar com a prática de monitorar o nível plasmático total (soma dos dois isômeros) e calcular os parâmetros cinéticos para o racemato ou se devemos quantificar os isômeros separadamente.

Outro desafio em voga é estabelecer quais fármacos devem ser comercializados na forma do isômero puro, (Antony J. Trevor, 2015, Becker, 2012). Aproximadamente 25% de todos os fármacos sintéticos e naturais prescritos e dispensados são racematos. Dentre os fármacos sintéticos com centro quiral, cerca de 88% são comercializados na forma racêmica, enquanto por volta de 98% dos fármacos de origem natural (e.g. quinidina) são biossintetizados e comercializados na forma enantiomérica pura (Pallastrelli, 2013)

Dentre os fármacos antiarrítmicos, boa parte é comercializada sob a forma de racematos, destacando-se os agentes β -bloqueadores adrenérgicos (propranolol, acebutolol, pindolol, atenolol, metoprolol, sotalol), o verapamil, a atocainida, a mexiletina, a propafenona e a adisopiramida, para os quais já foram reportadas estereosseletividade farmacocinética e/ou farmacodinâmica.

3.3 ELETROQUIMICA E ELETROANALITICA

A eletroquímica envolve fenômenos químicos associados à transferência de carga, podendo ocorrer a transferência, homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo. Neste processo é necessário assegurar a eletroneutralidade, que exige a ocorrência de duas ou mais reações de transferência de carga em direções opostas (Gonzalez, 2015, Ticianelli, et al., 1998). As reações que ocorrem no eletrodo são heterogêneas e têm lugar na dupla camada elétrica (região interfacial entre o eletrodo e a solução). O eletrodo pode atuar como um doador (redução) ou receptor (oxidação) de elétrons transferidos de/ou para espécies eletroativas em solução, segundo a equação (1):



onde, O e R são as espécies oxidadas e reduzidas, respectivamente.

Sob um determinado potencial aplicado a um eletrodo (eletrodo de trabalho), poderá acontecer uma reação eletroquímica envolvendo as espécies eletroativas da solução que podem chegar até sua superfície por transporte de massa. Este

transporte de massas pode ser devido à *difusão*, (provocado por um gradiente de concentração que se estabelece entre solução e a superfície do eletrodo), por *migração* de partículas carregadas num campo elétrico ou por *convecção* envolvendo um processo mecânico, que ocorre principalmente devido à movimentação da solução.

As reações eletródicas podem ser classificadas como:

Reações reversíveis, $k_0 \gg k_d$, a reação de transferência de carga que ocorre no eletrodo é mais rápida do que o transporte de massa e para qualquer valor de potencial atinge-se um estado de equilíbrio na superfície do eletrodo, sendo possível aplicar a equação de Nernst para qualquer potencial. (k_0 , constante de velocidade padrão da reação eletroquímica, k_d , coeficiente de transferência de massa).

Reações irreversíveis, $k_0 \ll k_d$, a reação de transferência de carga no eletrodo é lenta e para acelerá-la é necessário aplicar-se um potencial mais elevado. Neste caso a transferência de carga deixa de ser suficiente para manter o equilíbrio.

Na eletroquímica, durante uma reação de oxidação considera-se que o eletrodo de trabalho funcione como receptor de elétrons e a corrente denomina-se de *corrente anódica*, (I_a), e tem um valor positivo. No caso da reação de redução o eletrodo de trabalho atua como doador de elétrons e a corrente, *corrente catódica*, (I_c), tem um valor negativo (Bagotsky) 2001)

Estes processos eletroquímicos envolvem algumas propriedades elétricas mensuráveis como corrente, potencial e carga que podem ser utilizadas na química analítica ao serem relacionados com algum parâmetro químico intrínseco do analito quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma célula eletroquímica.

As técnicas eletroanalíticas na atualidade têm sido muito utilizadas no monitoramento ambiental, no controle de qualidade de produtos e processos industriais, nas análises biomédicas, e também no controle de medicamentos. As vantagens que elas apresentam são (i) seletividade e especificidade resultantes da oxiredução das espécies analíticas de interesse em um potencial específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxiredução do analito em eletrodo de

trabalho feito com material específico; (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultantes das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal, que proporcionam ambiente com baixo sinal de fundo.

3.4 VOLTAMETRIA. BREVE HISTORIA E FUNDAMENTOS

Os primeiros reportes sobre esta técnica foram feitos por Jaroslav Heyrovsky, que estudou sistemas envolvendo eletrodos de mercúrio, aplicados ao estudo de metais em solução. Estes primeiros estudos conduziram ao desenvolvimento da técnica para identificação e quantificação de componentes em diversas matrizes, o que gerou o premio novel em Química dado ao Professor Heyrovsky.(Wang, 2006)

Desde a sua primeira utilização como técnica analítica a voltametria tem recebido substanciais contribuições não só da química e da físico-química, mas em especial da eletrônica e microeletrônica, além do conhecimento amplo de que as variáveis eletroquímicas potencial (E), carga (Q), e corrente (i), etc, podem ser perfeitamente controladas e monitoradas. Contribuíram muito para esta técnica também o desenvolvimento da termodinâmica e da cinética (Pacheco, et al., 2013)

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica (i) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (E), cuja relação é mostrada na seguinte equação (equação 2).

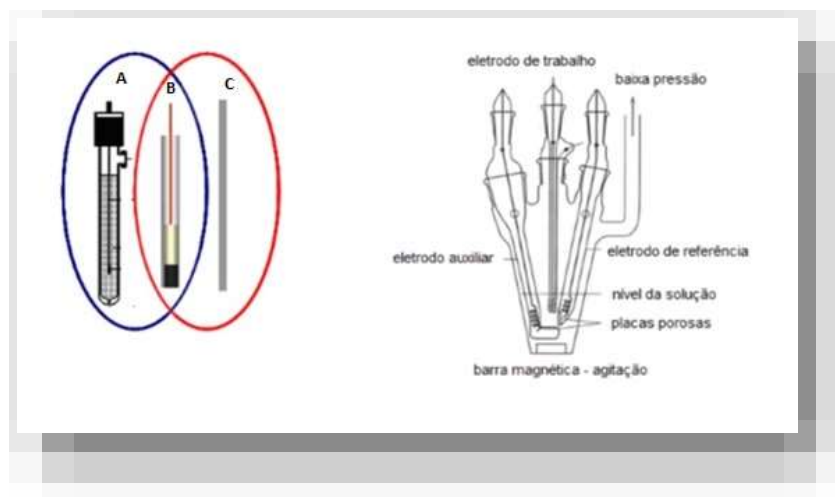
$$i = f(E) \quad (2)$$

Nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um determinado potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. Ou seja, o parâmetro controlado é o potencial (E) e o medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial, é denominado

voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxiredução (equação 1), pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica, quando o analito sofre reação redox na janela de potencial estudada.

O sistema mais comumente utilizado é formado por uma *célula eletroquímica* composta, atualmente, por três eletrodos, como representa a figura 2. Este sistema é formado por um *eletrodo de trabalho*, de área relativamente pequena e onde ocorre o distúrbio e movimentação de elétrons subsequentemente medido, o *eletrodo de referência*, de área relativamente grande (com a função de manter constante seu potencial durante a medida) e um eletrodo auxiliar ou *contra-eletrodo*, que pode ser de platina, um metal inerte, introduzido para assegurar uma situação potenciostática. Nessa configuração os eletrodos são conectados a um amplificador, que atuará quando for aplicada uma diferença de potencial, entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência;

Figura 2. Desenho de célula com 3 eletrodos. (Versão extraída de Pacheco, W. F. 2013) (A) Eletrodo de referência, (B) Eletrodo de trabalho (C) Contra-eletrodo



A superfície eletródica pode atrair espécies carregadas positiva ou negativamente que podem sofrer reação eletroquímica ou não, além de interagir, via adsorção, com espécies neutras presentes no meio. No entanto, a extensão do processo eletroquímico depende primeiramente do transporte das espécies químicas da solução até a superfície do eletrodo e depois da possível reação eletródica. Assim a velocidade da reação eletródica é governada por processos como (i)

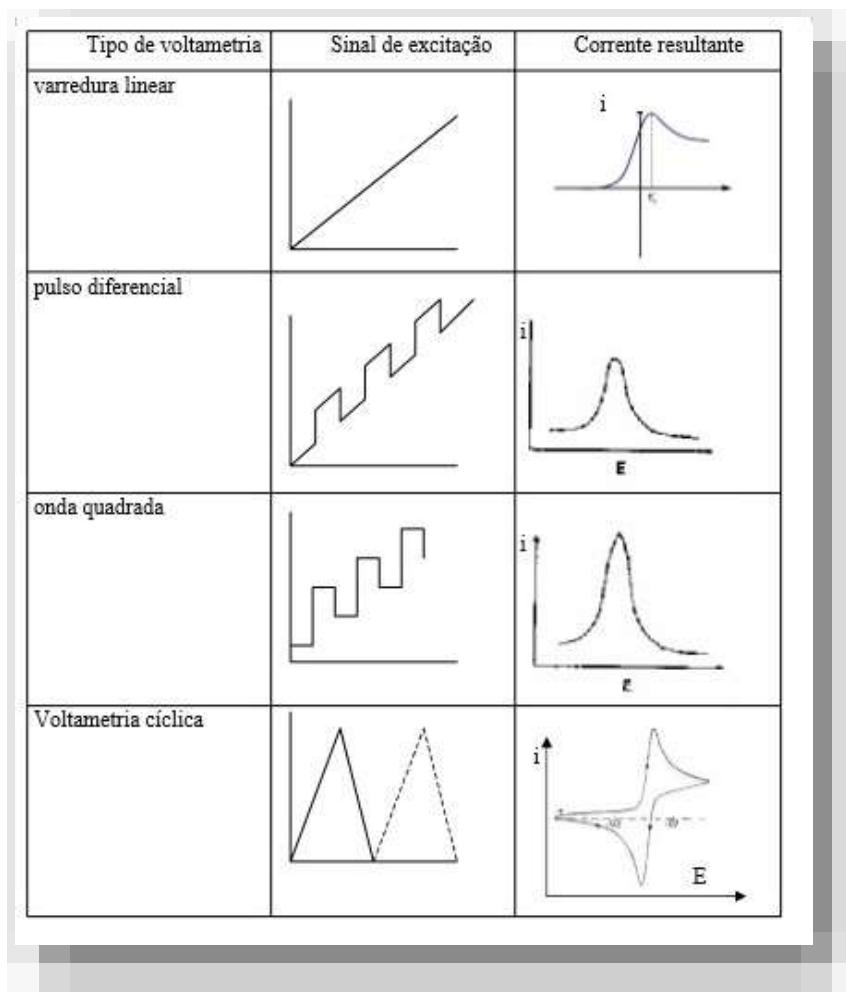
transferência de massa (transporte da espécie do corpo da solução para a interface eletrodo-solução); (ii) *transferência de carga* (transferência de elétrons); (iii) *reações químicas* que precedem ou sucedem a transferência de elétrons as quais podem ser homogêneas (protonação, dimerização, etc) ou heterogêneas (decomposições catalíticas, adsorção, dessorção, cristalização).

Na voltametria é imprescindível que o transporte de massa seja contínuo e existem três formas através das quais este transporte pode ocorrer: migração, convecção e difusão, sendo a mais importante a difusão, que é o movimento espontâneo da espécie química de interesse devido à formação de um gradiente de concentração entre a superfície do eletrodo de trabalho (uma vez iniciada a reação eletroquímica) e a solução (Pacheco, et al., 2013)

Já a transferência de cargas é consequência das reações redox ocorridas na interface eletrodo-solução onde a corrente total é constituída por duas componentes: corrente faradáica e corrente capacitiva. Sob o ponto de vista analítico deve-se trabalhar no sentido de diminuir ao máximo ou mesmo eliminar a corrente capacitiva e nesta situação a corrente medida será aquela regida pelas leis de Faraday (faradáica). De fato, a corrente capacitiva não é proporcional a concentração do analito e sim ao acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo. Os equipamentos mais novos tem priorizado a redução/eliminação desta corrente capacitiva. Assim, a corrente que é medida (de natureza faradaica) tem sua origem quando o potencial aplicado atinge um valor tal que permite que a reação de oxiredução do analito aconteça, e pode ser utilizada para quantificar o analito, pois essa corrente aplicada é proporcional a sua concentração.

A forma na qual é aplicado esse potencial, e conseqüentemente a forma em que o sinal analítico (corrente) é adquirido, irá determinar o tipo de técnica voltamétrica utilizada, como mostra a figura 3.

Figura 3. Tipos de voltametrias em função da forma de aplicação do potencial



3.5 SENSORES ELETROANALÍTICOS NA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

Devido a sua simplicidade, a eletroanálise tem se revelado o ramo da química analítica com maior diversidade de técnicas disponíveis com diversas vantagens como métodos rápidos, simples e econômicos aplicados na determinação de grande diversidade de analitos de interesse industrial, clínico, ambiental e farmacológico, nas mais variadas matrizes, com possibilidade de monitoramento do analito em solventes aquosos e não aquosos (de Oliveira, et al., 2015)

Dentre suas aplicações, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos são uma das classes de maior destaque dentre os sensores químicos (Henrique Duarte, et al., 2014), (de Oliveira, et al., 2015), (Hudari, et al., 2014). Esses dispositivos têm sua resposta diretamente relacionada com a quantidade de uma espécie química específica em solução e são indicados para detectar e responder ao analito em estado sólido, líquido ou gasoso (Fantinato F., 2016).

Neste contexto nos últimos anos, os eletroquímicos têm dedicado um grande esforço para tentar controlar a superfície dos elétrodos com o objetivo de se obter uma reação redox perfeitamente controlada. Este controle da superfície do elétrodo é muito interessante, especialmente no campo da eletroanálise, uma vez que permite aumentar a seletividade das técnicas eletroquímicas na busca de especificidades para a análise de compostos orgânicos de interesse biológico (Hudari, et al., 2016).

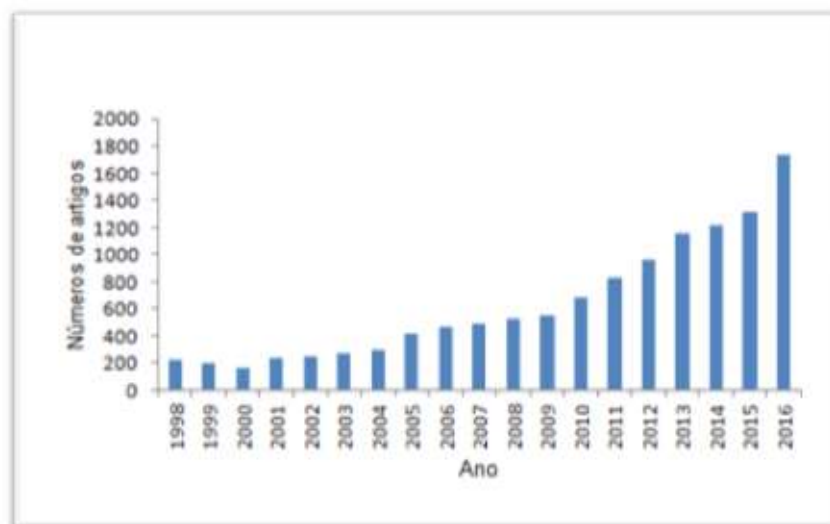
Assim, os elétrodos quimicamente modificados são particularmente adequados não apenas para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos e mecanismos físico-químicos tanto de espécies orgânicas como inorgânicas (de Oliveira, et al., 2015, Vicentini, et al., 2015) (de Oliveira, et al., 2015)

Além disso, com a adição de um modificador de superfície apropriado, pode-se exercer maior controle sobre o comportamento eletródico, ou seja, sobre as reatividades na superfície do elétrodo. Desta forma, pode-se selecionar ou antecipar respostas do elétrodo modificado para espécies externas (Silva, et al., 2014).

O desenvolvimento de sensores químicos melhorou a química analítica através de novos designs de instrumentação que aumentaram a capacidade de resolver problemas analíticos mais específicos. Tanto é assim que a demanda destes dispositivos para aplicações específicas por grandes empresas tem crescido dramaticamente nos últimos anos. O desenvolvimento de novos e melhores elementos de reconhecimento é um dos requisitos básicos para o desenho de sensores químicos, incluindo também a síntese de novos receptores de reconhecimento de íons e biomoléculas com maior seletividade e estabilidade (Bard, et al., 1980, J., 2001)(Bard, 2001).

Como alternativa aos métodos cromatográficos, a utilização de sensores eletroquímicos para a determinação de fármacos, tem sido de muita relevância, e tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, conforme a base de dados Science Direct que permitiu obter a bibliometria mostrada na figura 4.

Figura 4. Evolução da produção bibliográfica relacionada com o uso de sensores eletroquímicos para análise de fármacos



Estes aportam uma medida da concentração do fármaco, de uma maneira rápida, pois o fármaco pode ser determinado sem a necessidade da separação prévia, ou seja, diretamente na matriz com procedimentos de dissolução e/ou diluição.

Estes sensores podem ser classificados com base no mecanismo de transdução do sinal analítico dividindo-se principalmente em sensores potenciométricos, sensores amperométricos e sensores voltamperométricos. Todos são igualmente confiáveis, baratos, rápidos e fáceis de serem utilizados.

Como os procedimentos em eletroquímica dependem fortemente do material do eletrodo de trabalho, assim são importantes as propriedades químicas e físicas da superfície do eletrodo, os efeitos do potencial aplicado, adsorção e revestimentos aplicados à superfície do eletrodo, para diminuir o limite de detecção (J., 2001)

(Bard, 2001). Tanto as reações de eletrodo como o transporte de carga pode ser modulado quimicamente e servir de base para estes sensores.

3.6 ELETRODO COMPOSITO DE GRAFITE EPOXI MAGNETICO (GECE)

Os compósitos poliméricos de grafite condutores começaram a ser utilizados nos últimos anos. Os eletrodos de carbono epóxi, do inglês *graphite epoxy composite electrode* (GECE), por exemplo, tem aumentado sua aplicabilidade baseado nas suas boas propriedades como transdutores e em suas vantagens sobre os eletrodos tradicionais como maior sensibilidade, robustez e rigidez. Além disso a superfície dos GECE podem ser regeneradas mediante um simples polimento. Diferentemente dos eletrodos de pasta de carbono, a rigidez dos GECE permite o desenho de diferentes configurações, e compatibilidade com solventes não aquosos (Pividori, et al., 2001) (Pividori, et al., 2001, Pividori, et al., 2003, Williams, et al., 2003)

Dessa forma, acredita-se que o uso de eletrodos modificados com nanopartículas, seria bastante vantajoso para desenvolver sensores eletroquímicos baseados em sistemas de eletrodos compósitos com imã, capazes de pré-concentrarem os analitos marcados por nanopartículas magnéticas.

3.7 NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS (MNPs)

A nanociência e a nanotecnologia podem ser definidas como “a ciência que manipula a matéria na escala entre 0,1 e 100 nm, utilizando-se dos princípios da física, química e da biotecnologia com o intuito de: i) sintetizar novos materiais que possuam novas propriedades, ii) modificar e manipular superfícies e iii) elaborar microestruturas em duas ou mesmo três dimensões, visando uma determinada aplicação.”(Vollath, 2013)

A eletroanálise certamente recebeu, e continua recebendo, as maiores contribuições do uso de materiais nanoestruturados na química analítica. O desenvolvimento de sensores eletroquímicos vem sendo impulsionado fortemente pelo uso de nanomateriais.

Em eletroanálise, os primeiros registros do uso de nanoestruturas para o desenvolvimento de sensores voltamétricos data do início dos anos 2000, onde alguns trabalhos relatam o emprego destes materiais para detecção de espécies como dopamina e norepinefrina , utilizando nanopartículas de ouro como modificares de eletrodos(Raj, et al., 2003).

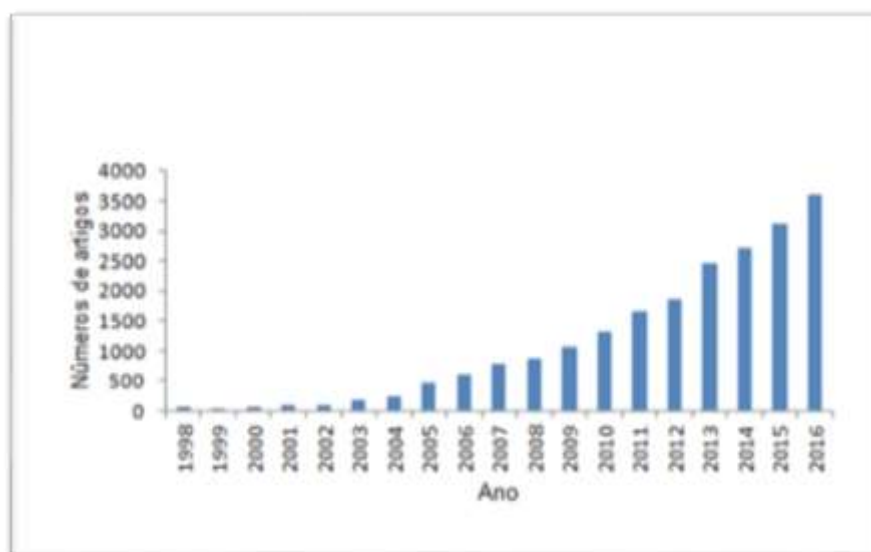
As novas propriedades destes nanomateriais podem ser atribuídas fundamentalmente a que nessa dimensão manométrica, cada partícula é formada por uma pequena fração de átomos, normalmente de dezenas a algumas centenas. Isso faz com que a razão entre superfície/volume das nanopartículas seja alta. Como normalmente os átomos superficiais possuem número de coordenação incompleto isso os torna mais susceptíveis a formar novas ligações(Janata, 2010)

Nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento de materiais nanoestruturados e nanotecnologia nas áreas de biotecnologia e medicina, partículas magnéticas nanométricas têm recebido considerável atenção(Raj, et al., 2003).

A figura 5 mostra a bibliometria disponível na Science Direct mostrando o crescente número de técnicas (mais de 3500 neste ultimo ano) que utilizam nanoparticulas como sensores eletroquímicos.

Nanomateriais podem ser preparados utilizando-se diversos compostos, como metais, polímeros, carbono e componentes biológicos. Dentro deste contexto, os nanomateriais magnéticos baseados em Fe_3O_4 têm sido bastante explorados devido a sua propriedade intrínseca, o magnetismo (Erdem, et al., 2006, Lermo, et al., 2008, Pinacho, et al., 2014)

Figura 5. .Número de artigos relacionados com a utilização de nanopartículas como sensores na eletroquímica.



Nanopartículas magnéticas, como as de óxidos de ferro, possuem uma habilidade única de se moverem pela influência de um campo magnético externo. Usualmente estas nanopartículas superparamagnéticas (magnetitas) são não porosas e muito estáveis e podem ser formadas por um conjunto de grãos superparamagnéticos, os quais são magnetizados na presença de um campo magnético, alinhando seus polos na direção do campo externo. Quando o campo é removido, os momentos magnéticos randomizam-se, de modo que a magnetização líquida do conjunto retorna a zero. Este processo pode ser explorado com sucesso na pré-concentração de analitos de interesse quando incorporados neste tipo de nanopartícula.

Dentro deste contexto, a manipulação destes materiais magnéticos em nanoescala aplicados em eletroquímica tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, como é mostrado na figura 5, principalmente para sistemas operando como sensores e biossensores (Holzinger, et al., 2014, Luo, et al., 2006, Rocha-Santos, 2014)

Suas aplicações versam desde a exploração de imobilização de proteínas até a detecção de hibridização do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Chen, et al., 2012, Lu, et al., 2008) Chem e colaboradores sintetizaram nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) modificadas com Azul da Prússia, sobre eletrodo de carbono vítreo para

aplicações em bioeletrocatalise com muito sucesso. Neste mesmo contexto, Pividori e col. tem demonstrado o seu uso na construção de imunossensores e genossensores (Pividori, et al., 2001, Pividori, et al., 2001, Pividori, et al., 2003), usando esferas eletromagnéticas para construções de genossensores eletroquímicos de DNA com alta sensibilidade e seletividade para uma grande quantidade de analitos em baixo nível de concentração.

Muitos sistemas usando modificação do analito com nanopartículas magnéticas assumem papel importante na química analítica, devido à propriedade de identificar as espécies de interesse em amostras de grande complexidade por meio de gradiente de campo magnético externo.

Dentro deste contexto, nesta parte do trabalho pretende-se utilizar sistemas de eletrodos compósitos modificados por imã, capazes de coletar fármacos, pré-concentrá-los sobre eletrodos modificados por nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3 modificadas por grupos carboxílicos e usá-los como extratores destes compostos. Os fármacos assim coletados serão monitorados pela oxidação eletroquímica de seus grupos funcionais diretamente no eletrodo usando a voltametria convencional.

A etapa de pré-concentração via nanopartículas magnéticas tem fornecido alta sensibilidade quando comparada aos métodos convencionais (Cheng, et al., 2014). Em adição, o uso destes dispositivos baseados nos princípios da nanotecnologia tem sido explorado para aumentar a relação sinal/ruído, redução do tempo de resposta, aumento de estabilidade e sensibilidade, e assim obter limite de detecção em concentrações entre nanomolar e picomolar (Pagnocelli, 2013).

