



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina

São Cristovão
Junho de 2009

ÂNGELO FRANCKLIN PITANGA

Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado hemina

Dissertação apresentada como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, pela Universidade Federal de Sergipe

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Lara Palmeira Macedo Arguelho

Co-orientador: Prof. Dr. José do Patrocínio Hora Alves

São Cristovão
Junho de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

P681d Pitanga, Ângelo Francklin
Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a
determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas
utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina /
Ângelo Francklin Pitanga. – São Cristóvão, 2009.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-
Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal de Sergipe, 2009.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria de Lara Palmeira Macedo
Arguelho.

1. Química analítica. 2. Eletroquímica. 3. Cetoconazol – Análise.
4. Voltametria. I. Título.

CDU 543.55

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

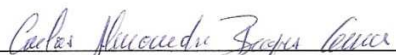
Membros da Comissão Julgadora de Dissertação
de Mestrado de Ângelo Francklin Pitanga
apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Sergipe, em
08/06/2009.



Profa. Dra. Maria de Lara Palmeira de Macedo Arguelho
DQI, UFS



Profa. Dra. Genira Carneiro de Araújo
UNEB



Prof. Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia
DQI, UFS

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, começo agradecendo a DEUS todo poderoso e a minha Nossa Senhora de Divina Pastora, que me iluminaram nessa caminhada, para que de forma serena e tranquila conseguisse realizar mais uma etapa tão almejada nesta luta incessante pelo conhecimento e pelo aperfeiçoamento profissional. *OBRIGADO SENHOR!!*

Gostaria de agradecer aos meus grandes amigos de caminhada universitária e contemporâneos do curso de pós-graduação; Pedro Henrique, Wendel, Elaine, Neemias, Clóvis e Débora. Meu muito obrigado e continuem com louvor essa vibração e entusiasmo pela Química.

Aos meus amigos Luciano, Alexandre, Rodrigo, Marquinhos, Lazão, Iuri, Roni, Paulinha, Gladston, Dr. Creso, Djalmi, ... Vocês não têm noção do quanto vocês significam para mim. Aos colegas professores, amigos inseparáveis de muitas horas de trabalho: Marcos, Roosevelt, Cláudio, Denílson, Batata, Claudi, Tavares, Claudionor, Figueroa, Jadson, Flávio, Thyago e Anderson a essa galera “A luta continua companheiros”.

Aos professores que fazem parte do LQA, Carlos, Patrocínio e Luciane. Bem como aos alunos, desejo que Deus ilumine para que possam fazer desse laboratório, cada dia que passa referência de competência, trabalho e produção de conhecimento.

Aos meus familiares, irmãos: Amanda, Cesar, Micheline e Sérgio. Sobrinhos, meus afilhados, meus tios, meus cunhados e cunhadas e em especial o meu Tio Fernando e meu primão Patrick. AMO TODOS. Vocês são a razão da minha vida.

Meu Pai, pela referência e persistência em acreditar que estudar não só dignifica o homem, bem como o liberta das algemas da ignorância, TE AMU.

E a três mulheres em especial que encontrei em minha vida: A 1ª, a minha grande professora, orientadora, psicóloga, (kkk) LARA. Uma benção dos céus para me ajudar nesse mestrado que tanto tive vontade em fazer. Professora Lara, desejo felicidades, não do tamanho atomístico mais sim do tamanho intergaláctico. A 2ª, meu coração, Priscila, um anjo que apareceu na minha vida. Pela paciência, persistência e toda atenção, Kora TE AMU. E a 3ª e inigualável, a minha mãe D. Maria Laudelina, meu suporte maior. De pouca cultura científica, mas uma pessoa que tem um coração que só as pessoas nobres podem ter, a minha mãe eu dedico todo esse trabalho.

RESUMO

Neste trabalho são abordados os estudos eletroquímicos bem como o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas com auxílio de eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina. Os experimentos foram realizados em solução tampão Britton-Robinson (BR) no pH 2, com uma composição do eletrodo de 50% de pasta de carbono e 50% de hemina, pois apresenta a melhor resposta analítica para o referido composto. Com base nos parâmetros eletroquímicos extraídos das técnicas de voltametria cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada, foi possível diagnosticar algumas informações relacionadas com o mecanismo da reação como: a reversibilidade do processo, a presença ou não de processos de adsorção e também o número de elétrons envolvidos nas reações eletroquímicas. Os resultados indicaram que a reação de redução do cetoconazol é irreversível com um pico a $-1,44\text{V}$ devido ao fenômeno de redução de CTZ. A metodologia analítica desenvolvida é rápida, sensível e precisa para a análise de rotina de comprimidos de CTZ. A curva analítica foi linear na região de concentração entre $1,8$ a $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, com limite de detecção de $1,7 \cdot 10^{-7}$ mol/L e com limite de quantificação de $5,6 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

Palavras-chaves: cetoconazol; hemina; voltametria

ABSTRACT

In this work electrochemical studies are broached as well the development of an analytical methodology to determinate ketoconazole in pharmaceuticals formulations with the help of electrode of carbon paste was modified with hemin. The tests were carried out in solution tampão Britton-Robinson (BR) in pH 2, with an electrode compounded by 50% of carbon past and 50% of hemin, for having the best analytical answer to the compound in question. Based on the electrochemical parameters that were taken of the technique cyclic voltammetry, differential pulse and of the square wave, it was possible diagnostic some information that was connected to the reaction mechanism such as