Por outro lado, as nanopartículas magnéticas revestidas por grupos carboxílicos poderiam ser de grande valia na pré-concentração de fármacos. (Baccarin, et al., 2016, Vicentini, et al., 2016)

Desta forma, pretende aliar a alta eficiência na pré-concentração através de nanopartículas magnéticas com a alta seletividade dos sensores eletroquímicos, de forma a obter uma metodologia analítica altamente sensível e seletiva na determinação do fármaco em estudo.

3.8 FARMACOS β -BLOQUEADORES; O SOTALOL

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são causadoras da maioria de mortes no mundo, matando cerca de 17 milhões de pessoas por ano WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Statistic 2012 Report Geneva Visto em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/. Acesso em 29 Oct 2016.

Relatórios de 2012 da OMS mostram que aproximadamente 33% da população sofrem de problemas cardíacos. Entre as doenças mais comuns estão: hipertensão, angina pectoris, arritmia, glaucoma, enxaquecas e tireotoxicose/hipertireoidismo (Saleem, et al., 2013)

A hipertensão arterial é uma causa primária importante de insuficiência cardíaca e se enfatiza a necessidade de prevenção da doença, intervenção precoce e controle com o objetivo de conter sua progressão e desenvolvimento. Atualmente, a insuficiência cardíaca é a segunda causa mais comum de doença cardiovascular na população e estima-se que será a primeira causa de morte por doença cardiovascular em 2025 (Firmida, et al., 2001)

Diversos fármacos utilizados no tratamento das doenças cardiovasculares são quirais e incluem antagonistas β -bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos. Além disso, os β bloqueadores (antiarrítmicos classe II) e os bloqueadores dos canais de cálcio (veramil, galopamil, e previlamina; antiarrítmicos classe IV) também são utilizados no tratamento de arritmias juntamente com vários outros fármacos quirais pertencentes à classe I (Nguyen, et al., 2006);

Todos os bloqueadores β -adrenérgicos possuem pelo menos um centro de assimetria e normalmente a atividade β – bloqueadora cardíaca é associada ao enantiômero S(-). Uma exceção a esta regra é o Sotalol, uma vez que o enantiômero R(-) possui a maior ação β -bloqueadora, porém ambos os enantiômeros são equipotentes em termos de atividade antiarrítmica classe III (REDDY, 2004).

De um modo geral, os β – bloqueadores são absorvidos pelo trato gastrointestinal por difusão passiva e este tipo de absorção não é considerado estereosseletivo. Fármacos pertencentes a esta classe ligam-se à albumina e α_1 – glicoproteína no plasma. O Sotalol está presente em alta quantidade no plasma, e sua ligação parece ser não-estereosseletiva.

A eliminação da maioria destes β – bloqueadores ocorre via metabolização hepática e/ou excreção renal do fármaco inalterado, sendo que os β – bloqueadores lipofílicos são eliminados basicamente por metabolização e os β – bloqueadores mais hidrofílicos são predominantemente eliminados de forma inalterada pela urina (REDDY, 2004).

Os β – bloqueadores estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo (Morante-Zarzero, et al., 2012). No Brasil os β – bloqueadores são comercializados em formas farmacêuticas variadas, podendo estar na forma de comprimidos, injetáveis, soluções oftálmicas etc (Def, 2016).

Devido ao grande número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares, foi selecionado o Sotalol como substância-teste no desenvolvimento de uma metodologia alternativa de determinação.

Dentre os fármacos antiarrítmicos, boa parte é comercializada sob a forma de racematos, destacando -se os agentes β -bloqueadores adrenérgicos (propranolol, acebutolol, pindolol, atenolol, metoprolol, sotalol), e o verapamil, a atocainida, a mexiletina, a propafenona e adisopiramida, para os quais foram reportadas estereosseletividade farmacocinética e/ou farmacodinâmica.

O Sotalol é totalmente absorvido após administração por via oral e o mesmo não se liga às proteínas plasmáticas (Enna, et al., 2008)

O Sotalol possui um centro quiral e conseqüentemente dois enantiômeros. A forma racêmica disponível no mercado é empregada no tratamento de hipertensão, angina pectoris, e arritmias cardíacas (Enna, et al., 2008, Hume J. R., 2007)

A concentração plasmática máxima do Sotalol após administração por via oral é atingida após aproximadamente 2 - 3 horas. Sua biodisponibilidade é próxima de 100% porém é reduzida pela presença de alimentos.

O Sotalol pode atravessar livremente a placenta e pode ser encontrado no leite materno (Martindale, 2009). Seu tempo de meia vida plasmática é de 10 a 20 horas , sendo maior em pacientes com insuficiência renal e em pacientes idosos.

Ate 75% da dose de Sotalol administrada é excretada pela urina sob forma inalterada num período de até 72 horas após a ingestão. Menos 10 % é excretada através das fezes. <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/13236/disposicao-cinetica-dos-enantiomeros-s-r-sotalol-em-pacientes-chagasicos-cronicos-portadores-de-arr/>.

Uma vez que o Sotalol é eliminado primariamente pela urina, ajustes de dose são necessários em pacientes que possuem diminuição da depuração renal (Enna, et al., 2008). Pequenas quantidades de Sotalol também atravessam a barreira cérebro-espinhal.

Algumas propriedades físico químicas do Sotalol e de seu cloridrato são mostradas na Tabela 1. (MERCK, 2001 ; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009a ; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008 ;(C, 2011)

Tabela 1: Algumas propriedades físico químicas do Sotalol e de seu cloridrato

Propriedade	Sotalol	Cloridrato de sotalol
Formula molecular	$C_{12}H_{20}N_2O_3S$	$C_{12}H_{20}N_2O_3S.HCl$
Peso molecular	272,36 g/mol	308,83 g/mol
Nome químico	N-[4-[1-hidroxi 2-[(1-metiletil) amino] etil] fenil] - metasulfonamida, ou 4'-[1-hidroxi- 2- (isopropilamino) etil] metanosulfonamida	Cloridrato de N-[4-[1-hidroxi 2-[(1-metiletil) amino] etil] fenil] - metasulfonamida, ou 4'-[1-hidroxi- 2- (isopropilamino) etil] metanosulfonamida
Ponto de fusão (°C)	207	Entre 218 e 219
Forma física	Cristais	Pó branco ou esbranquiçado
Log P (octanol/água)	$0,240 \pm 0,369$	0,2
pKa	$9,31 \pm 0,10$	8,2

3.9 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE SOTALOL. ENANTIOSELETIVIDADE

Entre os métodos analíticos mais empregados para a separação identificação e quantificação de fármacos está a cromatografia líquida de alta eficiência, (Abirami, et al., 2013, Santoro, et al., 2008) (Laer, 2001; Dilek, 2007). Esta técnica tem sido amplamente aplicada também na determinação da pureza óptica e da constituição estereoisomérica de medicamentos, matérias-primas, preparações farmacêuticas e fluidos biológicos e em estudos de instabilidade configuracional de fármacos (racemização, enantiomerização, epimerização) e determinação da farmacocinética e metabolismo de fármacos (T., 2010)

Para a determinação na forma de racemato entre as técnicas mais simples (mesmo sem baixos limites de detecção) encontram-se as colorimétricas, uma delas descrita com base na formação de complexo de transferência de carga na reação do sotalol com 4-cloro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazolo (NBD-Cl) em acetona, cujo limite de detecção é de 0,1µg/mL (Amin, et al., 2002). Outras técnicas utilizam o quenching de fluorescência em solução (Zhang, et al., 2011) e as técnicas cromatográficas (Feng, et al., 2015); (Matysova, et al., 2015, Santos, et al., 2000), como a cromatografia líquida de alta eficiência (Abdelmonem, et al., 2016) a cromatografia gasosa, cromatografia de fluidos supercríticos, (Dogrukol-Ak, et al., 2007) a electroforese capilar (Hancu, et al., 2014) etc, que são aplicadas tanto para a determinação na forma de racemato como a determinação dos enantiômeros em separado. Recentemente, a eletroquímica também tem sido utilizada com fins de determinação do conteúdo de Sotalol em solução (Norouzi, et al., 2008) (Ensafi, et al., 2013, Heli, et al., 2013)

No entanto, ainda é necessário maior aperfeiçoamento dos eletrodos com o objetivo de abaixar os limites de detecção através de mudanças no interior da membrana, fundamentalmente nos fluxos dos íons, o que também será tentado no desenrolar deste trabalho.

Como alternativa aos métodos cromatográficos de separação quiral, a utilização de sensores eletroquímicos enantioseletivos tem sido de muita relevância. Estes métodos permitem uma quantificação da mistura de enantiômeros de uma maneira rápida, devido a que o enantiômero poderia ser determinado sem a necessidade da separação previa, diretamente na matriz com procedimentos de dissolução e/ou diluição da amostra.

Além disso, a maioria dos sensores enantioseletivos pode ser utilizada como detectores em sistemas de fluxo. Nesta linha, tem sido desenvolvidos analises enantioseletivos *online* com sensores eletroquímicos para a detecção de apenas um dos enantiômeros ou para analise simultânea de ambos.

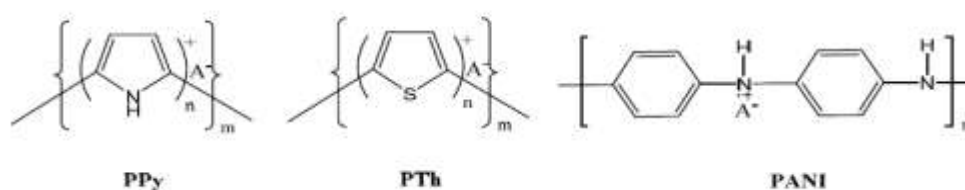
Os primeiros trabalhos sobre sensores eletroquímicos quirais foram publicados em 1970 quando se descreveu a construção de um eletrodo de membrana íon seletivo para a determinação do íon α -feniletilamônio empregando

como ionóforos enantioseletivos éteres coroa macrocíclicos quirais. A partir disso, os trabalhos dirigidos ao desenho de sensores enantioseletivos tiveram seu número incrementado de forma considerável. Estes sensores podem se classificar com base no mecanismo de transdução do sinal analítico dividindo-se principalmente em sensores potenciométricos, sensores amperométricos e sensores voltamperométricos.

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são uma alternativa para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos de maneira geral, destinados à identificação seletiva de enantiômeros. No campo dos sensores e biosensores, estes polímeros condutores quirais tem atraído uma atenção especial devido a sua capacidade para ser facilmente sintetizado nas superfícies dos elétrodos. Alguns dos principais atrativos dos MIP são: (a) podem se fabricar a grande escala de forma simples, barata e com diferentes morfologias a partir de monômeros orgânicos, (b) são estáveis química e fisicamente, podendo trabalhar em condições extremas de pH, temperatura e em presença de solventes orgânicos sem a alteração da sua estrutura, e logo, sua afinidade pelo analito. A técnica de impressão molecular tem sido aplicada com êxito na preparação de materiais poliméricos de elevada especificidade em variadas áreas como cromatografia, eletroforeses capilar, sensores, catálise, análise em fluxo, etc. (Marestoni, et al., 2013) (Tarley, et al., 2005). Eles são materiais eletricamente condutores de natureza orgânica que podem ser gerados por polimerização química ou eletroquímica dos monômeros

Por sua natureza orgânica e capacidade de serem formados como partículas, membranas ou fibras micro e/ou nanométricas estes polímeros geram novas possibilidades para a concepção e desenvolvimento de sistemas específicos de reconhecimento molecular

Figura 6. Estrutura molecular dos polímeros condutores mais empregados em sensores quirais; polipirrol (PPy), politiofeno (PTh) y polianilina (PANI).



Dentro deste grupo de polímeros, encontram-se o polipirrol (PPy), o politiofeno (PTh) e a polianilina (PANI) (figura 6), dos quais o mais utilizado é o polipirrol (PPY). Todos têm sido aplicados principalmente para o reconhecimento enantioselectivo de aminoácidos, tais como fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico ou triptofano. Nestes enfoques, o polipirrol quiral é eletro-sintetizado sobre as superfícies dos eletrodos na presença de ácido L – ou d- canforsulfônico (CSA), glutamato ou ácido aspártico que atuam como agentes indutores quirais.

Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) são eletrodos com espécies quimicamente ativas deliberadamente imobilizadas em suas superfícies com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução (de Oliveira, et al., 2013). A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas voltamétricas, amperométricas ou mesmo potenciométricas. A modificação deliberada da superfície do eletrodo sendo uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações. Do ponto de vista analítico, a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré- concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes, o que justifica a utilização destes dispositivos na especificação quiral.

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais estão o ouro, a platina, o carbono vítreo, o mercúrio (na forma de filme) e a pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores, estão incluídos entre os substratos menos usuais. (Souza, 1997, Wang, et al., 2009)

O uso de complexos quirais para a separação de macromoléculas através da troca de ligantes tem mostrado grande potencial na enantioselectividade, devido à

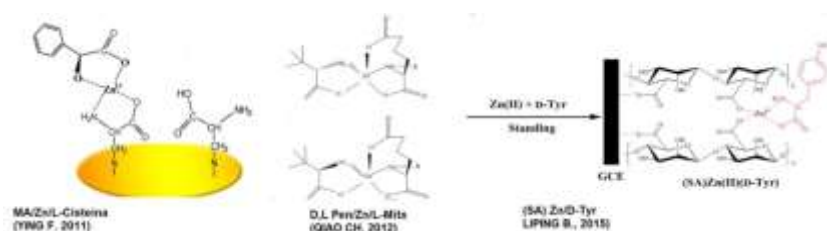
sua simplicidade e notável especificidade para a separação destas biomoléculas que incluem aminoácidos, hidroxíácidos e peptídeos. A grande maioria de trabalhos nesta área tem utilizado as diversas variantes das técnicas cromatográficas (Davankov, 2003, Su, et al., 2015) (Fu, et al., 2011); (Zhang, et al., 2013). Entretanto, nos últimos anos, os complexos quirais vêm sendo usados para a separação enantiomérica através das técnicas eletroquímicas (Chen, et al., 2012). Na maioria dos casos, são utilizados complexos com Zn (II) ou Cu (II), (Yang, et al., 2001) (Yang, et al., 2006) aproveitando a capacidade destes metais de formarem complexos com o grupo amino. No caso CHEN e col. reportam o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o reconhecimento dos dois isômeros da penicilina obtido com o uso de um eletrodo de ouro previamente modificado L-methotrexate (L-Mtx), através da formação de 2 complexos de Zn (II) de diferentes estruturas após reação com os enantiômeros (Chen, et al., 2012). Do mesmo jeito Liping e col, determinaram por separado a D- e a L-tirosina pela formação de complexos de Zn (II). O reconhecimento enantioselectivo dos isômeros é conseguido através de monitorização da diferença da corrente dos picos de oxidação ou redução dos complexos (Bao, et al., 2015)

Yingz e col. conseguiram o reconhecimento enantioselectivo dos isômeros S e R do ácido mandélico na presença de Zn (II) utilizando um eletrodo de ouro modificado com L-cisteína, através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica (Fu, et al., 2011).

O Zinco tem sido utilizado desde o começo dos anos 2000 no reconhecimento de células vivas, através do uso da técnica de microscopia de fluorescência e devido à possibilidade da formação de complexos de zinco com as moléculas biológicas (Kikuchi, et al., 2004).

Em todos os casos, os autores referem à possibilidade da formação de um complexo de coordenação com zinco sendo este o responsável pelo reconhecimento enantioselectivo, como mostra a figura 7

Figura 7 Representação esquemática do reconhecimento quiral de algumas moléculas através da formação de complexos com íons zinco (II)



3.10 BIODEGRADABILIDADE DE FÁRMACOS

Na vigilância sanitária uma das questões emergentes é o destino das substâncias farmacologicamente ativas (PhACs) no meio ambiente, especialmente no ambiente aquático. Estudos realizados na Áustria, Brasil, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha, Suíça, Holanda e EUA mostram que mais de 80 substâncias, produtos farmacêuticos e vários metabólitos de drogas, foram detectados no ambiente aquático (Heberer, 2002) (Gonçalves, 2016)

Dentre as várias PhACs, os beta bloqueadores, foram encontrados em concentrações até o mg/L em rios e efluentes das estações de tratamento de esgotos (ETEs), indicando assim degradabilidade e remoção incompletas destas substâncias pelos processos de tratamento utilizados (Maurer, et al., 2007) (Morante-Zarzero, et al., 2012). Resultados mostram que nos processos biológicos, a eficiência de degradação vem a ser fortemente influenciado pela presença de outros macroconstituintes, o que faz com que a degradação de fármacos e desreguladores endócrinos, além de ocasional, sejam apenas parciais (Kumar, et al., 2014, Morante-Zarzero, et al., 2012).

Alguns autores referem que mesmo podendo ser atingidas elevadas taxas de remoção e de biodegradabilidade, nos sistemas biológicos, o risco ecológico permanece ainda elevado devido aos subprodutos que geralmente têm mostrado

elevadas consequências toxicológicas no ambiente aquático (Mendez-Arriaga, et al., 2010).

Os métodos mais utilizados para a determinação destes resíduos em águas residuais têm sido aqueles baseados na extração em fase sólida seguidos por GC-MS ou ionização por electrospray em CLAE-MS-MS (Sacher, et al., 2001)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo estaremos mostrando os equipamentos utilizados nesta tese assim como os procedimentos desenvolvidos com a finalidade de otimizar as metodologias a serem propostas.

4.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica de compartimento único, contendo eletrodos de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência, platina como eletrodo auxiliar e carbono epóxi compósito (GECE, área geométrica de $0,07 \text{ cm}^2$) modificado com nanopartículas magnéticas (MNPs) como eletrodo de trabalho. A área efetiva desses eletrodos foi determinada e é mostrada na seção de resultados e discussão.

O eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina de granulometria 1,00; 0,30 e $0,05 \mu\text{m}$ (Micropolishing Material, Buehler LTDA). A seguir foi submetido a varredura de potencial entre $-1,0$ a $+1,0 \text{ V}$ sob velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Os eletrodos compósitos modificados com nanopartículas magnéticas foram limpos após a varredura com lixas de carvão de silício de granulometria 1200 (3M do Brasil, São Paulo-SP).

4.2 EQUIPAMENTOS

Todas as técnicas eletroquímicas utilizadas (voltametria cíclica, onda quadrada, e pulso diferencial) foram realizadas em um potenciostato Autolab-2 da EcoChemie, acoplado a um computador dotado de uma interface GPES.

As medidas de espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-Vis) foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro da Hewlett Packard (HP) modelo 8453 interfaciado na faixa espectral de 200 a 1000nm em cubeta de quartzo, da marca Hellma, com capacidade de 5,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm.

As caracterizações morfológicas da superfície dos eletrodos foram obtidas empregando um microscópio eletrônico de varredura SM (Hitachi) – 300 (Scanning Electron Microscope).(TEM)

A identificação dos grupos funcionais nas amostras de MNPs foi obtida por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram registados utilizando-se um espectrômetro FTIR Perkin Elmer Frontier FTIR. As amostras secas foram dispersas em pastilhas de KBr e analisadas no intervalo de 4000-400 cm^{-1} com uma resolução nominal de 4,0 cm^{-1} .

A morfologia dos MNPs na suspensão coloidal foi observada com um microscópio Leo 906E (Zeiss) TEM a 100 kV. Uma gota da suspensão coloidal (100 μg Fe / mL) foi dispersa e seca sobre uma grelha de cobre coberta com carbono antes da medida.

As medidas de difração de raios-X foram feitas em equipamento SIEMENS modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commander. As medidas de difração em amostras sólidas foram realizadas em BRAGG - BRENTANO, $\theta - 2\theta$, com detector de cintilação e monocromador de grafite.

A análise de cromatografia líquida acoplado a massas (LC-MS / MS) para o fármaco e os produtos eletrolisados foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência de 1200 Agilent Technologies acoplado a um Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP (Trampa quadrupolo linear de íons, LC-ESI-MS/MS) equipado com uma coluna Phenomenex Kinetex PFP (150 x 4,6 mm y 5 μm). As condições de análise foram baseadas nas sugestões de Pujos, com algumas modificações (PUJOS, 2009). Na eluição da amostra usou-se o modo de gradiente de uma mistura de água ultra pura contendo 0,10% de ácido fórmico (A) e metanol (B). Para a análise utilizou-se a seguinte programação de gradiente: 0-2 min 5% B, 2-12 min 5-100% B, 12-13 min 100% B, 13-14 min 100-5% B, Y 14-20 min 5% B, usando um fluxo de 10 μLmin^{-1} e volume de injeção de amostra de 20 μl . A fonte de íons

funcionava no modo positivo de eletrospray a 600°C nas seguintes condições de ionização: voltagem de pulverização iônica (IS) = 5500 V; gás de cortina (CUR) = 10 psi; gás nebulizador 1 = 15 psi; potencial de decomposição (DP), 65 V; e o potencial de entrada (EP), 10 V.

Os experimentos para a investigação dos produtos de oxidação foram realizados pelo software LightSight® (SCIEX), baseando-se no espectro de íons de fragmentos do padrão do fármaco. Todos os experimentos foram testados por *enhanced mass scan* (EMS) e *selected reaction monitoring* (SRM) para a aquisição simultânea dos fragmentos dos íons

Para a validação da metodologia proposta foi utilizado um equipamento CLAE-DAD, um cromatógrafo analítico com sistema quaternário Shimadzu LC-10 AT, detector de UV-Vis de 20 CBM com matriz de díodos (DAD) modelo SPD-M 10A, Degaser DGU-20A3R, auto amostra SIL-10A, Phenomenex® C18; 5 µm (250 x 4,6 mm).

Na caracterização dos complexos da molécula alvo com zinco foi utilizada a técnica de dicroísmo circular. Dicroísmo circular ou Circular Dichroism (CD) é uma técnica espectroscópica que tem como base a medida da absorvância diferencial entre as duas rotações de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica (Slade, et al., 2005). Fala-se que um material ou composto possui dicroísmo circular quando a absorção da luz circularmente polarizada numa direção (direita) é diferente da absorção da luz circularmente polarizada na direção oposta (esquerda). CD é uma técnica não destrutiva, de fácil manuseio, requer pequenas quantidades de amostra e as análises são relativamente rápidas, perfeitamente aproveitadas no caso de moléculas com grupos cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou estão localizados em condições quirais.

Os instrumentos DC (conhecidos como espectropolarímetros) medem a diferença em absorvância entre os componentes L e R da luz polarizada circularmente, mais geralmente é reportado em termos de elipticidade (θ) em graus. É bom dizer que $\theta = (b/a)$ onde b e a são os eixos maior e menor da elipse resultante.

Existe uma relação simples entre $\Delta\epsilon$ e elipticidade (em graus), concretamente $\theta=32.98 \Delta\epsilon$. O espectro de DC é obtido quando o dicroísmo é medido como uma função do comprimento de onda.

O equipamento utilizado neste experimento foi o espectropolarímetro JASCO Corp. J-810, com células de 1 cm de diâmetro. Os parâmetros ajustados foram "bandwidth" = 2 nm; tempo de resposta = 1s e velocidade de varredura = 20 nm/min; o número de acumulações foi o necessário para que o valor de HT não excedesse 700 V

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes químicos usados foram de grau analítico e adquiridos da MERCK (Rio de Janeiro – Brasil). O Padrão Cloridrato de (+/-) Sotalol com grau de pureza $\geq 98\%$, foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. As amostras comerciais de cloridrato de (+/-) Sotalol também utilizadas foram adquiridas no mercado.

A solução estoque do padrão do fármaco em concentração de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada por dissolução direta da substância-padrão do fármaco em água deionizada (MILLI-Q - condutividade de $18.2 \mu\Omega\text{cm}^{-1}$). As soluções de trabalho foram sempre preparadas pela transferência de alíquotas quantitativas da solução estoque do fármaco para o volume final na célula eletroquímica (10mL).

As soluções-tampão de fosfato (NaH_2PO_4), de acetato e Britton Robinson (BR), foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos na literatura, para os pH desejados (VINCENT S. 1990) A solução tampão de fosfato foi preparada pela mistura de 39 mL de solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e 61 mL da solução $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ num volume final de 200 mL. No caso da solução tampão de Britton Robinson se preparou uma solução $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de H_3PO_4 , HAc e H_3BO_3 . O pH da solução resultante foi ajustado a pH 7,0 com solução de NaOH.

As medidas de pH de todas as soluções foram realizadas em um pHmetro Corning 555, equipado com eletrodo combinado de vidro, após as calibrações necessárias com padrões adequados para as faixas de pH desejadas.

As amostras foram pesadas em dois tipos de balanças de acordo com a precisão necessária: Mettler Toledo A245 com precisão de $\pm 0,1$ mg e Ohyo JK-200.

O ferrocianeto e o ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$) foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) e utilizados sem purificação prévia. O ácido R- canforsulfônico (R-CSA) foi adquirido da Fluka (Buchs, Suíça).

4.4 PROCEDIMENTOS

No presente capítulo serão descritos os procedimentos usados nas metodologias desenvolvidas nas diferentes etapas de este trabalho.

4.4.1 Construção do eletrodo magnético composto (GECE)

O eletrodo composto foi obtido pela mistura de grafite em pó (tamanho de partícula de 50 μm) e resina epóxi (Epotek H77, Epoxy Technology, USA) juntamente com o endurecedor comercial na proporção 1:4 (p/p) de acordo com a recomendação de vários autores. (Lermo, et al., 2008, Pinacho, et al., 2014); (Brugnera, et al., 2012, Lu, et al., 2008, Park, et al., 2006, Zhang, et al., 2011). A pasta obtida foi transferida para um corpo cilíndrico de PVC (6 mm i.d.), contendo em seu interior uma placa de cobre como contato elétrico e um pequeno ímã de neodímio (3 mm l.d.) foi colocado no centro do eletrodo. Finalmente, o eletrodo foi curado a 40 °C durante 1 semana para se obter um composto rígido.

Antes do seu uso, a superfície do eletrodo composto foi lixada com lixas de carvão de silício de granulometria 1200 (3M do Brasil, São Paulo-SP), até

conseguir-se uma superfície com um aspecto uniforme e espelhado. A seguir o eletrodo foi lavado com água destilada, para retirada de excesso de material, estando finalmente pronto para uso.

4.4.2 Síntese e modificação de nanopartículas magnéticas (MNPs) com grupos carboxilatos

As nanopartículas magnéticas modificadas com grupos carboxílicos foram sintetizadas e funcionalizadas no laboratório. Para isto, as nanopartículas magnéticas (MNPs) foram sintetizadas por co-precipitação de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ na razão molar 2:1, dissolvidos em 40 ml de água deionizada. Após purgar a solução com argônio para a eliminação do oxigênio, adicionou-se um pequeno volume de uma solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de amoníaco com agitação mecânica vigorosa. A suspensão negra resultante foi transferida para um balão de fundo redondo de três bocas equipado com um condensador de refluxo. A temperatura foi aumentada para 90°C e mantida sob atmosfera de argônio durante 30 minutos. A modificação das nanopartículas com o grupo carboxílico foi obtida adicionando-se à suspensão anterior 3 mL de uma solução de ácido cítrico ($0,6 \text{ g / ml}$ - pH ajustado a 7 com solução amoniacal $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Após 7 horas de reação as nanopartículas obtidas foram dialisadas contra água deionizada durante 48 horas. A concentração final da solução de nanopartículas era de $0,01 \text{ mgL}^{-1}$.

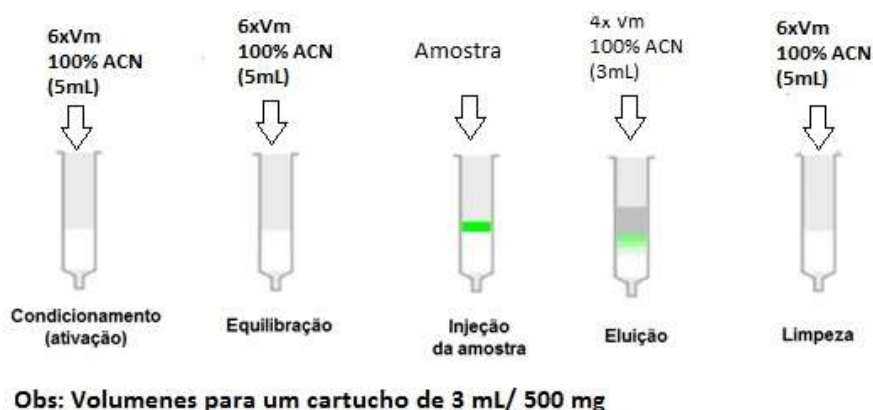
4.4.3 Procedimento otimizado para extração do Sotalol de comprimidos comerciais

Vinte comprimidos de sotalol foram triturados em cadinho de ágata e 350 mg do pó resultante foram pesados e tratados com 350 μL de dietilamina. Após 1 min em sonificador, adicionou-se 10 mL de acetonitrila e submeteu-se a mistura a dissolução por mais um 1 minuto em vortex. A seguir a solução foi eluída em cartuchos pré-empacotados de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, contendo

aproximadamente 3 cm de fase estacionária RP-18 previamente ativada com 5 mL de acetonitrila (LiChroprep RP-18, 25-40 μ m, Merck). A amostra foi eluída com 3 mL de acetonitrila. A figura 8. apresenta um esquema do procedimento.

Rendimento: 40 a 80 mg de sotalol puro, comprovado por medidas de cromatografia líquida e espectrofotometria na região do UV-Vis.

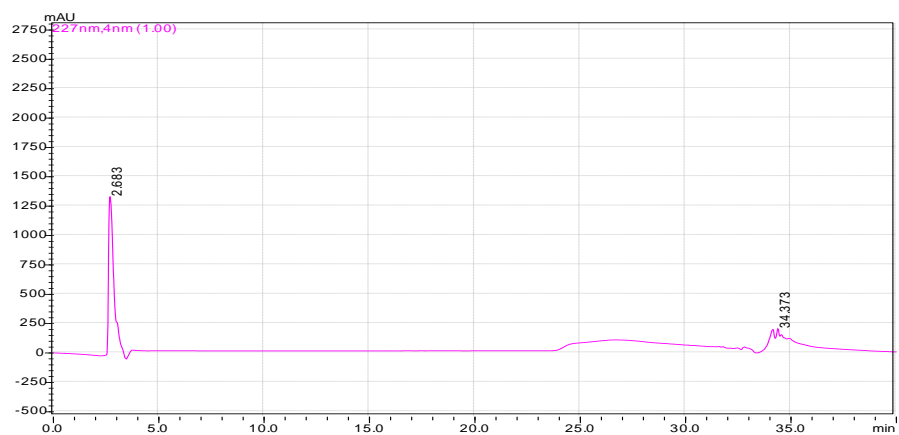
Figura 8. Esquema da extração do sotalol de uma amostra pulverizada de comprimidos comerciais.



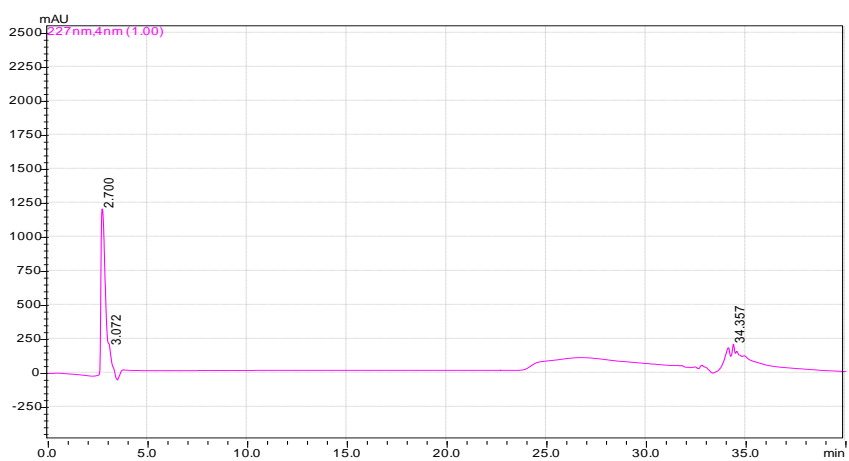
A figura 9 mostra os cromatogramas de CLAE-DAD obtidos para os padrões de cloridrato de sotalol e do fármaco após a extração utilizada. Em ambos observa-se um único pico bem definido com tempo de retenção (t_r) de 2,68 min, mostrando que o procedimento adotado foi eficiente e pode ser usado para extração da mistura racêmica de sotalol de comprimidos comerciais.

Figura 9 Cromatograma CLAE- DAD obtido para 1mg ml⁻¹ de (A) sotalol padrão e (B) sotalol extraído de comprimidos comerciais usando a extração em fase sólida com cartuchos LiChroprep RP-18

A



B



4.4.4 Construção do sensor para a determinação de Sotalol

A figura 10 mostra o sensor eletroquímico obtido pela adição da solução da nanopartícula modificada por grupos carboxilatos depositada sobre o eletrodo compósito (GECE).

Dois procedimentos foram testados nesta preparação:

Procedimento 1: Soluções contendo $100-x \mu\text{L}$ de tampão fosfato-salino (PBS) de pH7 mais $x \mu\text{L}$ de solução do padrão e $100 \mu\text{L}$ da solução de nanopartículas, que completa um volume total de $200 \mu\text{L}$, foram deixados em repouso em Eppendorf durante 30 min. A seguir $40 \mu\text{L}$ desta solução foi depositado sobre a superfície do eletrodo e deixado por 5 minutos. Finalmente, este sistema foi inserido em uma célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão junto com os eletrodos de referência Ag/AgCl e o contra-eletrodo de fio de platina.

Procedimento 2: $40 \mu\text{L}$ de solução de nanopartículas ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi depositado sobre a superfície do eletrodo compósito (GECE) e após 2 minutos o eletrodo compósito foi transferido para uma célula eletroquímica e imerso em uma solução de eletrólito suporte contendo o analito, por tempo suficiente para que ocorra a pré-concentração das soluções, correspondentes na superfície da nanopartículas (2 minutos). Após esta pré-concentração, foram realizadas as medidas eletroquímicas.

Figura 10 - Sensor eletroquímico (GEC + nanopartículas modificadas) utilizado.



4.4.5 Análise de sotalol (mistura racêmica) em amostras farmacêuticas comerciais

Amostras de 160mg do pó resultante da trituração de comprimidos de cloridrato de sotalol da marca Merck® e de um produto genérico contendo ácido esteárico, celulose monocristalina, amido, dióxido de silício e estearato de magnésio, forma pesados, devidamente tratados e analisados visando estudar as possíveis interferências na resposta do sensor. Seguindo o procedimento de extração e o procedimento de análise descrito anteriormente realizou-se a quantificação do Sotalol nas referidas formulações farmacêuticas utilizando o sensor proposto e o método de adições de padrão.

Os resultados obtidos foram comparados com o método adaptado da Farmacopeia brasileira (ANVISA, 24 2010). Para esta análise utilizou-se um cromatógrafo líquido com uma coluna C18 acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) ajustado para $\lambda = 254$ nm, sendo a fase móvel constituída por mistura de acetonitrila (ACN) : H₂O (45:5 v/v) a um fluxo de 1 mL min⁻¹.

Curvas analíticas foram construídas usando-se os padrões preparados.

4.4.6 Determinação de sotalol (mistura racêmica) em amostras de urina.

Alíquotas de 10 mL de amostras de urina de uma pessoa saudável voluntária foram coletadas e fortificadas com 1mL da solução padrão de sotalol 2×10^{-2} mol.L⁻¹. Desta solução de concentração 2×10^{-3} mol.L⁻¹ tomou-se 1 mL e diluiu-se em 8 mL de solução tampão fosfato 0,10 mol.L⁻¹ (pH 7,0). Esta solução foi transferida para a célula eletroquímica e analisada sem qualquer pré-tratamento utilizando-se a técnica de adição-padrão e o eletrodo preparado como descrito no procedimento 2.

A validação do método proposto foi obtida por análises da mesma amostra utilizando CLAE, após diluição prévia de cinco vezes e limpeza da amostra em cartucho C18 conforme mostrado anteriormente.

4.4.7 Tentativa de construção de um sensor para a determinação de sotalol enantioselectivamente: modificação do eletrodo de ouro.

O primeiro sensor enantioselectivo para Sotalol foi construído por eletropolimerização. A eletropolimerização é um processo que gera uma capa polimérica na superfície eletródica através da aplicação de varreduras de potencial elétrico sucessivas.

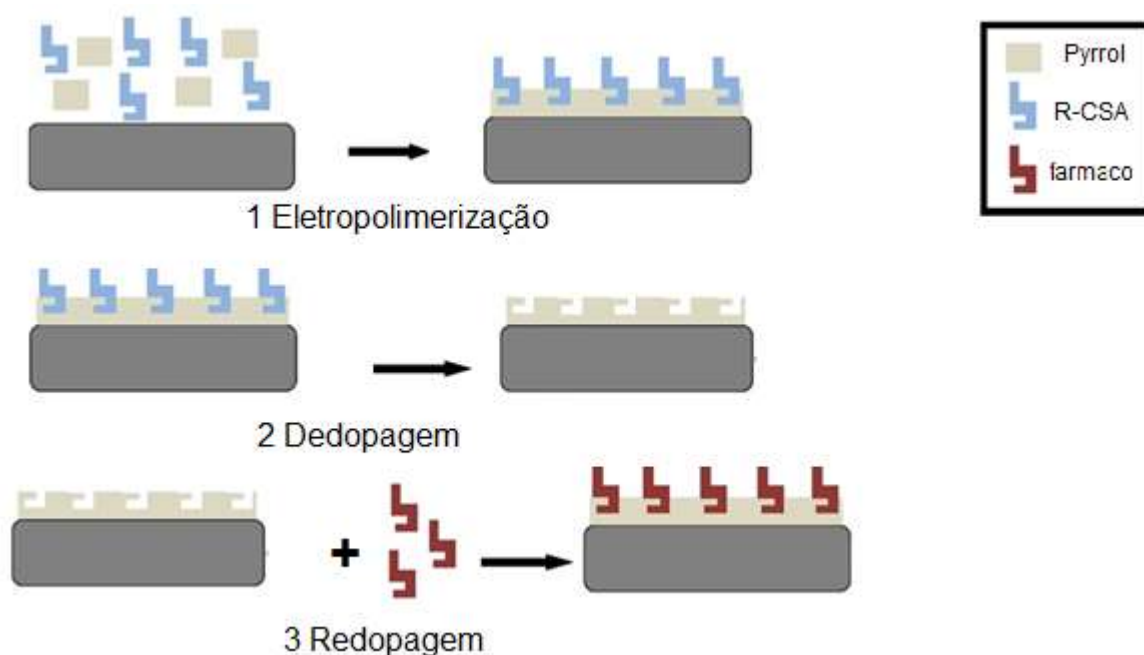
No presente trabalho procurou-se construir um filme de polipirrol (PPy) opticamente ativo com a finalidade de ser utilizado como sensor quiral. Para isso, substituiu-se os ácidos habituais empregados na síntese do PPy, por um ácido débil quiral. Utilizando essa modificação na metodologia de eletrosíntese as formas racêmicas do ácido empregado seria incorporado à matriz PPy na sua forma de contra-íon e o filme polimérico resultante adquiriria uma orientação espacial diferente.

Existem diferentes métodos para gerar o filme polimérico, entre eles encontram-se a voltametria cíclica (VC) e a voltametria diferencial de pulso (VDP), sendo a primeira delas a mais utilizada (Tian, et al., 2006)

Neste trabalho utilizou-se a eletrossíntese de um polímero condutor, na presença de um indutor quiral com objetivo de recobrir a superfície eletródica. O monômero selecionado foi o pirrol que na presença do ácido R ou S canforsulfônico (CSA), deve gerar um polímero orientado espacialmente, dependendo do enantiômero do ácido utilizado no processo da síntese.

A figura 11 mostra o esquema do que seria a determinação enantioselectiva do sotalol na presença de um ácido quiral.

Figura 11 Resumo do procedimento de síntese da malha polimérica sobre a superfície o eletrodo de ouro



A geração do polímero foi da forma potencioestática a um potencial fixo que permite o engrossamento da capa polimérica, evitando reações oxidativas de degradação próprias destes polímeros a potenciais muito elevados. Não obstante foi aplicado no início uma varredura cíclica com a finalidade de oxidar o monômero na dissolução e dar início à reação de síntese.

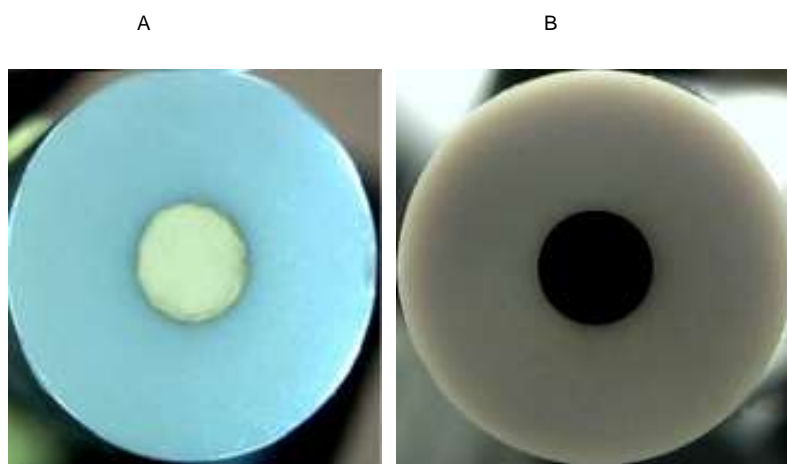
Na literatura e reportada a eletrosíntese do polipirrol com diversos ácidos, sendo o mais utilizado o H_2SO_4 (Tian, et al., 2006). Seu mecanismo de síntese tem sido amplamente descrito por diferentes autores; que também descrevem a incorporação de íons Cl^- , SO_4^{2-} ou CH_3COO^- como contra-íons dopantes do polímero sintetizado.

No presente trabalho foi comparada a eletrosíntese do polipirrol com os dois ácidos diferentes (H_2SO_4 e CSA), aplicando sucessivas varreduras cíclicas de potencial (VC) numa faixa compreendida entre 0,0 e 1,6 V empregando na mistura de polimerização 150 μL de uma solução $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol previamente purificado e 5 mL de uma solução de concentração 0.28 mol L^{-1} do ácido. A

superfície do eletrodo foi previamente polida com alumina de granulometria 1,00; 0,30 e 0,05 μm (Micropolishing Material, Buehler LTDA) prévio a cada medida.

Finalmente, as superfícies dos eletrodos (mostradas na figura 12) foram caracterizadas eletroquimicamente e os dois filmes realizados nas mesmas condições, foram analisados comparativamente. Todas as medições foram realizadas a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$).

Figura 12 Eletrodo de ouro A) sem modificação B) modificado



A voltametria cíclica foi a técnica eletroquímica utilizada para a obtenção do potencial e a corrente de pico para o sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, usando um potenciostato PAR, a cela eletroquímica constituída por um contra-eletrodo de platina, um eletrodo de referencia de Ag/AgCl e eletrodo de trabalho de ouro com área geométrica de $0,071 \pm 0,001\text{cm}^2$. Forem registradas varreduras de potencial de 0,0 V a 1,6 V mudando a velocidade de varredura de 25 a 1000 mV s^{-1} .

Para a determinação da área efetiva do eletrodo de ouro modificado foi utilizada a técnica cronocoulombimetria (CC)

Cronocoulombimetria (CC) é uma das técnicas clássicas utilizadas em eletroquímica, baseada na medição da carga (coulombs) como uma função do tempo. Consiste na aplicação de um pulso rápido - crescente de potencial ao eletrodo de trabalho e a carga elétrica que passa através deste eletrodo é medida

como uma função do tempo (J., 2001) (Bard, 2001). O análise dos dados cronocoulombimétrico estão baseados na equação de Anson (equação 3) que define a dependência do tempo da carga: (Fragkou, et al., 2012)

$$Q = 2nFAC\sqrt{D\pi t} \quad (3)$$

Portanto, a área eletroativa do eletrodo de trabalho (A) pode ser calculada a partir da inclinação da equação 3, sendo os outros quatro parâmetros (n, F, C y D) conhecidos

$$a = 2nFCA\sqrt{D}/\pi \quad (4)$$

Além do número de elétrons transferidos (n) e da constante de Faraday (F) (96,485 coulombs/mole), o coeficiente de difusão (D) para o ferrocianeto é de (7,6 x10⁻⁶ cm² s⁻¹) e a concentração do mediador (C) foi de 1,0 mol L⁻¹.

A técnica utilizada para estudar o mecanismo de reação foi a voltametria cíclica, fazendo estudos da mudança na velocidade de varredura a diferentes concentrações é possível conhecer a cinética das reações o a presença das espécies intermediárias no processo redox. Portanto é possível fazer a relação entre os sinais de corrente anódica e catódica a varias concentrações e a diferentes velocidades de varredura. Deve se lembrar que para um processos reversível $I_{pa} / I_{pc} = 1$ para a eletro -redução e $I_{pc} / I_{pa} = 1$ para a electro-oxidação, situando se no numerador do quociente a corrente devido as espécies que são geradas no eletrodo (Kiryushov, et al., 2011)

O sistema utilizado como referencia para o estudo foi Fe (CN)₆^{3-/4}, já que a transferência de carga deste sistema é dependente do material do eletrodo de trabalho e a forma de preparação dele (Kiryushov, et al., 2011)

Foram registrados voltamogramas de duas soluções de concentração equimolar de Fe (CN)₆^{3-/4} nos eletrodos modificados em diferentes velocidades de varreduras, para ver o efeito da polimerização do pirrol na presença do ácido sulfúrico e do indutor quiral CSA.

4.4.8 Construção de um sensor para a determinação de sotalol enantioseletivamente via formação de complexos.

Existem duas formas que podem ser utilizadas no uso de complexos no reconhecimento enantioseletivo. A primeira seria a modificação do eletrodo propriamente dito através de múltiplas modificações da superfície formando o complexo no mesmo corpo do eletrodo, e a segunda seria a formação do complexo de zinco com a molécula alvo e medir-se num eletrodo previamente modificado. Neste trabalho tentou-se as duas variantes de formação do complexo.

Procedimento 1. 40 μL de solução das nanopartículas ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi transferido para um tubo Ependdorff juntamente com 40 μL de uma solução $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e após 15 minutos de contato foram retirados 40 μL e depositado sobre a superfície do eletrodo compósito (GECE). Após 2 minutos, o eletrodo compósito modificado foi transferido para uma célula eletroquímica e imerso numa solução de eletrólito suporte com o analito, por tempo suficiente para que ocorresse a pré-concentração das soluções correspondentes na superfície da nanopartículas modificadas (2 minutos). Após esta pré-concentração, foram realizadas as medidas eletroquímicas.

Procedimento 2. Soluções de Sotalol de concentração conhecida foram transferidas para tubos Ependdorff contendo o dobro da concentração de Zn (II), por e deixados em contato por 15 minutos, tempo previamente determinado para que a reação ocorresse. Após esse tempo, o conteúdo do Eppendorf foi transferido para a célula de trabalho que continha o sistema eletródico completo.

Os melhores resultados forem obtidos utilizando a primeira das metodologias testadas, continuando a otimização dos restantes parâmetros com este procedimento

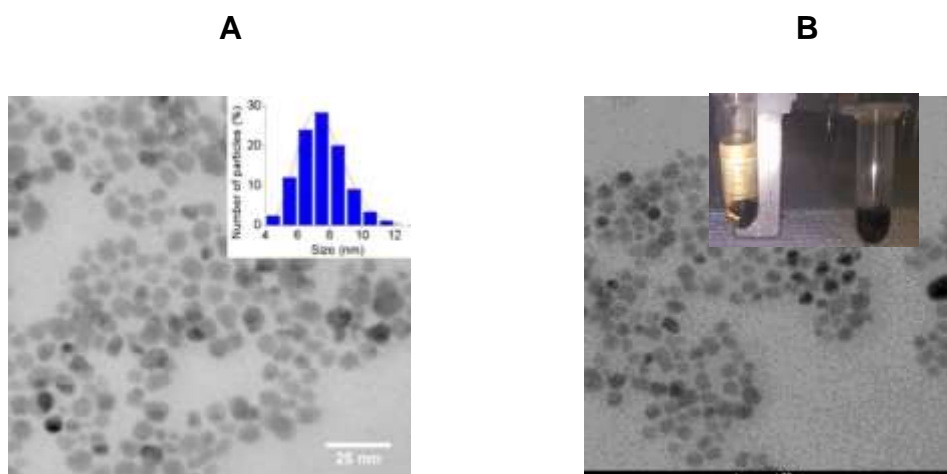
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de cada teste desenvolvido nesta tese são reportados no capítulo a continuação, sendo imprescindível começar por uma simples caracterização da superfície das nanopartículas propostas na modificação do eletrodo.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS COM GRUPOS CARBOXILATOS

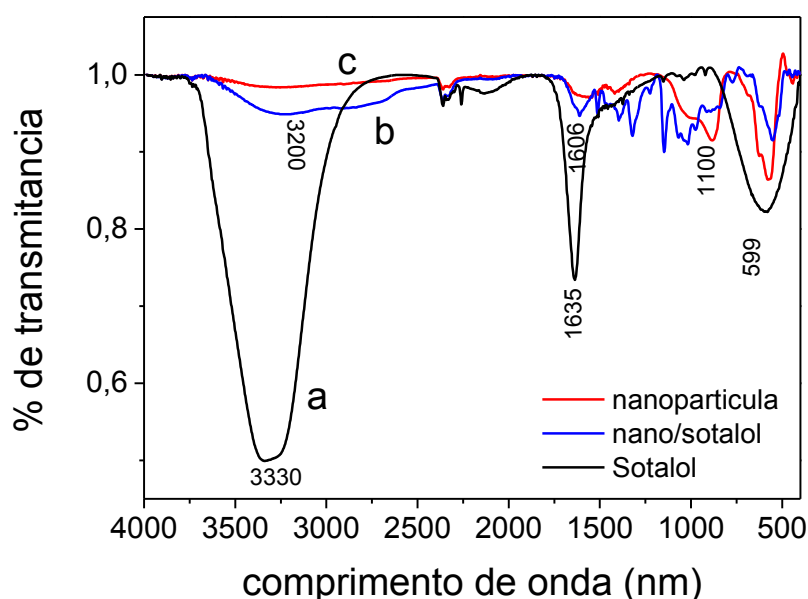
A figura 13 mostra as imagens de microscopia eletrônica de transmissões (TEM) obtidas para as nanopartículas com a superfície modificada (Curva e figura A) e para as nanopartículas modificadas carregadas com sotalol (B). Pode-se observar que as nanopartículas sintetizadas são esféricas e possuem tamanho de partícula médio de 7,5nm (figura 13A). As imagens inseridas na figura 13B mostram as nanopartículas contendo o sotalol e sua aglomeração na proximidade de um ímã externo (parte iluminada).

Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), distribuição de tamanho das nanopartícula magneticas modificadas com carboxilatos (A) e nanopartículas com o fármaco e seu comportamento magnético na presença de um ímã externo (B).



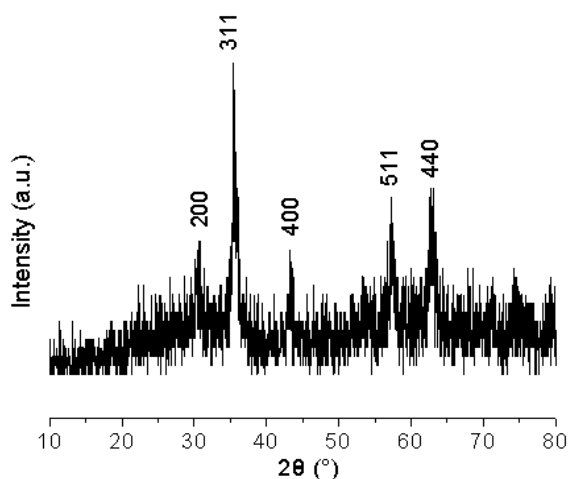
A figura 14 mostra o espectro de FTIR obtido para as nanopartículas, o sotalol e as nanopartículas depois da incorporação do sotalol. Observam-se no espectro do Sotalol as bandas características do composto, onde se sobressaem três bandas fundamentais: uma banda de absorção larga e de grande intensidade ao redor de 3330 cm^{-1} , característica do estiramento N-H das aminas secundárias e do estiramento de O-H; uma banda em 1633 cm^{-1} característica da deformação simétrica angular no plano devido ao N-H da molécula de sotalol, assim como a banda característica do grupo carboxila na faixa dos 600 cm^{-1} . No espectro das nanopartículas contendo o sotalol a primeira banda (3330 cm^{-1}) é substituída por duas bandas de absorção pequenas, alargadas e superpostas em torno de 3200 cm^{-1} que pode ser atribuída a deformação axial do O-H) (Silverstein, 2005). Além disso, as bandas observadas em torno de 1200 cm^{-1} atribuída ao estiramento do carboxilato presente na superfície da nanopartícula. Por sua parte a nanopartícula tem uma banda bem definida nos 1100 cm^{-1} características do -OH que diminui após a reação com o fármaco. Tudo isso sugere a interação entre o fármaco e as nanopartículas devida possivelmente a uma interação entre os grupos carboxilato da nanopartícula e amina do fármaco.

Figura 14 Espectro de FTIR do cloridrato de sotalol (a), nanopartícula em contato com sotalol (b) e nanopartícula magnética (c)



A Fig.15 mostra um difratograma de raios-X obtido para as nanopartículas. Os picos de difração a $2\theta = 26,27, 43,42$ e $53,92$ são atribuídos ao Fe_2O_3 presente na nanopartícula magnética (Bezerra, et al., 2010).

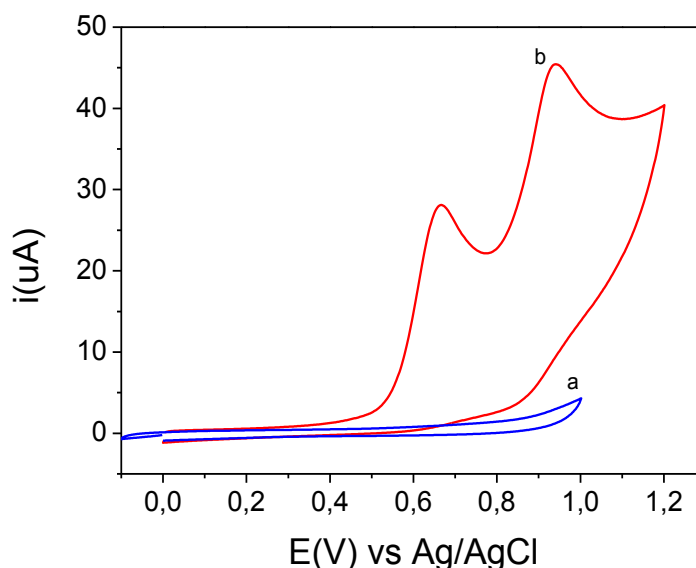
Figura 15. Difratograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética de Fe_2O_3 .



5.2 OXIDAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE CLORIDRATO DE SOTALOL

A figura 16 mostra um voltamograma cíclico obtido para uma solução 1×10^{-5} molL⁻¹ de cloridrato de sotalol em solução-tampão de fosfato (pH7) obtido com o eletrodo de carbono compósito (GECE- linha vermelha). Como pode ser observado o sotalol é oxidado em duas etapas bem definidas, em potenciais +0,70 V e +0,95 V, respectivamente. Na varredura reversa de potencial não se observa nenhum pico de redução bem definido do(s) produto(s) gerado(s), demonstrando que a oxidação do fármaco ocorre de forma irreversível (J., 2001) (Bard, 2001).

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos sobre eletrodo de compósito (GECE) em solução-tampão fosfato (pH7) na ausência (a) e na presença de sotalol na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ (B): velocidade de varredura (v) = 50 mV s^{-1}



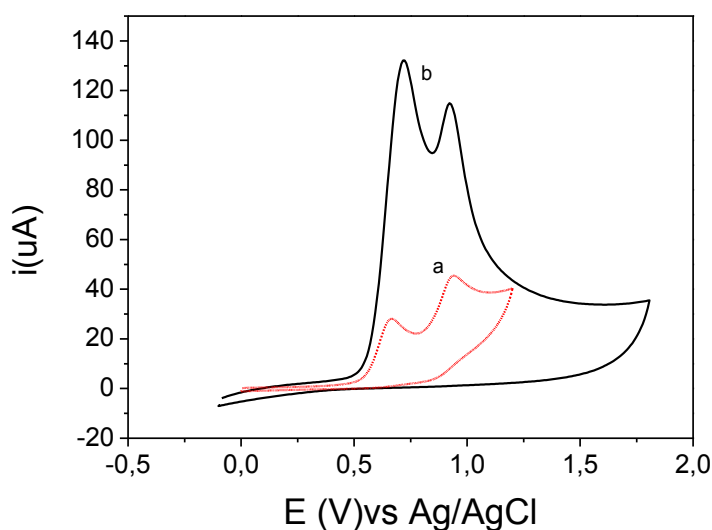
Ambos os picos I e II mostram correntes anódicas de igual intensidade, sugerindo que o número de elétrons transferidos em cada etapa é o mesmo. Por outro lado, para os 2 picos observa-se que os valores de $E_p - E_{1/2} = 50 \text{ mV}$, sendo o potencial de meia onda aquele referente a 84,5% da corrente de pico nos voltamogramas cíclicos. Sabendo-se que $E_p - E_{1/2} = 59 \text{ mV}/an$ tem-se que $an = 0.85$ em cada etapa de oxidação, o que sugere que o sotalol é oxidado em duas etapas com transferência de um elétron em cada uma (J., 2001)(Bard, 2001).

A figura 17 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de sotalol em solução-tampão de fosfato (pH7) sobre eletrodo compósito (GECE) antes (Curva a) e após modificação com nanopartículas magnéticas carboxiladas (MNPs) (Curva b): velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Os resultados evidenciam que mesmo na presença de nanopartículas magnéticas carboxiladas (MNPs), o sotalol é oxidado em duas etapas em potenciais de 0.70 V e a 0.90 V. No entanto, as correntes de pico observadas com o uso do eletrodo modificado são cerca de 5 vezes maiores que no eletrodo sem modificação, indicando que o fármaco é pré-concentrado no eletrodo modificado pelas

nanopartículas magnéticas. Nenhum pico de redução foi observado na varredura reversa demonstrando que o processo é igualmente irreversível. Observa-se ainda um pequeno deslocamento anódico do primeiro pico.

Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtido para $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de sotalol em solução-tampão fosfato 0.10 mol L^{-1} (pH 7) sobre eletrodo compósito antes (a) e após modificação com nanopartículas magnéticas carboxiladas (b): velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} .

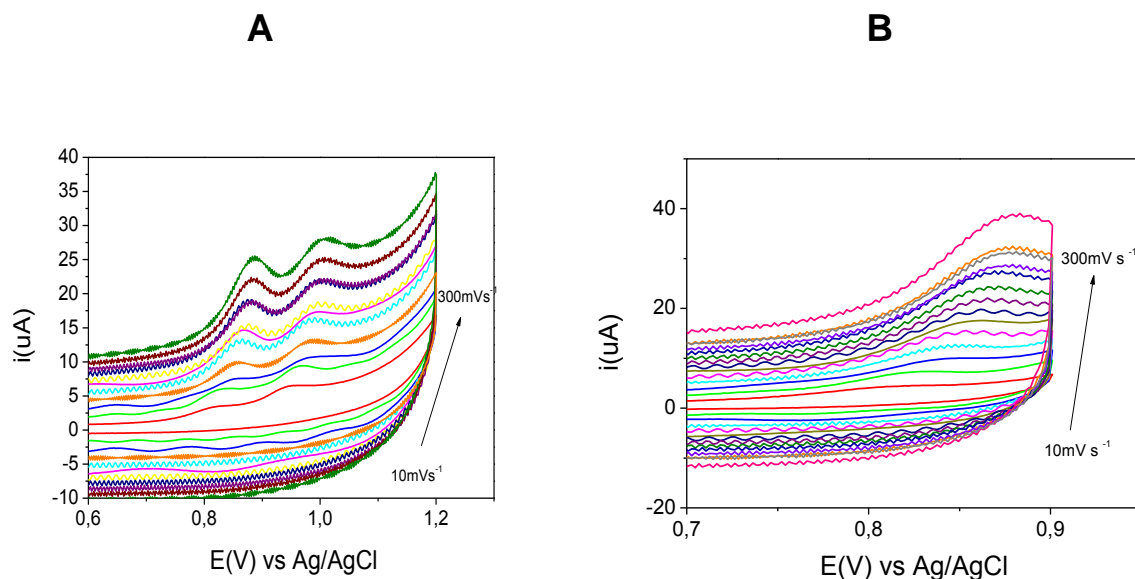


5.3. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE POTENCIAL (v).

A influência da velocidade de varredura (v) foi investigada no intervalo de 10 a 300 mV s^{-1} , registrando-se os voltamogramas cíclicos correspondentes à oxidação de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do cloridrato de Sotalol em solução-tampão de fosfato sobre o eletrodo compósito modificado com nanopartículas carboxiladas com o término da varredura a potenciais de $+0,9 \text{ V}$ (A) e a $+1,2 \text{ V}$ (B). Os respectivos voltamogramas cíclicos são apresentados na figura 18.

Os valores de corrente de pico aumentam com o aumento da velocidade de varredura para ambos os picos e nenhum pico de redução é observado na varredura reversa de potencial.

Figura 18 (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do fármaco sotalol em solução tampão fosfato (pH 7) obtido com o eletrodo compósitos em diferentes velocidades de varredura do potencial entre $E_i = 0,3$ e $E_f = 1,2$; (B) Voltamogramas cíclicos obtidos entre os potenciais. $E_i = 0,3$ $E_f = 0,9$



A figura 19A mostra que a corrente do primeiro pico de oxidação (+0,70), experimenta uma variação linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) em todo o intervalo de varredura estudado, seguindo a equação: $I_p \text{ (I) } (\mu\text{A}) = 2,2075 - 6,463 v \text{ (mV s}^{-1})$ $r^2 = 0,9954$. Para o segundo pico (figura 19 B) esta relação é também linear e segue a equação: $I_p \text{ (II) } (\mu\text{A}) = 2,2793 \mu\text{A} - 7,786 v \text{ (mV s}^{-1})$ $r^2 = 0,9977$. Este comportamento é típico de processos controlados por difusão. A comparação entre as inclinações das curvas correspondentes aos dois picos (figura 20) mostra um comportamento similar, indicando que provavelmente há a transferência eletrônica de 1 elétron em cada etapa.

Figura 19 (A) Relação entre as correntes de pico e $v^{1/2}$ medidas para o primeiro e o segundo picos e respectivas equações. A – relações obtidas para o primeiro pico $E_1(V) = 2,2075 (v^{1/2}) - 6,4636$. B - Relações obtidas para o segundo pico $E_2(V) = 2,2793 (v^{1/2}) - 7,786$

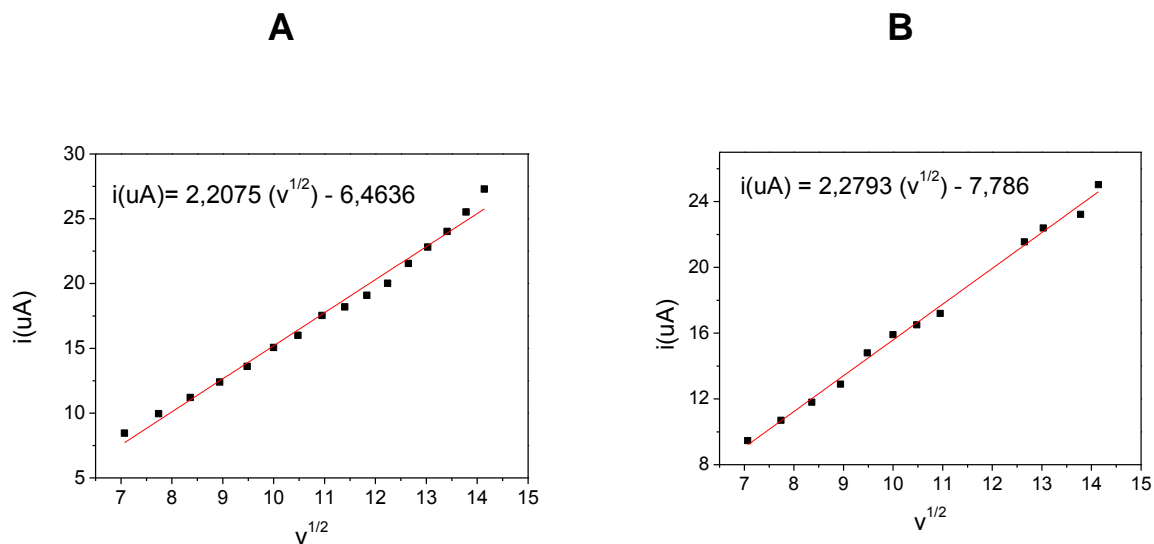
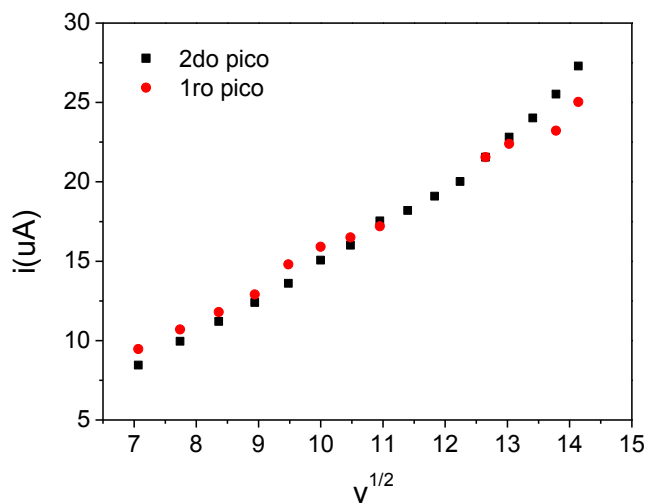


Figura 20. Comparação entre os comportamentos reportados na Figura 19.



5.4. EFEITO DO PH

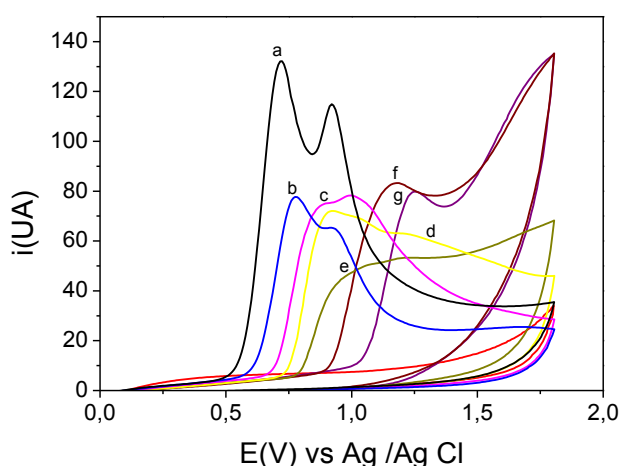
O efeito da variação de pH sobre os voltamogramas cíclicos obtidos para Sotalol foram investigados no intervalo de pH 2 a 12, utilizando-se uma concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de Sotalol em solução-tampão Britton-Robinson $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7) e velocidade de varredura de 50 mVs sobre eletrodo de carbono vítreo. A figura 21 apresenta os perfis definidos em função do pH.

Em meio ácido ($\text{pH} \leq 6$), o processo apresenta apenas uma onda de oxidação que sofre deslocamento catódico e se desdobra em duas ondas a partir de $\text{pH} \geq 7$. Em qualquer valor de pH não se observa nenhum pico na varredura reversa.

O deslocamento catódico (para potenciais menos positivos) quando o pH se torna mais alcalino, indica que o mecanismo de reação eletródica é dependente do pH do meio, comportamento similar ao que ocorre em reações onde há pré-protonação do analito (J., 2001) (Bard, 2001).

No intervalo de pH estudado, duas inclinações foram obtidas: a primeira ($q_I = 66,93 \text{ mV/pH}$) entre pH 2 e 7, sugerindo a liberação de 1 elétron e 1 próton por molécula oxidada e a segunda ($q_{II} = 34,50 \text{ mV/pH}$), entre pH 8 e 12, sugere a saída de 2 elétrons e 1 próton.

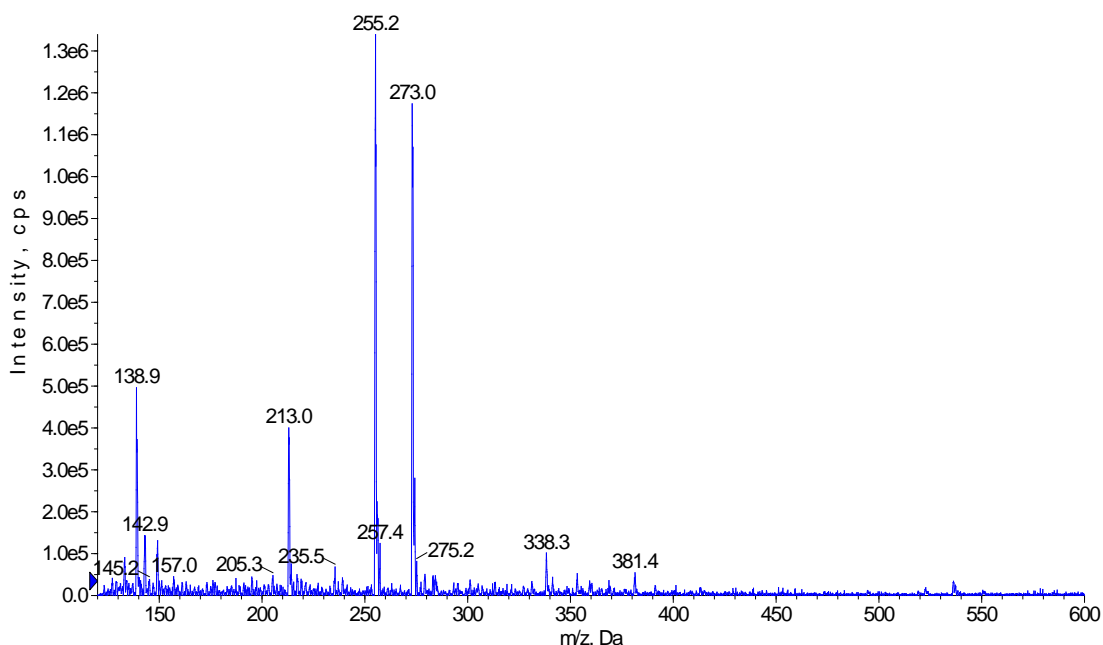
Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação do fármaco Sotalol sobre o eletrodo de carbono vítreo para $0,05 \text{ V s}^{-1}$ numa solução tampão Briton Robinson entre os pH 2-12 a) pH 12,0; b) pH 10,0; c) pH 8,0; d) pH 7,0; e) pH 6,0; f) pH 4,0 e g) pH 2,0.



No intuito de determinar o possível mecanismo e determinar as espécies produzidas durante o processo de oxidação no eletrodo compósito, foi realizada eletrólise a potencial controlado do fármaco cloridrato de sotalol em uma célula eletroquímica de 75 ml que continha o eletrodo de trabalho de malha de platina, eletrodo auxiliar (lâmina Ti / Ru de 25 cm²) e referência (Ag | AgCl, KCl₃ mol L⁻¹). Os eletrodos foram submergidos numa solução-tampão de fosfato 0.10 mol L⁻¹ (pH7.0). Foram feitas curvas de corrente vs tempo, aplicando-se um potencial fixo de 0,85 V, para o primeiro pico e 1,0V no caso do segundo pico, ambos experimentos foram feitos por um tempo de 3 horas. As duas soluções resultantes da eletrólise foram analisadas no LC-MS/MS

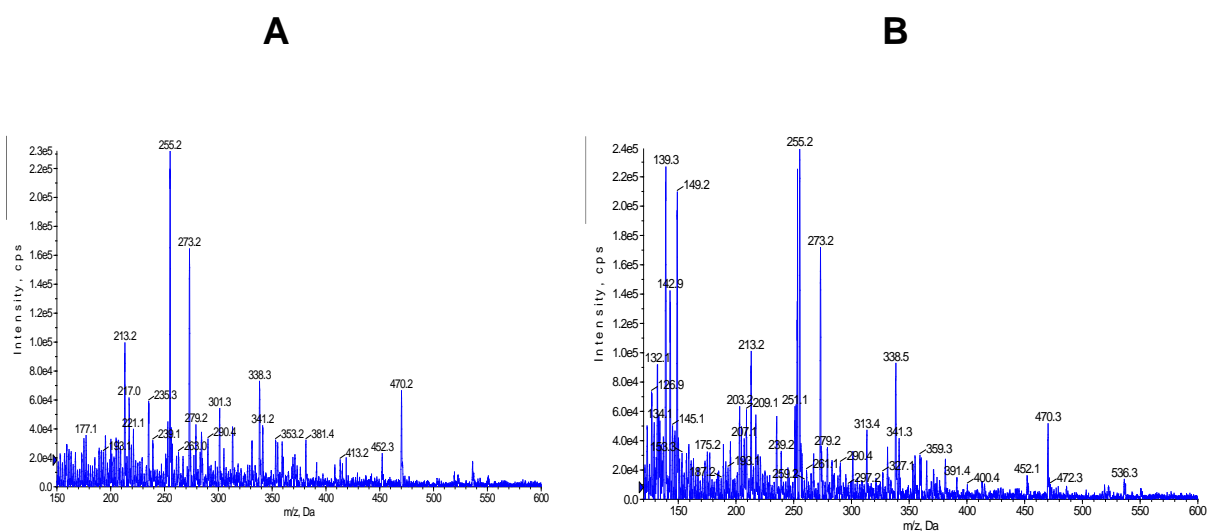
Os respectivos espectros de massas são apresentados na figura 22.

Figura. 22. Espectro de massas obtidos para amostras-padrão de sotalol.



O espectro obtido apresenta um pico com m/z 273 atribuído ao sotalol (MM = 272). A figura 23 mostra os espectros de massas correspondentes aos produtos obtidos após eletrólise a 0,85 e a 1,0V.

Figura.23. Espectros de massas obtidos para amostras-padrão de sotalol pré-oxidadas a potencial de (A) 0,85 V e (B) 1,0V



A análise destes espectros indica que parte do fármaco foi oxidada, porém ainda há resíduos de sotalol detectado em m/z 273. No entanto observa-se a ocorrência de dois picos não identificados no espectro do sotalol. Outra conclusão importante desse experimento é que os dois espectros são bem parecidos devido provavelmente a um mecanismo em duas etapas consecutivas onde, num primeiro momento ocorreria a formação de um radical, (com grande possibilidade de oxidação do grupo hidroxila do sotalol), cujas espécies envolvem um equilíbrio de protonação, segundo o mecanismo embaixo:



Na equação (5) observa-se que o equilíbrio da protonação da função hidroxila no sotalol ocorre próximo do $\text{pK}_a = 8.3$ (Norouzi, et al., 2008). Deste modo, em meio ácido observa-se apenas uma onda de oxidação porque a função hidroxila encontra-se totalmente protonada. Em valores de pH alcalino, observa-se que as duas ondas

de oxidação podem ser atribuídas à espécie não protonada que seria oxidada em potenciais menos positivos (pico II)

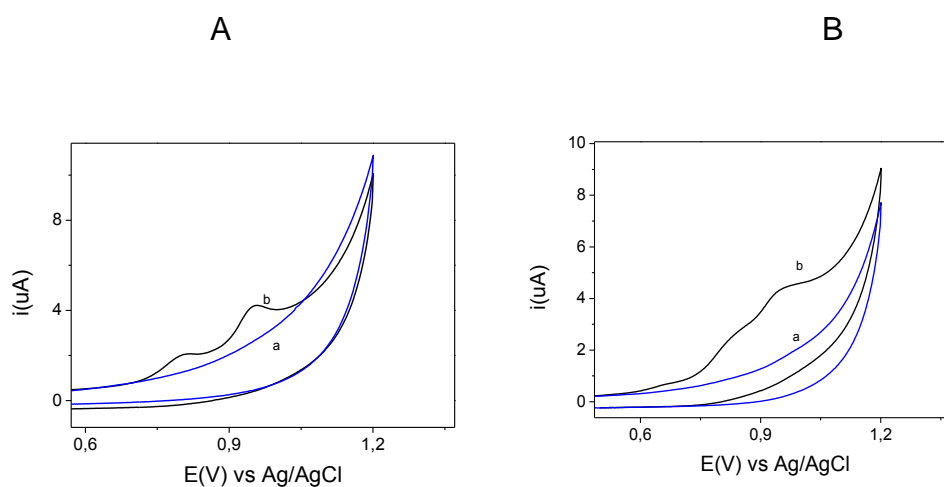
Nas medidas subsequentes, embora tenhamos observado que o pico tem maior intensidade em valores de pH 12, o mesmo foi descartado em virtude de possíveis reações de hidrólise do fármaco. Deste modo, escolheu-se para medidas posteriores o valor de pH 7 por estar mais perto do pH fisiológico e apresentar boa intensidade de corrente e boa resolução do pico.

5.5. EFEITO DO ELETRÓLITO DE SUPORTE

O efeito do eletrólito foi investigado comparando-se o comportamento voltamétrico do fármaco em solução-tampão de fosfato e em solução-tampão de Britton-Robson como mostrada na figura 24, ambos a pH 7,0.

A figura 24 mostra os respectivos voltammogramas obtidos para soluções $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, do fármaco pré-concentrado no eletrodo compósito com nanopartículas magnéticas modificadas com carboxilatos. Pode se observar que o tampão fosfato apresenta melhor resolução de ambos os picos e portanto foi escolhido para as medidas posteriores.

Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos para solução $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de sotalol em: (A) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ da solução de tampão fosfato (pH 7) e (B) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ da solução tampão B-R . Velocidade de varredura (v) de 20 mVs^{-1}



5.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ELETRODO.

No intuito de determinar a área efetiva do eletrodo compósito modificado, foi realizado um experimento registrando voltamogramas do eletrodo modificado em diferentes velocidades de varredura da solução equimolar de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$

A área ativa do eletrodo modificado foi calculada usando a equação de Randles-Sevcik (Pingarrón Carrazón, et al., 2003)

$$i_p = 0,4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D^{1/2} c v^{1/2} \quad (6)$$

onde

i_p = intensidade da corrente de pico *

[A], n = número de elétrons intercambiados

A = área superficial do eletrodo [cm^2]

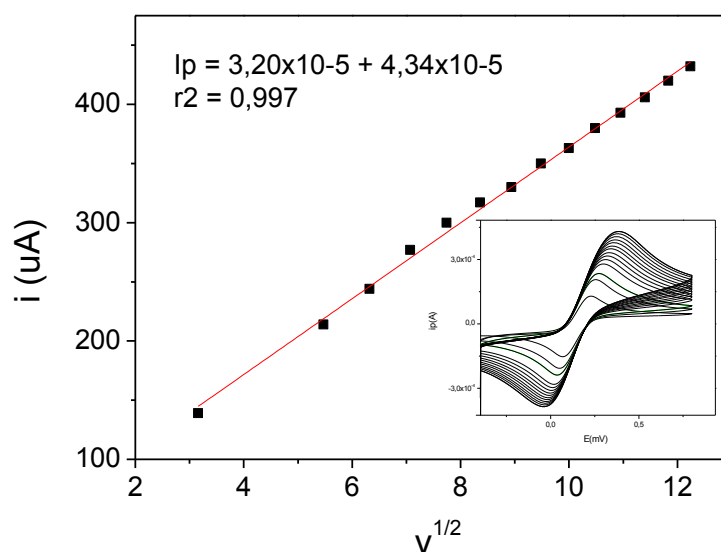
D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]

C = concentração da espécie eletroativa [mol cm^{-3}]

v = velocidade de varredura [V s^{-1}].

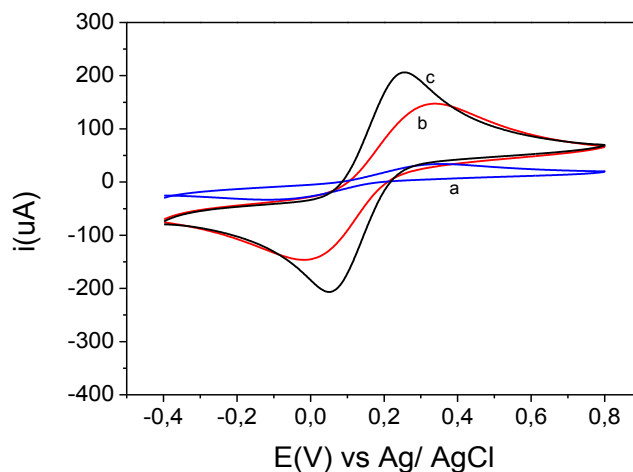
Tomando-se os voltamogramas cíclicos para uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potasio em solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de KCl, como modelo e considerando que o coeficiente de difusão do hexacianoferrato é de $7,6 \text{ mm}^2 \text{s}^{-1}$ obteve-se (figura 25) foi calculada a área ativa para o GECE/MNPs como sendo de $0,19 \text{ cm}^2$.

Figura 25 Relação entre a corrente de pico e $v^{1/2}$ e voltamogramas cíclicos para $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl



Nesta mesma solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo hexacianoferrato (III) de potássio, foram registrados os voltamogramas a modo comparativo dos eletrodos de carbono vítreo, do eletrodo GECE e do eletrodo GECE/MNPs. Como mostra a figura 26 o melhor comportamento foi conseguido com o uso do ECE/MNPs.

Figura 26 Voltamogramas cíclicos de uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de hexacianoferrato (III) de potássio em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl para os eletrodos a) eletrodo de carbono vítreo, b) eletrodo GECE e c) eletrodo GECE/MNPs.

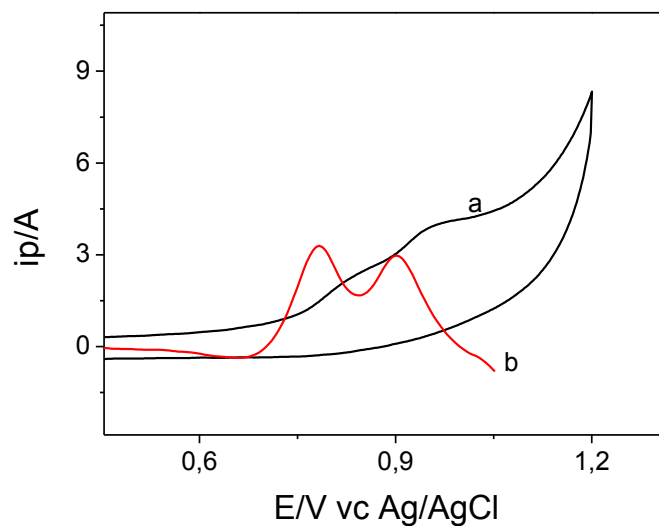


5.7 OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SENSOR

A fim de diminuir os níveis de detecção do fármaco em meio aquoso, diferentes modos de varredura foram testados para melhorar a sensibilidade do método. A figura 27 mostra a respectiva curva obtida para $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Sotalol em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ da solução de tampão fosfato (pH 7) no modo de voltametria de varredura linear (v 20 mVs^{-1}) e em voltametria de pulso diferencial

Observa-se um aumento ao redor de 100 % da corrente do primeiro pico anódico quando se usa a voltametria de pulso diferencial (VDP) em relação a análise por voltametria cíclica (VC), e, portanto este modo foi escolhido para as medidas de quantificação do fármaco.

Figura 27. Voltamogramas cíclicos (a) e em pulso diferencial (b) de uma solução $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de Sotalol em 0.1 molL^{-1} de solução tampão fosfato (pH 7.0).



5.7.1 Ajuste das condições instrumentais

Foram investigadas as melhores condições experimentais para determinação de solatol usando a voltametria de pulso diferencial. Os seguintes parâmetros foram investigados: frequência de aplicação dos pulsos, amplitude de pulsos e incremento de varredura, e os melhores valores obtidos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros da voltametria de pulso diferencial avaliados e melhor definição para a oxidação de sotalol em solução-tampão de fosfato de pH 7,0.

Parâmetros (Voltametria diferencial de pulso)	Intervalo de Estudo	Melhor definição
Frequência (f)	10 – 70 s ⁻¹	50
Amplitude (a)	10 – 100 mV	70
Velocidade de varredura (v)	25–100 mVs ⁻¹	50

Assim as condições utilizadas nas determinações do fármaco sobre o eletrodo compósito foram modificados com nanopartículas magnéticas: $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

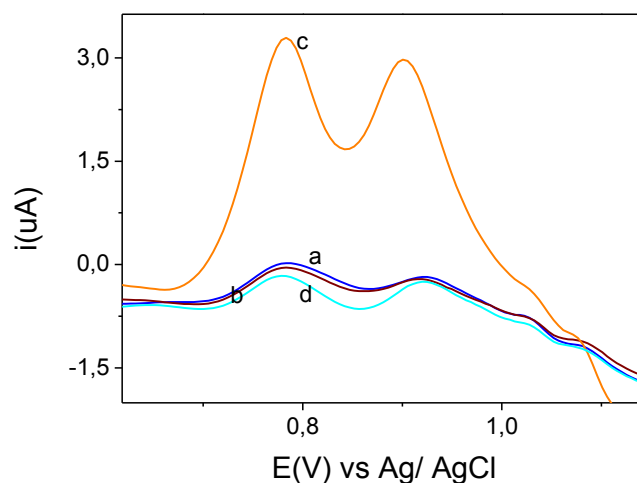
5.7.2 Efeito da concentração das nanopartículas magnéticas.

A influencia da quantidade de nanopartículas magnéticas modificadas com o grupo carboxilato foi investigada, mantendo-se constante a concentração de solatol em $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato de pH 7, utilizando a técnica de pulso diferencial e adições de nanopartículas entre 0 a 40 μL .

A figura 28 mostra os respectivos voltamogramas obtidos.

Observa-se que em volumes menores que 40 μL a corrente de pico aumenta muito pouco e em volumes superiores a este as nanopartículas aparentemente não ficam retidas no eletrodo. Deste modo a melhor condição foi obtida para $4 \times 10^{-4} \text{ mg}$ de nanopartículas que correspondem a 40 μL da solução utilizada.

Figura 28. Voltamograma de pulso diferencial registrado para $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de concentração de Sotalol em $0,1 \text{ molL}^{-1}$ de solução-tampão fosfato (pH 7.0) e concentrações de a) 2×10^{-4} b) 3×10^{-4} c) 4×10^{-4} d) 5×10^{-4} mg de nanopartículas sob as condições otimizadas e já descritas.



5.8. QUANTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL

A figura 29 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para oxidação de Sotalol entre concentrações de $9,9 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$. A análise destes voltamogramas indica que ambos os picos anódicos aumentam em função da concentração de Sotalol e poderiam ser utilizados para quantificação. Considerando a facilidade de operar a linha de base e às maiores correntes obtidas optou-se por construir a curva de calibração, (mostrada na figura 30) a partir do pico II. Sob as condições otimizadas as correntes do picos correspondente ao potencial de 0.92 V em relação à concentração de sotalol mostraram um comportamento linear de acordo com a equação da regressão $i_p \text{ (A)} = 0,141 C_{\text{Sot.}} + 1,52 \times 10^{-8}$, $r^2 = 0,99972$ para $n = 5$. O limite de detecção foi estimado em $0,015 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação em $0,055 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Sinal / ruído = 5).

Figura 29 Perfil dos voltamogramas em pulso diferencial obtidos para o sensor nas condições eletroquímicas: $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ mV}$ e velocidade de varredura = 50 mVs^{-1} . a) $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, b) $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, c) $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, d) $6,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e) $8,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, f) $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

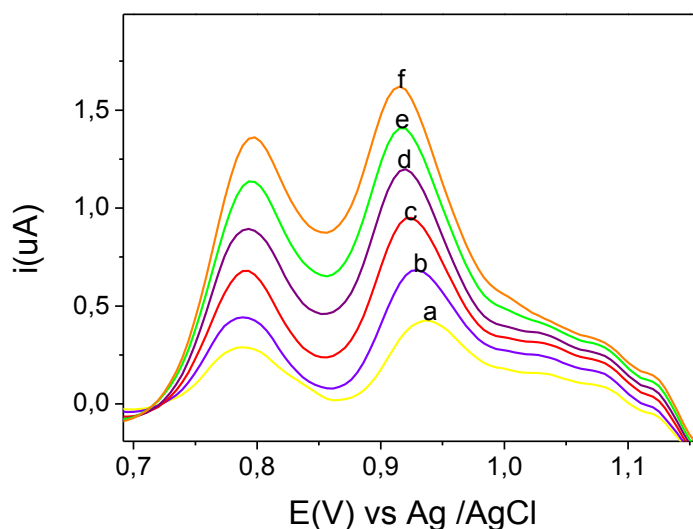
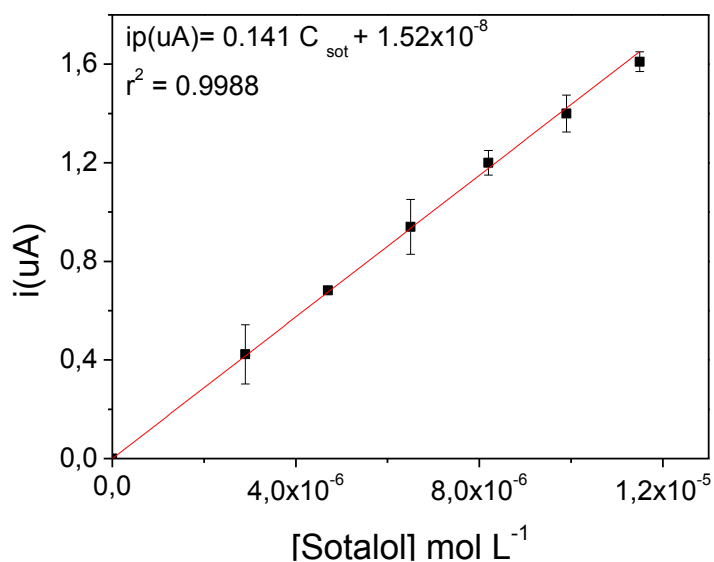


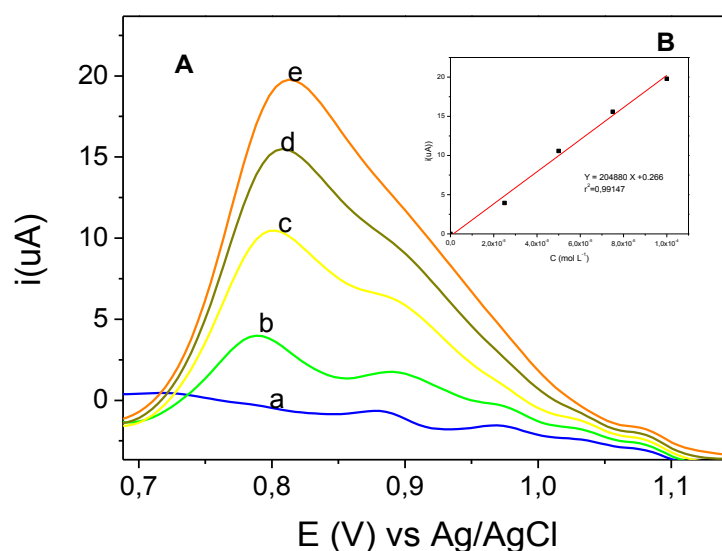
Figura 30 : Curva analítica obtida a partir dos dados apresentados na Fig. 29. Barra de erros correspondente a triplicatas das análises.



Curvas analíticas para concentrações mais elevadas do fármaco exigiram monitoramento apenas do pico I, pois o pico II perde a definição em concentrações

superiores a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Para estes casos, a figura 31 mostra os voltamogramas (Curva A) e a respectiva curva analítica (Curva B).

Figura 31 (A) Perfis voltamétricos em diferencial de VDP dos resultados obtidos com o sensor desenvolvido na faixa de concentrações compreendida entre 25×10^{-5} e $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (B) curva analítica correspondente aos voltamogramas mostrado em (A) sob as condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3 \text{ V}$; $E_f = 1,2$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ m V}$ e $SR = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

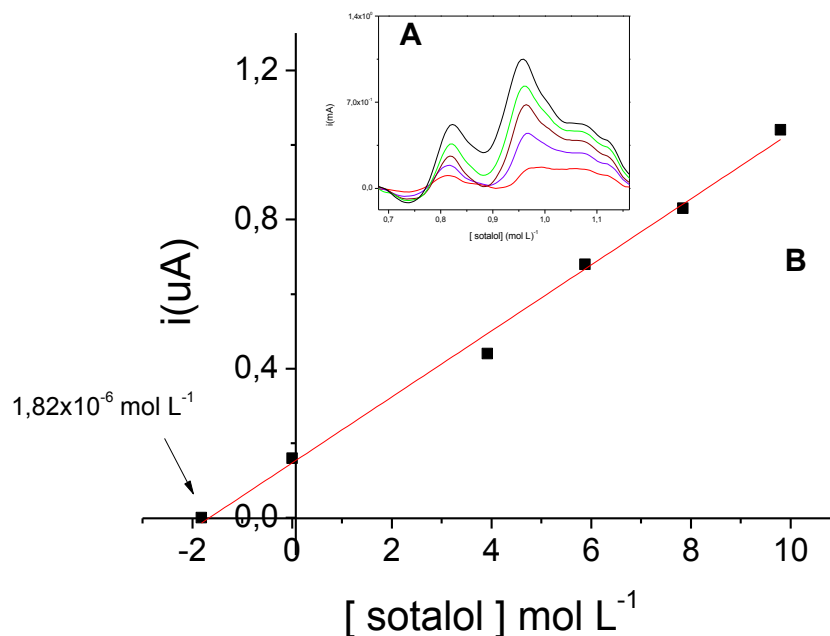


A eficiência do método na determinação de sotalol em meio aquoso foi analisada testando-se a recuperação de padrões. Para isto, amostras de água pura foram contaminadas propositalmente com $1.96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de sotalol. A seguir as amostras foram submetidas à análise segundo a metodologia proposta.

A figura 32 mostra a curva de adição de padrão obtida e os voltamogramas obtidos por VDP.

Os resultados obtidos indicaram uma recuperação de $1,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, representando valores médios de 93%. Estes resultados indicam que o método proposto apresenta boa recuperação para as concentrações testadas.

Figura. 32 (A) voltamogramas obtidos para amostras de água contaminadas propositalmente com 1.96 mol.L^{-1} de sotalol e submetidas a adição de padrão (B) Curva de adição de padrão e recuperação do padrão.



A Tabela 3 apresenta a comparação dos resultados obtidos com o eletrodo proposto e com outros sensores para Sotalol desenvolvidos e publicados na literatura. Como se pode observar, o sensor desenvolvido mostrou-se promissor frente aos outros sensores eletroquímicos, principalmente no que se refere ao melhor desempenho analítico e à capacidade de realização de inúmeras análises, mediante a simples renovação da superfície do eletrodo, o que diminui o custo por análise e, portanto, possibilita maior acessibilidade.

Tabela 3: Comparação do sensor proposto com outros sensores reportados na literatura.

Técnica	Tipo de eletrodo	Limite de detecção (mol L⁻¹ x 10⁻⁶)	Faixa Linear (mol L⁻¹ x 10⁻⁶)	Ref
Voltametria Cíclica	Microeletrodo de Ouro	3,49	1,1-50	NOROUZI, 2008
Voltametria Cíclica	Nanopartículas de cobre-nanocompósito	1,89	100-1283	HOSSEIN H.,2013
Voltametria Cíclica	NiFe ₄ O ₄ -MWCT Eletrodo de carbono vitreo modificado	0,09	0,5-1000	ALI A. 2013
Diferencial de Pulso	Eletrodo de carbono epoxy modificado com nanopartículas magnéticas(GCE/MNPs)	0,015	0,2 - 1200	Este método

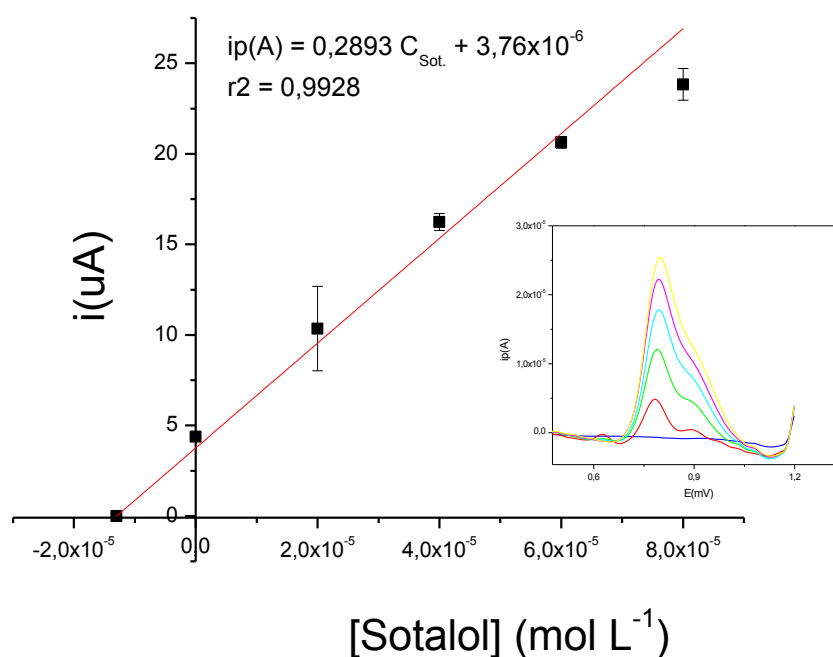
5.9 APLICAÇÃO DO SENSOR NA ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS.

A quantificação deste fármaco nos medicamentos foi realizada em triplicata e usando o método da adição de padrão para se avaliar, evitar e prevenir o efeito matriz.

A figura 33 mostra as respostas típicas do sensor e a correspondente curva de adição de padrão obtidas por VPD para amostras do fármaco. Pode-se observar que a sensibilidade obtida na adição de padrão foi similar a da curva de calibração (Fig.30) mostrando que no caso das amostras de fármacos o sensor não apresentou efeito de matriz. Entretanto este resultado já era esperado, uma vez que, na

presença dos excipientes dos medicamentos, o sensor não mostrou nenhuma resposta. Desta forma, amostras farmacêuticas poderão ser analisadas usando a curva analítica, facilitando a realização da medida.

Figura 33 - Curva de adição de padrão e curvas voltamétricas obtidas em VDP com o sensor desenvolvido para as amostras do fármaco, nas condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3 \text{ V}$; $E_f = 1,2$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ m V e}$ $SR = 50 \text{ mVs}^{-1}$. (n=3)



Os resultados encontrados com o eletrodo nanoestruturado foram comparados com CLAE-UV (método oficial de análise) e são mostrados na tabela 4

Tabela 4 : Resultados obtidos na análise de formulações farmacêuticas através do sensor eletroquímico desenvolvido frente à CLAE.

Amostras	Valor nominal ^a	Metodologia proposta ^{a,b}	Metodologia oficial (HPLC) ^{a,b}	Teste-t ^c (2,776)	Teste-F ^d (19,00)
Comprimido genérico	160	165 ± 3	170 ± 3	2,041	1,00
Comprimido Merck	160	172 ± 2	168 ± 3	2,229	3,86

a $\mu\text{mol L}^{-1}$.

b Valor médio \pm desvio padrão considerando três determinações independentes (n=3).

c Valor crítico de teste-T pareado para o nível de confiança de 95 % e .

d Valor crítico de teste-T pareado para o nível de confiança de 95 % e .

Como podem ser observado os teores de cloridrato de sotalol obtidos para os medicamentos analisados pelo método proposto foram similares àqueles obtidos por CLAE, evidenciando a confiabilidade nesta metodologia.

5.10 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA NA ANÁLISE DE SOTALOL EM URINA HUMANA.

A aplicabilidade do eletrodo desenvolvido em amostras biológicas foi avaliada preparando-se o sensor e emergindo-o diretamente na urina contaminada com concentração conhecida do Sotalol. A análise foi feita conforme descrito previamente.

Para isto, inicialmente analisou-se a amostra de urina sem a adição do fármaco, na qual não foi observado nenhum sinal eletroquímico, evidenciando que os compostos contidos na urina não interferem na resposta do sensor. Em seguida, realizou-se o estudo de recuperação do sotalol utilizando uma concentração conhecida do fármaco e os resultados são mostrados na tabela 4.

A figura 34 mostra os voltamogramas da adição e a curva de adição de padrão correspondentes.

Figura.34 Curva de adição de padrão e voltamogramas obtidos em VDP para as amostras de urina, nas condições de análise propostas. Condições eletroquímicas: $E_i = 0,3 \text{ V}$; $E_f = 1,2$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 70 \text{ m V}$ e $SR = 50 \text{ mVs}^{-1}$. ($n=3$)

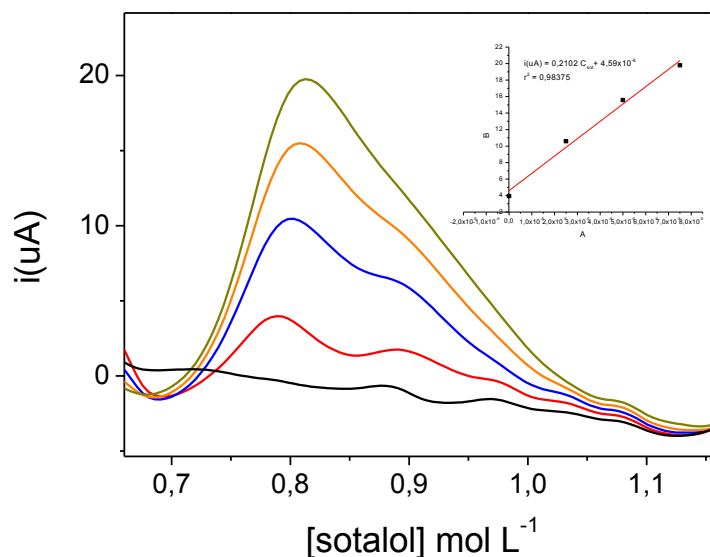


Tabela 5: Resultados obtidos na análise de urina humana através do sensor eletroquímico desenvolvido e aquelas obtidos por CLAE.

Amostras	Valor nominal ^a	Metodologia proposta ^{a,b}	Metodologia oficial (HPLC) ^{a,b}	Teste-t ^c (2,776)	Teste-F ^d (19,00)
Urina (fortificada)	100	98 ± 3	95 ± 2	1,441	2,25

a $\mu\text{mol L}^{-1}$.

b Valor médio \pm desvio padrão considerando três determinações independentes ($n=3$).

c Valor crítico de teste-T pareado para o nível de confiança de 95 % e .

d Valor crítico de teste-T pareado para o nível de confiança de 95 % e .

Os resultados obtidos demonstram que os dois resultados são estatisticamente iguais, ou seja, o sensor desenvolvido pode ser usado no monitoramento de sotalol em amostras de urina sem qualquer pré-tratamento.

5.11 MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO DE OURO, PARA A DETERMINAÇÃO ENANTIOSELETIVA DE SOTALOL.

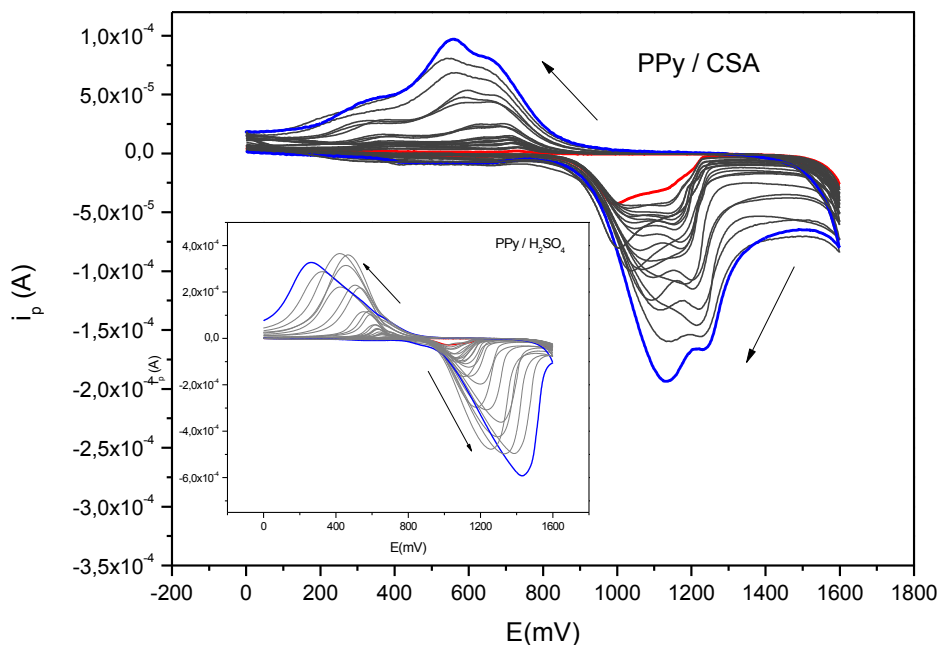
O filme polimérico de polipirrol (PPy) foi gerado utilizando a técnica descrita no capítulo de procedimentos utilizando os dois ácidos em estudo (H_2SO_4 e CSA).

A técnica utilizada para estudar o mecanismo de reação foi a voltametria cíclica, já que proporciona informação rápida sobre o comportamento redox das espécies e as reações químicas envolvidas (mecanismos de reação, reações química acoplada) e a determinação dos parâmetros termodinâmicos. Além disto, permite eletrolisar uma espécie e inverter o potencial para verificar a formação do par redox podendo-se desta forma inferir o mecanismo da reação.

De forma comparativa, na figura 35 mostra-se o comportamento do PPy na presença de ferri/ferrocianeto de potássio $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ meio de H_2SO_4 0.1 mol L^{-1} a partir de 0.14 mol L^{-1} de pirrol previamente purificado. A eletrossíntese do PPy em H_2SO_4 acontece também em meio CSA como pode se deduzir da similitude entre ambos os voltamogramas e concretamente dos pares redox indicativos da interconversão dos distintos estados de oxidação do polímero, sendo que no sistema pirrol/CSA observa se dois picos, tanto no processo de oxidação (304 mV, 649 mV) como no de redução (1036 mV, 1235 mV). Um deles está em correspondência com o pico do sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, sintetizado em ácido sulfúrico. A presença deste segundo pico justifica um possível processo adsortivo de reagentes e produtos causados pela interação eletrostática com possível carga residual induzida pela presença do CSA na eletropolimerização.

O fato de se encontrar carregado, o CSA provoca que espécies iônicas de carga oposta presentes no meio de reação se incorporem a macroestrutura na forma de contra-íon.

Figura 35 Resposta voltamétrica do sistema pirrol/ H_2SO_4 e do sistema pirrol/CSA, na presença de uma solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4} 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$



A determinação da área efetiva dos eletrodos modificados com polipirrol na presença dos ácidos em estudo foi realizada utilizando-se a técnica de cronoamperometria e a equação de Anson descritas anteriormente.

Os valores da área efetiva dos eletrodos determinada por cronoamperometria são mostrados na tabela 6

Tabela 6 Área efetiva dos eletrodos de ouro antes e após a polimerização

ELETRODO	ÁREA(cm^2)
-Pirrol/ H_2SO_4	0,151 +/-0,001
Pirrol/CSA	0,167 +/-0,002
Ouro	0,126+/- 0,004
Área geométrica	0,071 +/- 0,001

Como era de esperar, a superfície eletroativa do eletrodo modificado é maior que a área geométrica da superfície do eletrodo de ouro sem modificação. O fato pode se explicar pelo fator de rugosidade (relação entre a superfície eletroquímica e a superfície geométrica) que no caso do eletrodo modificado Pirrol/H₂SO₄ é de 2,1 e do eletrodo modificado Pirrol/CSA é de 2,3. Este fator de rugosidade pode ser atribuído à morfologia da superfície modificada com polipirrol, formando uma camada polimérica condutora porosa. A presença do indutor quiral CSA não afeta à rugosidade do sistema polimérico obtido eletroquimicamente

Estudos das variações na velocidade de varredura na presença de diferentes concentrações facilita o conhecimento da cinética das reações ou a presença de espécies intermediárias no processo redox. Este procedimento permite se fazer a relação entre os sinais de corrente anódica e catódica a várias concentrações a diferentes velocidades de varreduras. Para um processo reversível se espera que $I_{pa} / I_{pc} = 1$ para a eletro-redução e $I_{pc} / I_{pa} = 1$ para a eletro-oxidação, situando se no numerador do quociente a corrente devido as espécies geradas no processo eletródico

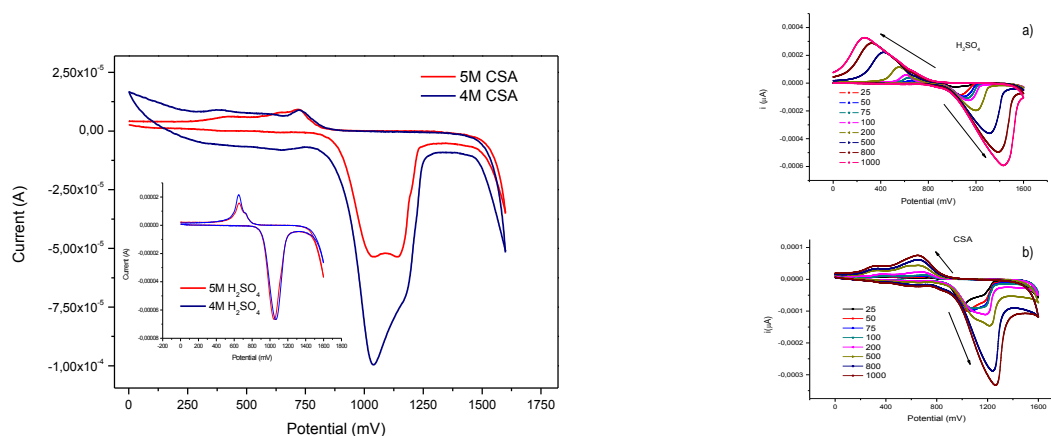
O sistema utilizado como referência para o estudo, o Fe (CN)₆^{3-/4}, foi escolhido porque a transferência de carga deste sistema é dependente do material do eletrodo de trabalho e do modo de preparação do mesmo (Kiryushov, et al., 2011). Assim foram registrados voltamogramas obtidos com os eletrodos modificados em diferentes velocidades de varreduras, para duas concentrações equimolares de Fe (CN)₆^{3-/4}, para verificar-se o efeito de polimerização do pirrol na presença do ácido sulfúrico e do indutor quiral.

A figura 36 mostra as curvas de corrente-potencial para o sistema Fe (CN)₆^{3-/4} a diferentes velocidades de varreduras.

No sistema pirrol/CSA observam se dois picos, tanto no processo de oxidação (304 mV, 649 mV) como no de redução (1036 mV, 1235 mV). Um deles está em correspondência com o pico do sistema Fe (CN)₆^{3-/4}, obtido no sistema que utiliza o ácido sulfúrico. O segundo pico é facilmente visualizado a partir da velocidade de varredura de 50 mV/seg. A presença deste segundo pico justifica um possível processo adsortivo de reagentes e produtos causados pela interação eletrostática

com uma possível carga residual induzida pela presença do CSA na eletropolimerização.

Figura36 Voltamogramas obtidos a diferentes velocidade de varredura para a) sistema pirrol/H₂SO₄ e b) sistema pirrol/CSA, solução de Fe(CN)₆^{3-/4} 10⁻³ mol.L⁻¹



A equação de Randles – Sevcik (equação 6) mostra que a relação $\log i_p \times \log v$ é linear, no caso do controle difusional. Mas se a espécie eletroativa está adsorvida na superfície do eletrodo a intensidade da corrente do pico será diretamente proporcional à velocidade de varredura em lugar da sua raiz quadrada. Assim constante de Randles-Sevcik (k) permite extrair-se informações analíticas importantes, como o número de elétrons intercambiados e o valor do coeficiente de difusão da espécie eletroativa.

As tabelas 7 e 8 mostram os parâmetros lineares da reta resultante do gráfico $\log v$ vs. $\log i_p$ para os processos catódicos e anódicos.

Tabela 7 Resultados da aplicação da equação Randles-Sevcik ao estudo da influência da velocidade de varredura na corrente do pico Catódico. ($\log i_p = \log k + m \log v$)

		Inclinação (m)	Regressão (R)
H₂SO₄	1.10 ⁻³	0,38±0,03	0,9726
	1.10 ⁻⁴	0,38±0,03	0,9726
CSA(1036 mV)	1.10 ⁻³	0,25±0,03	0,9101
	1.10 ⁻⁴	0,34±0,02	0,9748
CSA (1235)	1.10 ⁻³	0,30±0,02	0,9810

mV)	1.10^{-4}	$0.38\pm 0,03$	0.9726
------------	-------------	----------------	--------

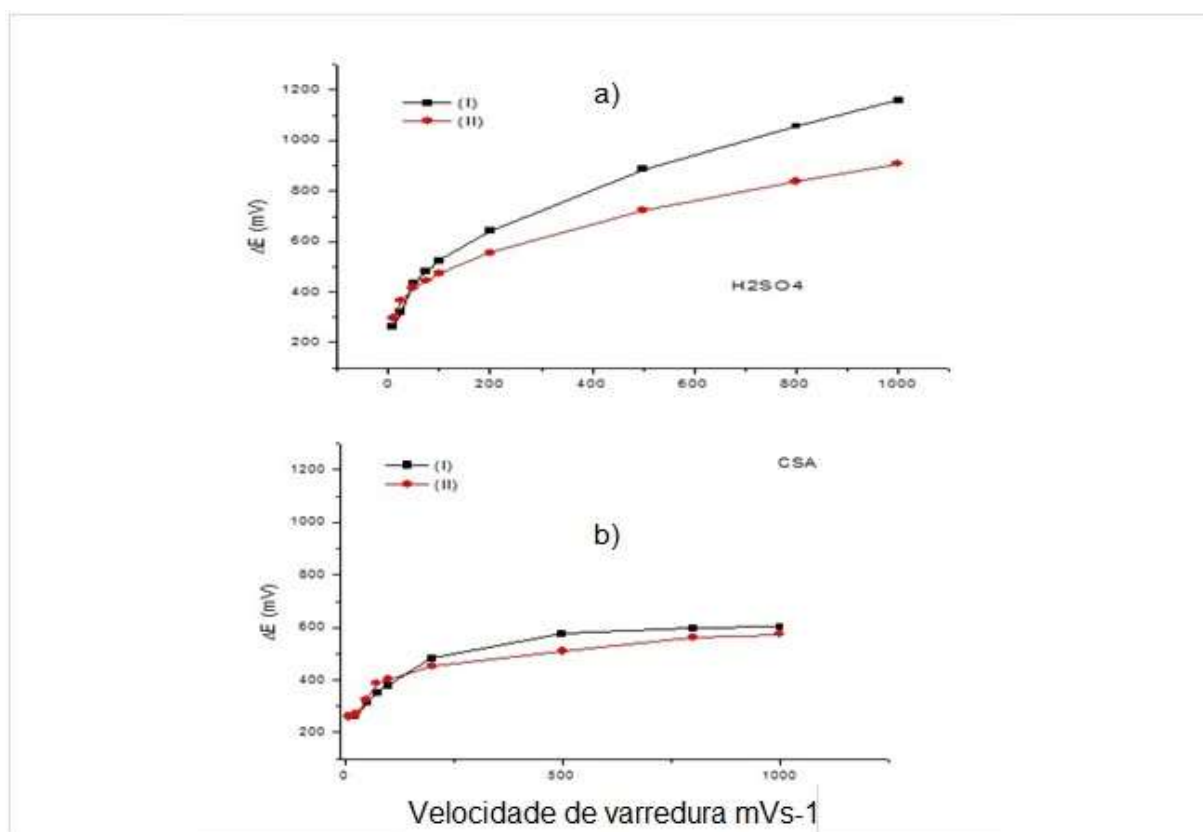
Tabela 8. Resultado da aplicação da equação Randles-Sevcik ao estudo da influência da velocidade de varredura na corrente do pico Anódico. ($\log i_p = \log k + m \log v$)

		Inclinação (m)	Regressão(R)
H₂SO₄	1.10^{-3}	$0,5\pm 0,07$	0,9287
	1.10^{-4}	$0,53\pm 0,07$	0,9287
CSA (1036 mV)	1.10^{-3}	$0,74\pm 0,01$	0,9981
	1.10^{-4}	$0,74\pm 0,04$	0,9993
CSA (1235 mV)	1.10^{-3}	$0.43\pm 0,09$	0,9653
	1.10^{-4}	$0.53\pm 0,06$	0,9726

Dos valores obtidos, pode se apreciar uma similitude entre as inclinações para cada sistema estudado (pirrol/H₂SO₄ e pirrol/CSA) não sendo evidenciada diferenças no transporte de massa e na resistência não compensada. Pode-se apreciar também que no processo anódico de ambos sistemas apresentam controle difusional. Os processos catódicos em ambos sistemas mostraram comportamento não regido pela difusão. Estes comportamentos afastados do controle difusional sugerem possível adsorção dos produtos e dos analitos, provocado pela modificação no sistema de polimerização com o uso do indutor quiral.

Para ambos os sistemas ao aumentar a velocidade de varredura, aumenta a diferença de potencial entre os picos catódico e anódico, que mostra um comportamento não-reversível ou seja, quasi-reversível. (figura 37).

Figura 37 Gráficos de ΔE versus velocidade de varredura (v), (I $\text{Fe } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, II $\text{Fe } 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) a) sistema pirrol/ H_2SO_4 e b) sistema pirrol/CSA



A figura 37 mostra que para o sistema pirrol / CSA tem-se uma menor diferença do potencial entre os picos catódico e anódico do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$, indicando uma maior facilidade termodinâmica para a transferência eletrônica do processo redox.

Outro critério para determinar a reversibilidade do sistema consiste em relacionar o quociente dos sinais da corrente catódica e anódica de várias concentrações com diferentes velocidades de varredura. Além disto, o quociente permite inferir o possível mecanismo associado com a reação no eletrodo. As figuras 38 e 39 mostram os gráficos obtidos para I_{pa}/I_{pc} versus velocidade de varredura para o eletrodo modificado pirrol/ H_2SO_4 (figura 38) e para o eletrodo modificado pirrol/CSA (figura 39)

Figura 38. Gráficos de I_{pa}/I_{pc} versus velocidade de varredura, eletrodo modificado pirrol/ H_2SO_4 , (I [Fe] $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, II [Fe] $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

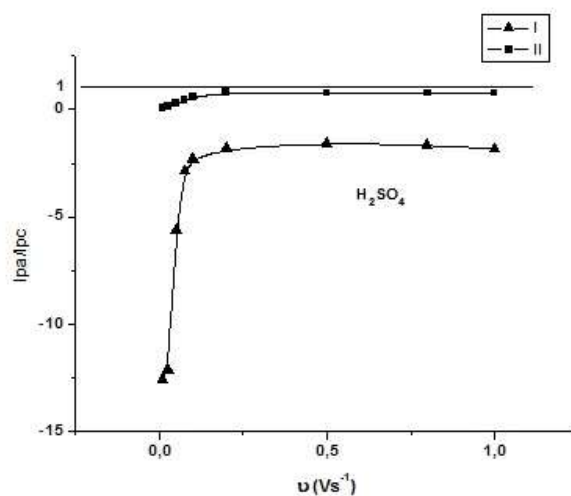
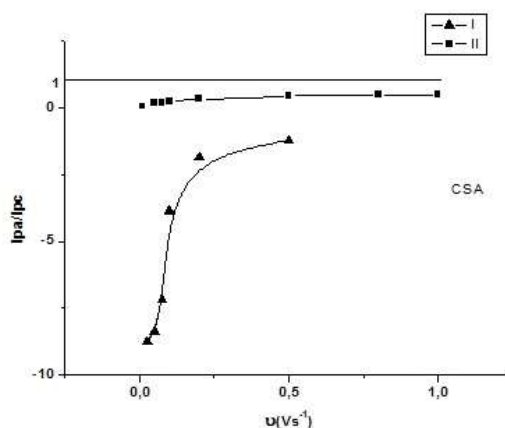


Figura 39 Gráfico de I_{pa}/I_{pc} v versus a velocidade de varredura, eletrodo modificado pirrol/CSA (I [Fe] $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ II [Fe] $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)



Levando em conta o perfil dos quocientes da corrente catódica/anódica obtido, pode-se observar dois comportamentos, um a baixas velocidades de varredura onde o quociente da corrente aumenta com a velocidade de varredura e outro a altas velocidades onde o quociente mantém-se constante. Este comportamento é mais marcante na concentração mais baixa. Este comportamento sugere uma transferência de elétrons reversível seguido de uma reação química irreversível. As altas velocidades de varredura o sistema tem um comportamento característico de uma transferência eletrônica sem reações químicas acopladas.

5.12 DETERMINAÇÃO ENANTIOSELETIVA DE SOTALOL COM O ELETRODO DESENVOLVIDO.

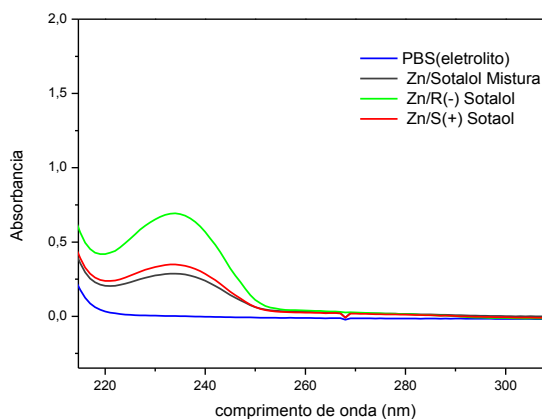
A determinação seletiva dos enantiômeros do sotalol no sistema desenvolvido neste trabalho, foi avaliada através da formação de complexos de zinco, como descrito a seguir:

As medidas eletroquímicas foram realizadas na mesma célula eletroquímica dos anteriores estudos. Tanto os eletrodos de referencia como o auxiliar foram os mesmos utilizados só mudando o eletrodo de trabalho em cada caso. No caso de comparações com eletrodo de carbono vítreo foi feito também com o mesmo utilizado anteriormente.

5.12.1 Caracterização físico-química do complexo.

A primeira técnica a ser avaliada na caracterização físico - química do complexo foi a UV-Vis. Foram registrados espectros UV-Vis dos complexos com Zn^{+2} com a mistura dos dois enantiômeros e do complexo com cada um deles por separado. A figura 40 mostra o comportamento observado.

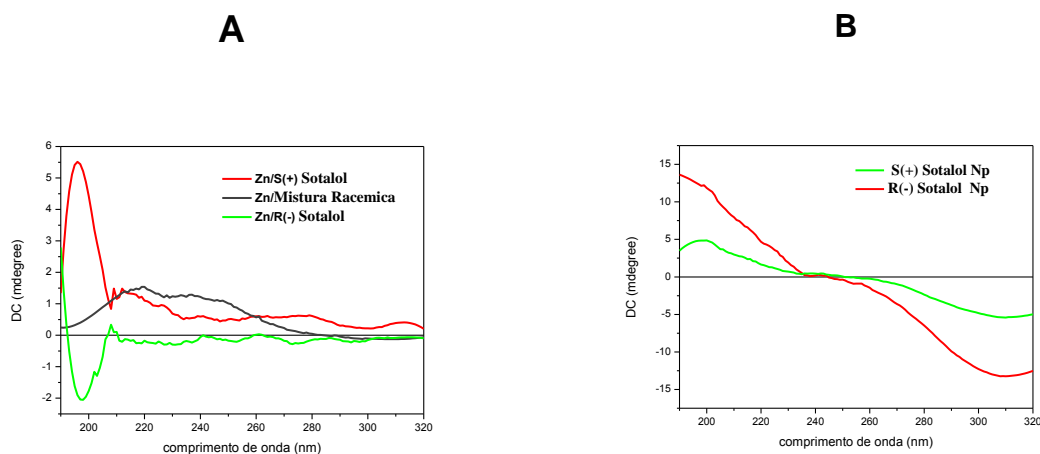
Figura 40 Espectro UV – Visível dos complexos de Zn (II) com mistura racêmica (-), Zn (II) com o R(-) Sotalol (-) e do Zn (II) com S(+) Sotalol (-)



A observação dos resultados obtidos mostra que o espectro apresenta-se com uma banda larga com um máximo em torno de 230 nm e que o grupo cromóforo da molécula responsável é mantido depois da formação dos complexos. Esta técnica não foi capaz de diferenciar os complexos formados com os dois enantiômeros.

Os espectros obtidos por dicroísmo circular (DC), proporciona informação a cerca das moléculas biológicas e, por isto, foi outra das técnicas utilizadas na caracterização dos complexos formados (figura 41).

Figura 41 A - Espectros de dicroísmo circular dos complexos formados com a mistura (azul), com R(-) Sotalol (preto), e com S(+) Sotalol (vermelho). B – Espectros de dicroísmo circular das interações entre os complexos R e S e as nanopartículas utilizadas para modificação do eletrodo proposto.



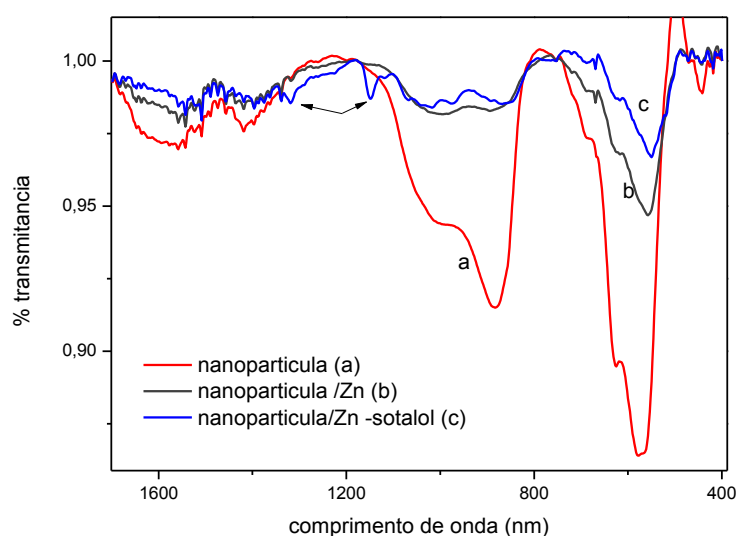
Estes espectros confirmam que complexo que mostra um máximo positivo é o correspondente ao formado com o enantiomero S(+) Sotalol e aquele que mostra um máximo negativo corresponde ao complexo formado com o R(-) Sotalol.

A figura 41 B) mostra comportamento diferente dos enantiomeros na sua interação com as nanopartículas da superfície do eletrodo de trabalho desenvolvido.

A figura 42 mostra o espectro de FTIR obtido para as nanopartículas, as nanopartículas após interação com os íons zinco e depois de entrarem em contato com o sotalol. Observa-se primeiramente no espectro que as bandas correspondentes às nanopartículas são mantidas quando é colocada em contato com o zinco e a novidade é que ao entrarem em contato com o Sotalol aparecem

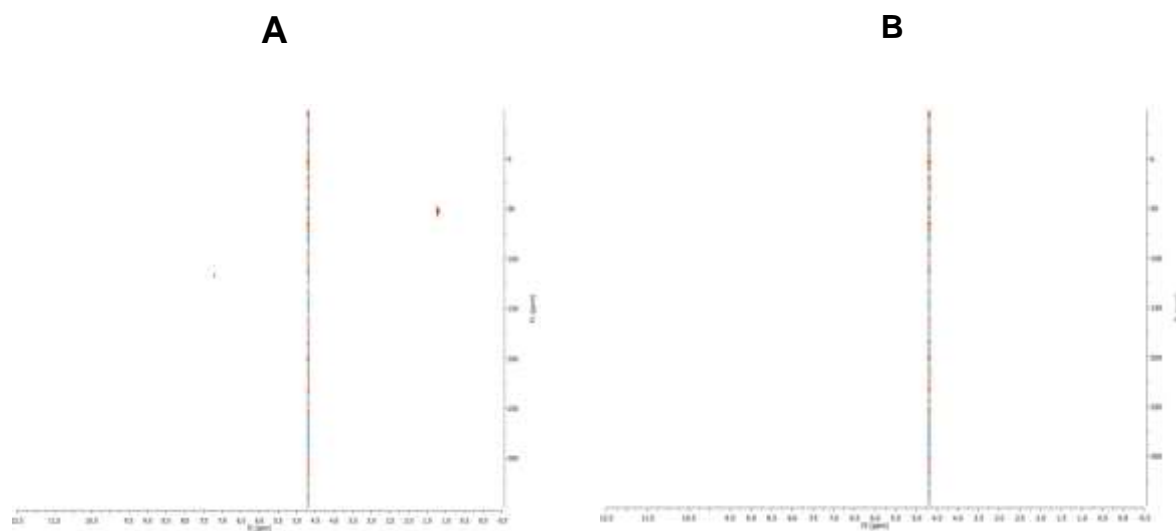
aquelas bandas características do sotalol, já descritas no capítulo anterior, (1633 cm^{-1} ; 1000 cm^{-1}). Foram registrados os espectros com os enantiômeros em separado e como era de esperar não houve diferença entre eles. Estes espectros não foram adicionados para não complicarem ainda mais a visibilidade dos espectros mostrados.

Figura 42 Espectro de FTIR da, nanopartícula magnética (a) nanopartícula em contato com Zn (b) e nanopartícula em contato com Zn /Sotalol (c)



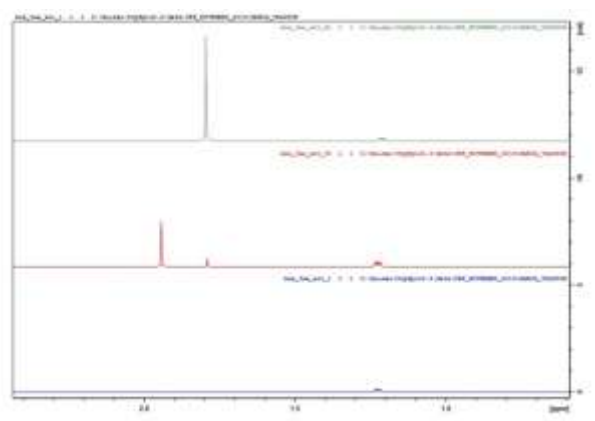
A figura 43 Mostra o espectro de ressonância magnética nuclear 2D com detecção inversa (Heteronuclear MultipleBond Coherence) (RMN/HBMC) de nitrogênio. Esta técnica permite observar sinais dos prótons que interatua diretamente com os átomos de nitrogênio. Foi registrado o espectro da solução de sotalol (figura 43 A) que mostrou dois sinais (pontos em vermelho) correspondentes aos hidrogênios do grupo amino da molécula de sotalol. Estes sinais desaparecem no espectro obtido após interação com o zinco (figura B) corroborando que esta interação ocorre através do grupo amino.

Figura 43 Espectro RMN/HMBC de sotalol (A) e sotalol em contato com a solução de zinco(B)



Este comportamento é evidenciado igualmente no espectro RMN protônico, mostrado na figura 44.

Figura 44 Espectro RMN protônica de Sotalol (azul) e R (-) Sotalol/Zn em contato com a solução de zinco



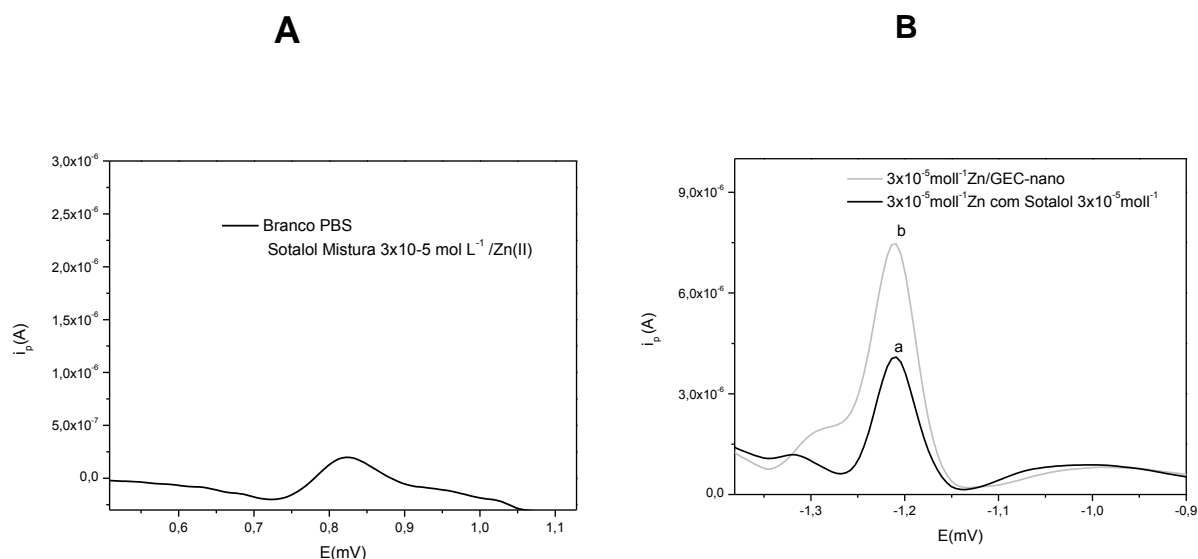
5.12.2. Oxidação Voltamétrica enantioselectiva de cloridrato de Sotalol pela formação de complexos de zinco

Dois procedimentos foram testados, o primeiro consiste em colocar-se em contato previamente a solução de sotalol com a solução de Zn (II), nas mesmas concentrações e depois de transcorrido o tempo necessário analisar esta solução de acordo com o procedimento desenvolvido neste trabalho. O segundo procedimento consistiu em colocar-se os íons zinco para interagirem previamente com o eletrodo modificado antes de ser transferido para a célula de trabalho contendo o sotalol. Os melhores resultados foram obtidos com o primeiro dos procedimentos, aquele de formar o complexo previamente em solução.

Foram registrados os voltamogramas cíclicos em pulso diferencial, das seguintes soluções: solução-tampão de fosfato pH = 7,0; solução de ions Zn^{+2} 3×10^{-5} mol L⁻¹; solução de sotalol de concentração 3×10^{-5} mol L⁻¹ colocada em contato prévio com solução de Zn (II). As condições instrumentais foram ajustadas aos valores já relatados. O registro foi feito primeiramente na faixa de potencial de 0,3 V a 1,2 V, podendo ser observado (figura 45 A) o pico de potencial característico do sotalol com o GECE/MNPs. Sendo que em lugar de dois picos aparece só um deles, evidenciando, uma vez mais, que o complexo está sendo formado através do grupo amina que era o responsável pela oxidação em dois passos.

Também foram registrados os voltamogramas nas mesmas condições mudando só a faixa de potencial para a faixa catódica com o intuito de dar seguimento à mudança no potencial de redução Zn (II) devido a complexação. A figura 45 mostra que na faixa de -1,4 V a 0 V. (A), como pode ser observado o sinal de oxidação do zinco e mantido no mesmo potencial sendo no entanto diminuído. A diminuição do sinal resulta de que parte do zinco está formando complexo com o Sotalol.

Figura 45 Voltamograma diferencial de pulso obtido para solução de Sotalol 3×10^{-5} mol L⁻¹, / Zn (II) em tampão fosfato (pH 7) sobre o eletrodo de carbono epóxi modificado. A velocidade de varredura (ν)=50mV s⁻¹ (A) na faixa de potencial 0,3-1,2 V (B) na faixa de potencial -1,4 - 0 V para a) solução de Zn(II) em contato com Sotalol b). solução de Zn(II)



O pico de redução do zinco foi o de maior intensidade e o mais reproduzível e por causa disso que os restantes estudos e a quantificação foi desenvolvida na faixa de potencias de -1,4 -0 V, avaliando-se o efeito da formação do complexo pela sua interação com o sotalol no pico de redução do zinco.

5.12.3 Estudo da velocidade de varredura.(ν)

Foram igualmente registrados os voltamogramas cíclicos correspondentes à oxidação do cloridrato de Sotalol 1×10^{-5} mol L⁻¹ em solução tampão de fosfato sobre o eletrodo compósito modificado com a nanopartícula colocado previamente em contato com uma solução de Zn (II) da mesma concentração (segundo procedimento).

Neste caso, foi estudada a influencia da velocidade de varredura (ν) no intervalo de 10 a 300 mV s⁻¹ e registrados os voltamogramas entre os potenciais $E_i = 0,3$ $E_f = 1,2$. Observa-se que a baixas velocidades de varredura (10 mVs⁻¹) observa-se um

pico alargado com um máximo em torno de 0,95 V que diminui até desaparecer, à medida que a velocidade de varredura aumenta.(figura 46).

A figura 47 (A) mostra a relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e figura 47 (B) mostra a relação entre a corrente de pico com a velocidade de varredura. Pode-se concluir que a relação expressa na figura 46 A é descrita por uma função linear de equação $i_p = 0,23923 v^{1/2} + 2,7414$. Este comportamento é característico de sistemas totalmente irreversíveis.

Figura 46 Voltamogramas cíclicos da oxidação do sotalol (solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em contato prévio com solução de Zn (II) da mesma concentração em solução tampão fosfato (pH 7), registrados sobre o eletrodo composto em diferentes velocidades de varredura do potencial, entre os potenciais $E_i = 0,3$ $E_f = 1,2$.

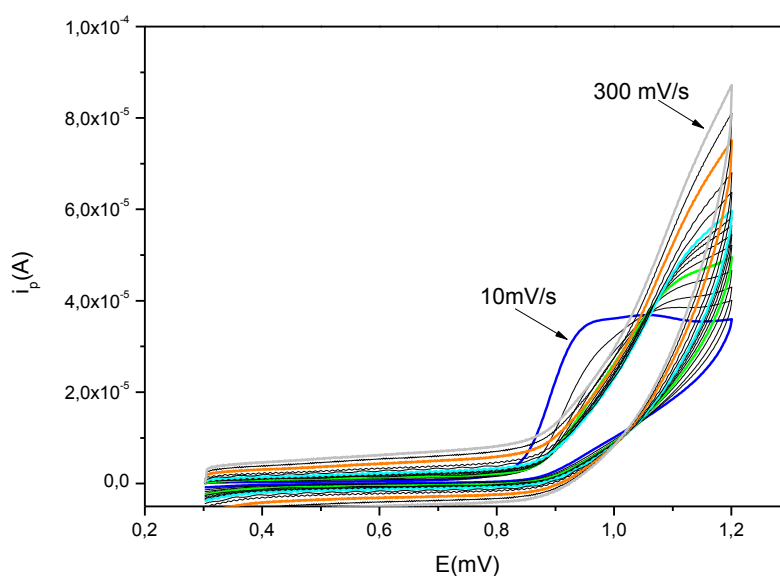
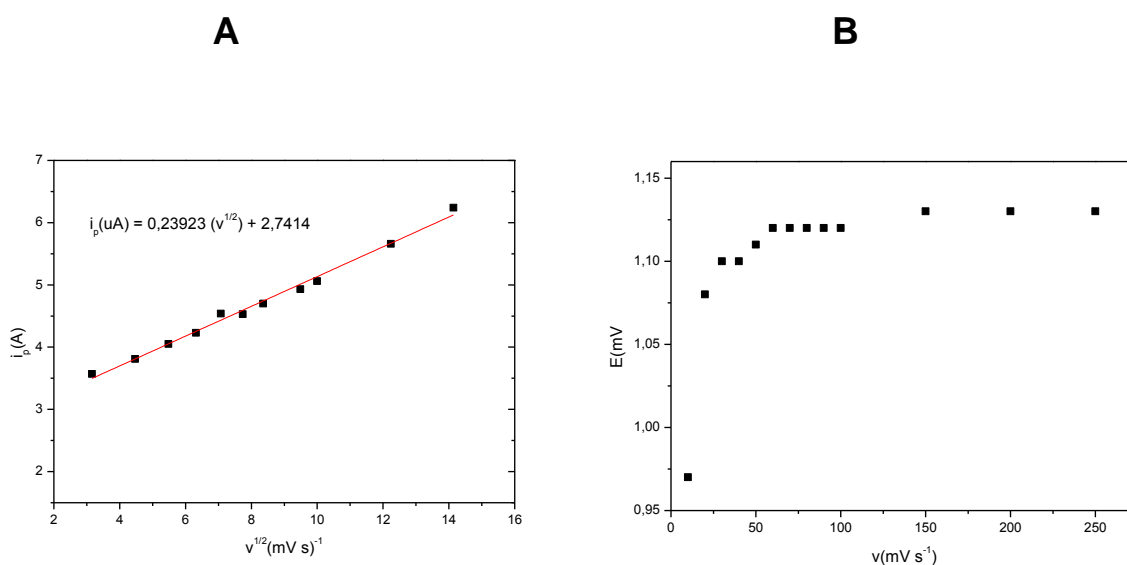


Figura 47 Dependência da corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.(A) e do potencial com a velocidade de varredura (B)



A irreversibilidade resulta de uma transferência eletrônica lenta entre as espécies redox e o eletrodo de trabalho, sendo a reação de eletrodo controlada pela velocidade de transferência de carga heterogênea (k°). Nestas condições, não é válida a equação de Nernst e não são aplicáveis os critérios definidos nas equações de Randles-Sevcik.

Nesse tipo de sistema, a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura (v) e a equação que descreve a corrente de pico (equação 7) é afetada pelo coeficiente de transferência (α).

$$i_p = (2,99 \times 10^{-5}) n (\alpha n)^{1/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (7)$$

onde,

n é o número de elétrons transferidos até o passo determinante da velocidade

A é a área do eletrodo (cm^2)

C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3})

D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

v é a velocidade de varredura (V s^{-1})

α é o coeficiente de transferência

Nesses sistemas costuma-se observar apenas um dos picos, neste caso o pico anódico, conforme observado na figura 45. Esse pico tende a deslocar-se com leve aumento da velocidade de varredura como verificado na Fig 46 B . É importante ressaltar que ele é afetado pelo o coeficiente de transferência (α) e pela velocidade de transferência de carga (k_s).

5.12.4 Otimização da resposta do sensor

A fim de obter o melhor sinal do fármaco formando o complexo com zinco diminuindo o limite de detecção e a sensibilidade, foram investigadas as melhores condições instrumentais usando voltametria diferencial de pulso, já que nos capítulos anteriores foi determinado que este método como o melhor para o sistema em estudo. Foram investigados, a frequência de aplicação dos pulsos, a amplitude de pulsos e o incremento de varredura, e os melhores resultados são mostrados na seguinte tabela (tabela 8)

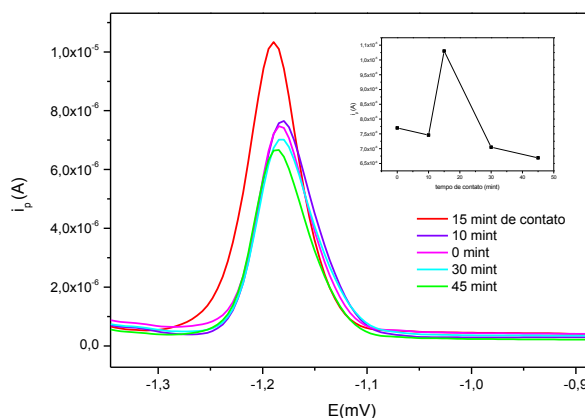
Tabela 9 - Parâmetros da voltametria de pulso diferencial correspondente a oxidação do complexo de zinco com Sotalol em tampão fosfato pH 7,0.

Parâmetros (Voltametria diferencial de pulso)	Intervalo de Estudo	Melhor Definição
Frequência (f)	10 – 70 s ⁻¹	70
Amplitude (a)	10 – 100 mV	50
Velocidade de varredura (v)	25–100 mVs ⁻¹	50

As melhores condições obtidas para a determinação do complexo após a reação com nanopátículas magnéticas sobre o eletrodo compósito foram : $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

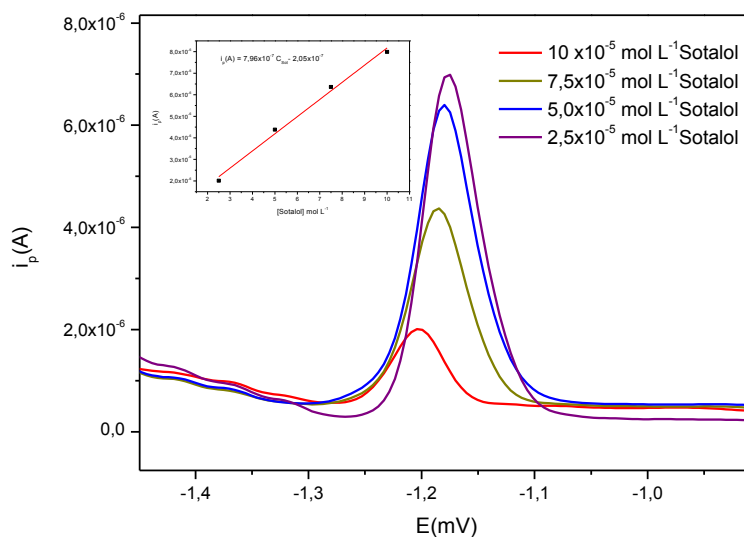
Uma vez que o processo que envolva reações de óxido-redução de complexos que aqui se pretende seja de reconhecimento quiral depende principalmente da formação dos complexos, o tempo de contato é uma importante variável a ser estudado. As soluções foram colocadas em contato por tempos que variavam de 0 a 45 minutos. Na figura 48 mostra o comportamento faixa de tempo estudado mostrando que o melhor resultado foi conseguido com o tempo de contato de 15 minutos, o qual corresponde com estudos anteriores feitos no uso de zinco na formação de complexos quirais(Chen, et al., 2012).

Figura 48 Voltamogramas do complexo de Sotalol-Zn em tampão fosfato e $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ obtidos com diferentes tempos de reação.



A figura 49 exemplifica a quantificação do sotalol medida através da diminuição do pico de redução do Zn em consequência do aumento da concentração deste fármaco na solução de íons zinco. Pode-se ver que a diminuição da corrente de pico do zinco decresce linearmente com a adição de sotalol no rango de concentração estudado. O menor valor de concentração que consegue ser determinado por este método é $0,09 \times 10^{-6} \text{ M.L}^{-1}$ sendo este o limite de determinação.

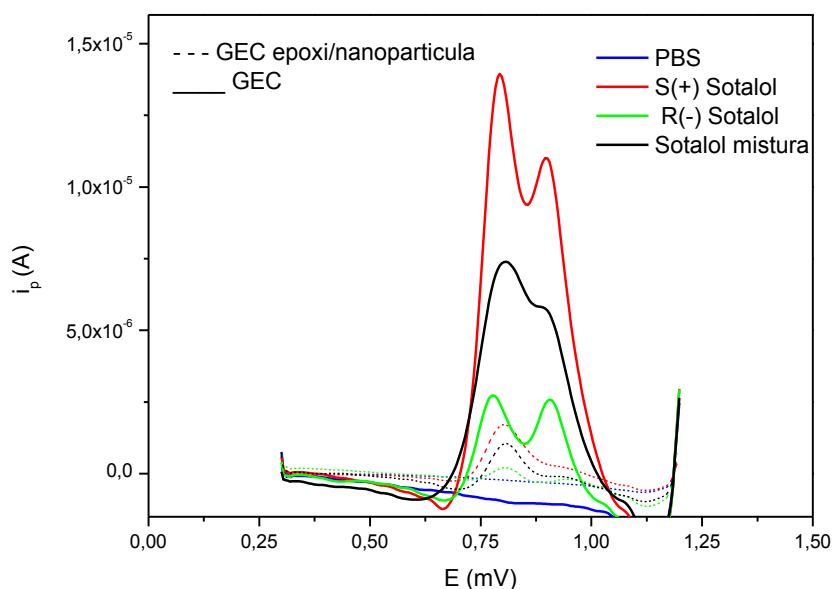
Figura 49 – Voltamogramas obtidos a partir de uma solução de Zn^{+2} ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) após a adição de concentrações crescentes de Sotalol. Condições voltamétricas otimizadas.



No intuito de tentar a quantificação enantioselectiva do Sotalol procedeu-se à separação enantiomérica de cada enantiômero por cromatografia quiral, devido a que não é comercializado dos padrões desses isômeros. A separação foi feita no Grupo de Síntese Orgânica e CLAE, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos utilizando um cromatógrafo com coluna quiral acoplada, como já foi descrito no capítulo anterior.

Uma vez separados os enantiômeros foram registrado os voltamogramas com o eletrodo modificado desenvolvido, sob as mesmas condições de nossos estudos anteriores.

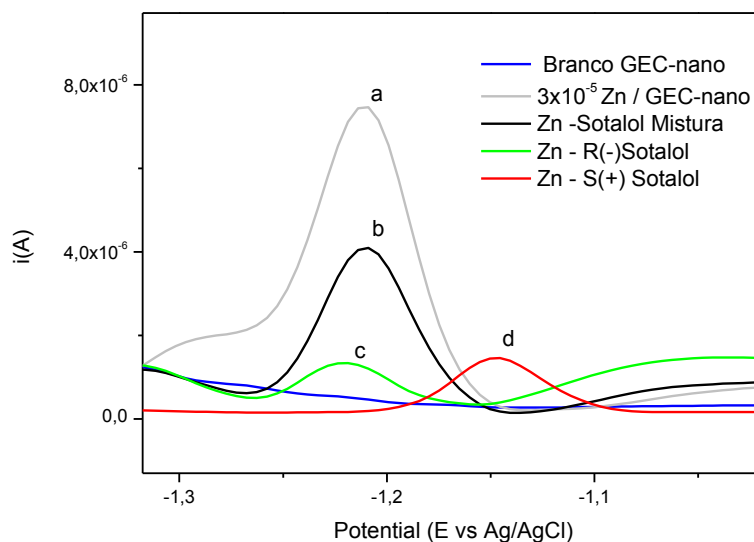
Figura 50 Voltamogramas em pulso diferencial de solução-tampão de fosfato (PBS); de solução de mistura racêmica de sotalol (-), de R(-) Sotalol (-) e de S(+) Sotalol (-) obtidos com o eletrodo de carbono epóxi GEC (-) e com eletrodo de carbono epóxi modificado com a nanopartícula GEC/nano (--). Condições voltamétricas: $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.



A figura 50 mostra que não é possível diferenciar-se através da metodologia proposta a mistura e os dois enantiômeros mais evidencia que o S(+) sotalol apresenta uma resposta voltamétrica bem maior que o R(-). Estas diferenças podem ser exploradas em estudos futuros para viabilizar estas determinações isoladamente.

No intuito de cumprir o objetivo de determinar eletroquimicamente por separado dos enantiômeros, tentou-se a determinação através da formação de um complexo com Zn(II). De fato estudos prévios reportam esta possibilidade para outras substâncias (Bao, et al., 2015, Fu, et al., 2011). A resposta voltamétrica resultante da oxidação dos complexos formados pelos enantiômeros com Zn(II) foi registrada sob as condições previamente estudadas e a figura 51 mostra os resultados obtidos. A diferença nos potenciais de pico observadas justifica a possibilidade de se estudar a metodologia adequada para esta finalidade.

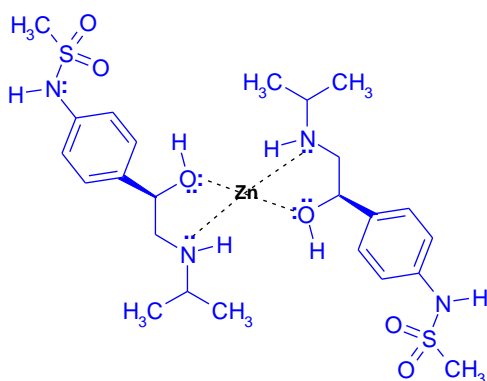
Figura 51 Voltamogramas dos complexos de Zn-sotalol em tampão fosfato de pH = 7,0 de a) solução 3×10^{-5} mol l⁻¹ de Zn (II), b) Zn (II) - mistura racêmica de sotalol, c) Zn(II) e R(-) Sotalol, d) Zn (II) e S(+) Sotalol. Nas condições; $f = 70 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.



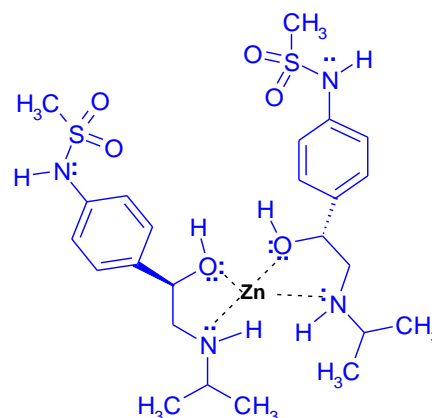
Pelo fato do zinco ser um metal de transição ele tem a possibilidade de formar complexos de coordenação quirais, de tipo tetraédricos (BASOLO,1987). No caso de nosso analito a proposta dos complexos formados poderiam ser os seguintes (figura 52):

Figura 52. Estruturas prováveis dos complexos dos enantiômeros do sotalol com o Zn (II)

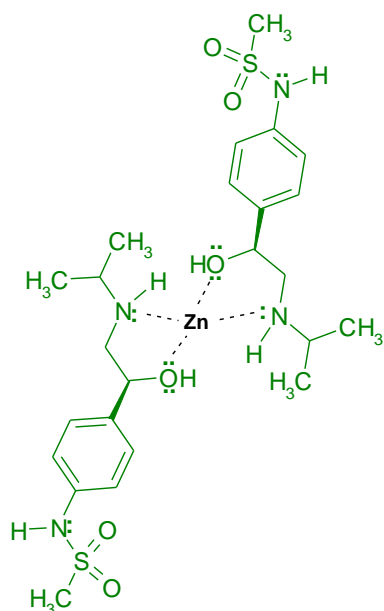
Diastereoisômero A- Complexo homquiral *trans* (S,S)



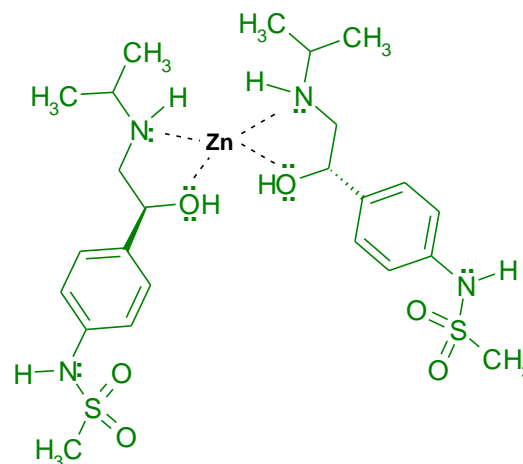
Diastereoisômero B- Complexo homquiral *cis* (S,S)



Diastereoisômero C- Complexo
homoquiral *trans* (R,R)



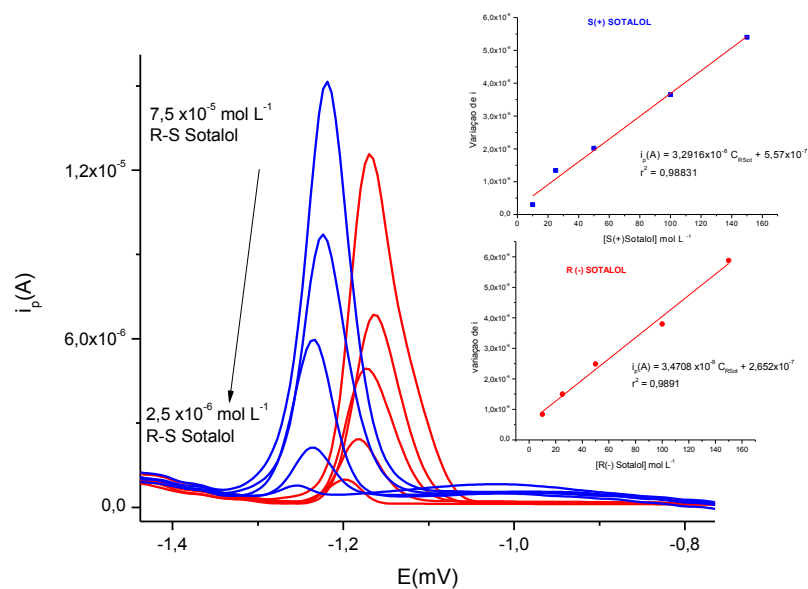
Diastereoisômero D- Complexo
homoquiral *cis* (R,R)



Desses 4 possíveis complexos o mais estável do ponto de vista químico pela sua estrutura deve ser o *trans* (S,S) (Basolo, et al., 1980)

A quantificação dos enantiômeros por separado foi testada e a figura 53 mostra os voltamogramas e as curvas de calibração correspondentes a cada um deles isoladamente. A curva de calibrado segue a seguinte função ($i_p(A) = 3,2916 \times 10^{-8} C_{Sot} + 5,57 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0,98831$) para o S(+) Sotalol e ($i_p(A) = 3,4708 \times 10^{-8} C_{RSot} + 2,652 \times 10^{-7}$, $r^2 = 0,9891$) para o caso de R(-) Sotalol. Os parâmetros descritos anteriores e a separação nos potenciais de pico dos complexos com os diferentes enantiômeros faz com que resulte perfeitamente possível suas quantificações pela técnica eletroquímica com eletrodo de GECE/MNPs modificada previamente formando um complexo com Zn (II).

Figura 53 (A) Perfil voltamétrico em pulso diferencial do sensor enantioselectivo e as respectivas curvas de calibração dos dois enantiômeros do sotalol após complexação com íons Zn, nas condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: $E_i = -1,4$ V; $E_f = 0$; $f = 70$ s $^{-1}$, $a = 50$ mV e $SR = 50$ mVs $^{-1}$. Na faixa de concentrações ($2,5 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ a $7,5 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$).



6 CONCLUSÕES

- O eletrodo compósito modificado com nanopartículas magnéticas carboxiladas pode ser utilizado para pré-concentração de cloridrato de sotalol em meio aquoso com grande eficiência. Voltagramas obtidos com o uso deste eletrodo comparados com o eletrodo sem modificação mostraram correntes anódicas pelo menos 5 vezes maiores.
- O sensor desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas, para determinação de sotalol usando a técnica voltamétrica de pulso diferencial que permitiu níveis de limite de detecção e limite de determinação compatíveis com os exigidos para a análise desta substância em amostras ambientais.
- O sensor desenvolvido demonstrou ser uma alternativa simples, econômica e altamente viável no monitoramento de cloridrato de sotalol na forma racêmica em matrizes farmacêuticas, biológicas e ambientais.
- Foi eletrossintetizado polipirrol sobre um eletrodo de ouro na presença de um ácido quiral (ácido carbossulfóxido) e caracterizada sua superfície no intuito de ser utilizado para quantificar separadamente o fármaco alvo sem entretanto conseguir-se bons resultados.
- O sensor desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas, para determinação de sotalol em suas formas enantioméricas separadas (R,S Sotalol) usando a técnica voltamétrica de pulso diferencial e previa formação de um complexo de coordenação tetraédrico com Zn(II).

RECOMENDAÇÃO

As perspectivas para a determinação de cada enantiômero separadamente na mistura racêmica mostrou-se viável, mas necessita maiores estudos para sua otimização.

REFERÊNCIAS

- Abdelmonem, A. A., Ragab, G. H., Hashem, H. A. and Bahgat, E. A. A fast stability-indicating HPLC method for determination of sotalol hydrochloride in bulk powder and in dosage form. **Main Group Chemistry**. 15: 209-219. 2016.
- Abirami, G., Kumar, K. A., Veterichelvan, T. and Muvva, A. ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ESTIMATION METHOD FOR SOTALOL HYDROCHLORIDE TABLETS BY USING RP-HPLC. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology**. 1: 736. 2013.
- Amin, A., Ragab, G. and Saleh, H. Colorimetric determination of β -blockers in pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 30: 1347-1353. 2002.
- Antonhy J. Trevor, B. G. K. Pharmacology.
- Baccarin, M., Janegitz, B. C., Berté, R., Vicentini, F. C., Banks, C. E., Fatibello-Filho, O. and Zucolotto, V. Direct electrochemistry of hemoglobin and biosensing for hydrogen peroxide using a film containing silver nanoparticles and poly (amidoamine) dendrimer. **Materials Science and Engineering: C**. 58: 97-102. 2016.
- Bagotsky, V. Nanoelectrochemistry. **Fundamentals of Electrochemistry, Second Edition**. 679-691.
- Bao, L., Dai, J., Yang, L., Ma, J., Tao, Y., Deng, L. and Kong, Y. Electrochemical Recognition of Tyrosine Enantiomers Based on Chiral Ligand Exchange with Sodium Alginate as the Chiral Selector. **Journal of The Electrochemical Society**. 162: H486-H491. 2015.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., Leddy, J. and Zoski, C. G. Electrochemical methods: fundamentals and applications.
- Basolo, F., Busch, R. H. and Johnson, R. Química de los compuestos de coordinación: la química de los complejos metálicos.
- Becker, D. E. Basic and Clinical Pharmacology of Autonomic Drugs. **Anesthesia Progress**. 59: 159-169. 2012.
- Bezerra, D. C., Fernandes, P. C., Silva, T. R. d. G., Araújo, E. M. and Costa, A. C. F. Síntese de ferrita NiFe₂O₄ e sua incorporação em compósitos de poliamida 6. Parte 1: caracterização estrutural por drx e mev dos pós e dos compósitos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 20: 389-394. 2010.
- Brugnera, M. F., Miyata, M., Zocolo, G. J., Leite, C. Q. F. and Zanoni, M. V. B. Inactivation and disposal of by-products from Mycobacterium smegmatis by photoelectrocatalytic oxidation using Ti/TiO₂-Ag nanotube electrodes. **Electrochimica Acta**. 85: 33-41. 2012.

Burke, D. and Henderson, D. J. Chirality: a blueprint for the future. **BJA: British Journal of Anaesthesia**. 88: 563-576. 2002.

C, M. A. O. Clark's analysis of drug and poison.

Chen, Q., Zhou, J., Han, Q., Wang, Y. and Fu, Y. A new chiral electrochemical sensor for the enantioselective recognition of penicillamine enantiomers. **Journal of Solid State Electrochemistry**. 16: 2481-2485. 2012.

Chen, R., Cheng, J. and Wei, Y. Preparation and magnetic properties of Fe₃O₄ microparticles with adjustable size and morphology. **Journal of Alloys and Compounds**. 520: 266-271. 2012.

Cheng, W. and Compton, R. G. Electrochemical detection of nanoparticles by 'nano-impact' methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 58: 79-89. 2014.

Davankov, V. A. Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques. **Journal of Chromatography A**. 1000: 891-915. 2003.

de Oliveira, D. P., Ribeiro, F. W., Becker, H., Lima-Neto, P. and Correia, A. N. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Quim. Nova**. 38: 924-931. 2015.

de Oliveira, L. S., Balbino, M. A., de Menezes, M. M. T., Dockal, E. R. and de Oliveira, M. F. Voltammetric analysis of cocaine using platinum and glassy carbon electrodes chemically modified with Uranyl Schiff base films. **Microchemical Journal**. 110: 374-378. 2013.

de Oliveira, R., Hudari, F., Franco, J. and Zanoni, M. V. B. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensor for the Determination of Anthraquinone Hair Dyes in Wastewaters. **Chemosensors**. 3: 22-35. 2015.

Dogrukol-Ak, D., Dal, A. and Tuncel, M. Determination of Sotalol in Tablets and Serum by CZE. **Chromatographia**. 66: 159-163. 2007.

Enna, S. J., Bylund, D. B. and Elsevier, S. XPharm : the comprehensive pharmacology reference.

Ensafi, A. A., Allafchian, A. R., Rezaei, B. and Mohammadzadeh, R. Characterization of carbon nanotubes decorated with NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles as a novel electrochemical sensor: Application for highly selective determination of sotalol using voltammetry. **Materials Science and Engineering: C**. 33: 202-208. 2013.

Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., Del Valle, M. and Alegret, S. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 114: 591-598. 2006.

Fantinato F., C. F. S. L., Boldin M.V. . Multi-responses Methodology Applied in the Electroanalytical Determination of Hair Dye by using Printed Carbon Electrode Modified whit Graphene. **Electroanalysis**. 28: 1085-1092. 2016.

Feng, Z., Yu, S., Liu, W., Yang, L., Liu, Y., Zhai, S., Wang, F. and Zhang, X. A simple and sensitive LC-MS/MS method for the determination of sotalol in rat plasma. **Biomedical Chromatography**. 29: 1167-1172. 2015.

Firmida, C. d. C. and Mesquita, E. T. O paradoxo do tratamento do ICC com betabloqueadores. Implicação para pacientes hipertensos. **Rev. bras. hipertens.** 8: 458-465. 2001.

Fragkou, V., Ge, Y., Steiner, G., Freeman, D., Bartetzko, N. and Turner, A. Determination of the Real Surface Area of a Screen-Printed Electrode by Chronocoulometry. **Int. J. Electrochem. Sci.** 7: 6214-6220. 2012.

Fu, Y., Wang, L., Chen, Q. and Zhou, J. Enantioselective recognition of chiral mandelic acid in the presence of Zn (II) ions by l-cysteine-modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 155: 140-144. 2011.

Gonçalves, E. S. Ocorrência e distribuição de fármacos, cafeína e bisfenol-a em alguns corpos hídricos no Estado do Rio de Janeiro. 2016.

Gonzalez, E. A. T. E. R. Eletroquímica: Princípios e Aplicações.

Hancu, G., SĂMĂRGIȚAN, C., Rusu, A. and Mircia, E. Sotalol chiral separation by capillary electrophoresis. **Journal of the Chilean Chemical Society**. 59: 2559-2562. 2014.

Heberer, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**. 131: 5-17. 2002.

Heli, H., Zare, S. N., Sattarahmady, N. and Karimian, K. Electrooxidation behavior and amperometric determination of sotalol on a graphene oxide nanosheets-modified glassy carbon electrode. **Current Pharmaceutical Analysis**. 9: 291-298. 2013.

Henrique Duarte, E., dos Santos, W. P., Fantinato Hudari, F., Bott Neto, J. L., Romão Sartori, E., Dall'Antonia, L. H., César Pereira, A. and Teixeira Tarley, C. R. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. **Talanta**. 127: 26-32. 2014.

Holzinger, M., Le Goff, A. and Cosnier, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in chemistry**. 2: 63. 2014.

Hudari, F. F., de Almeida, L. C., da Silva, B. F. and Zanoni, M. V. B. Voltammetric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode. **Microchemical Journal**. 116: 261-268. 2014.

Hudari, F. F., da Silva, B. F., Pividori, M. I. and Zanoni, M. V. B. Voltammetric sensor based on magnetic particles modified composite electrode for determination of triamterene in biological sample. **Journal of Solid State Electrochemistry**. 20: 2491-2501. 2016.

Hume J. R., G. A. O. Agent used in cardiac anthyathmias.

Indra K. Reddy, R. M. Chirality in Drug Design and Development.

J., B. A. Electrochemical methods. Fundamentals and applications.

Janata, J. Principles of chemical sensors.

Kikuchi, K., Komatsu, K. and Nagano, T. Zinc sensing for cellular application. **Current opinion in chemical biology**. 8: 182-191. 2004.

Kiryushov, V., Skvortsova, L. and Aleksandrova, T. Electrochemical behavior of the system ferricyanide-ferrocyanide at a graphite-epoxy composite electrode. **Journal of Analytical Chemistry**. 66: 510-514. 2011.

Kumar, K. and Sahu, O. Removal of Nitrogen by Bioreactor Method. **Journal of Environment Pollution and Human Health**. 2: 16-22. 2014.

Lermo, A., Zacco, E., Barak, J., Delwiche, M., Campoy, S., Barbé, J., Alegret, S. and Pividori, M. Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection. **Biosensors and Bioelectronics**. 23: 1805-1811. 2008.

Lu, N., Zhao, H., Li, J., Quan, X. and Chen, S. Characterization of boron-doped TiO₂ nanotube arrays prepared by electrochemical method and its visible light activity. **Separation and Purification Technology**. 62: 668-673. 2008.

Luo, X., Morrin, A., Killard, A. J. and Smyth, M. R. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**. 18: 319-326. 2006.

Marestoni, L. D., Sotomayor, M. D. P. T., Segatelli, M. G., Sartori, L. R. and Tarley, C. R. T. Polímeros impressos com íons: fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química analítica. **Química Nova**. 1194-1207. 2013.

Martindale. The complete drug reference.

Matysova, L., Zahalkova, O., Klovzova, S., Sklubalova, Z., Solich, P. and Zahalka, L. Development of a gradient HPLC method for the simultaneous determination of sotalol and sorbate in oral liquid preparations using solid core stationary phase. **Journal of analytical methods in chemistry**. 2015: 2015.

Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C. and Alder, A. Elimination of β -blockers in sewage treatment plants. **Water research**. 41: 1614-1622. 2007.

Mendez-Arriaga, F., Esplugas, S. and Gimenez, J. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. **Water research**. 44: 589-595. 2010.

Morante-Zarcero, S. and Sierra, I. Comparative HPLC methods for β -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 62: 33-41. 2012.

Nguyen, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. Chiral drugs: an overview. **Int J Biomed Sci.** 2: 85-100. 2006.

Norouzi, P., Ganjali, M., Meibodi, A. E. and Larijani, B. Sotalol nanolevel detection at an Au microelectrode in flowing solutions. **Russian Journal of Electrochemistry.** 44: 1024-1030. 2008.

Orlando, R. M. Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia.** 4: 2007.

Pacheco, W. F., Semaan, F. S., Almeida, V., Ritta, A. and Aucélio, R. Q. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química.** 5: 516-537. 2013.

Pallastrelli, M. B. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol.

Park, J. H., Kim, S. and Bard, A. J. Novel carbon-doped TiO₂ nanotube arrays with high aspect ratios for efficient solar water splitting. **Nano letters.** 6: 24-28. 2006.

Pinacho, D. G., Sánchez-Baeza, F., Pividori, M.-I. and Marco, M.-P. Electrochemical detection of fluoroquinolone antibiotics in milk using a magneto immunosensor. **Sensors.** 14: 15965-15980. 2014.

Pingarrón Carrazón, J. and Sánchez Batanero, P. Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones. 1a Edición, Editorial Síntesis. 60-85. **Madrid España.** 2003.

Pividori, M., Merkoçi, A. and Alegret, S. Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. **Analyst.** 126: 1551-1557. 2001.

Pividori, M., Merkoçi, A. and Alegret, S. Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor. **Biosensors and Bioelectronics.** 16: 1133-1142. 2001.

Pividori, M. I. and Alegret, S. Graphite-epoxy platforms for electrochemical genosensing. **Analytical letters.** 36: 1669-1695. 2003.

Raj, C. R., Okajima, T. and Ohsaka, T. Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry.** 543: 127-133. 2003.

Rocha-Santos, T. A. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **TRAC Trends in Analytical Chemistry.** 62: 28-36. 2014.

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H.-J. and Blankenhorn, I. Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of chromatography A.** 938: 199-210. 2001.

Saleem, K., Ali, I., Kulsum, U. and Aboul-Enein, H. Y. Recent developments in HPLC analysis of β -blockers in biological samples. **Journal of chromatographic science.** bmt030. 2013.

Santoro, M. I. R. M., Tsubone, C., Gomes, F. P., Kedor-Hackmann, E. R. M. and Garcia, P. L. Development and validation of high performance liquid chromatographic and UV-derivative spectrophotometric methods for the determination of sotalol hydrochloride in tablets. **Analytical Letters**. 41: 2044-2057. 2008.

Santos, S., Papini, O., Omosako, C., Pereira, M., Quintavalle, T., Riccio, M., Kurata, A., Pereira, V., Di-Pietro, G. and Della-Paschoa, O. A simple HPLC-fluorescence method for the measurement of R, S-sotalol in the plasma of patients with life-threatening cardiac arrhythmias. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33: 199-204. 2000.

Silva, T. A., Zanin, H., Vicentini, F. C., Corat, E. J. and Fatibello-Filho, O. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of atorvastatin calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode. **Analyst**. 139: 2832-2841. 2014.

Silverstein, R. M. Spectrometric Identification of compounds. .

Singh, K., Shakya, P., Kumar, A., Alok, S., Kamal, M. and Praksh, S. STEREOCHEMISTRY AND ITS ROLE IN DRUG DESIGN.

Slade, D., Ferreira, D. and Marais, J. P. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**. 66: 2177-2215. 2005.

Souza, M. d. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**. 20: 191-195. 1997.

Su, Y., Mu, X. and Qi, L. Development of a capillary electrophoresis system with Mn (ii) complexes and β -cyclodextrin as the dual chiral selectors for enantioseparation of dansyl amino acids and its application in screening enzyme inhibitors. **Rsc Advances**. 5: 28762-28768. 2015.

T., X. A. M. Analytical Methods for therapeutic Drug Monitoring and Toxicology.

Tarley, C. R. T., Sotomayor, M. D. P. T. and Kubota, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**. 28: 1087. 2005.

Tian, Y., Yang, F. and Yang, W. Redox behavior and stability of polypyrrole film in sulfuric acid. **Synthetic metals**. 156: 1052-1056. 2006.

Ticianelli, E. A. and Gonzalez, E. R. Eletroquímica: Princípios e Aplicações Vol. 17. varios. Livro DEF 2016 Dicionario de especialidades farmaceuticas

Vicentini, F. C., Ravanini, A. E., Figueiredo-Filho, L. C., Iniesta, J., Banks, C. E. and Fatibello-Filho, O. Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. **Electrochimica Acta**. 157: 125-133. 2015.

Vicentini, F. C., Raymundo-Pereira, P. A., Janegitz, B. C., Machado, S. A. and Fatibello-Filho, O. Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 227: 610-618. 2016.

Vollath, D. Nanoparticles-Nanocomposites? Nanomaterials: An Introduction for Beginners.

Wang, J. Analytical electrochemistry.

Wang, Y., Li, Y., Tang, L., Lu, J. and Li, J. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. **Electrochemistry Communications**. 11: 889-892. 2009.

Williams, E., Pividori, M., Merkoci, A., Forster, R. and Alegret, S. Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode. **Biosensors and bioelectronics**. 19: 165-175. 2003.

Yang, N., Wang, X. and Wan, Q. Electrochemical reduction of Zn (II) ions on L-cysteine coated gold electrodes. **Electrochimica acta**. 51: 2050-2056. 2006.

Yang, W., Gooding, J. J. and Hibbert, D. B. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 516: 10-16. 2001.

Zhang, H.-M., Yang, J.-Y., Du, L.-M., Li, C.-F. and Wu, H. Determination of sotalolol by fluorescence quenching method. **Analytical Methods**. 3: 1156-1162. 2011.

Zhang, H., Qi, L., Shen, Y., Qiao, J. and Mao, L. L-Lysine-derived ionic liquids as chiral ligands of Zn (II) complexes used in ligand-exchange CE. **Electrophoresis**. 34: 846-853. 2013.

Zhang, Q., Ackerman, E. and Li, Y. Photocatalytic reduction of CO₂ to fuels by novel TiO₂ nanotubes.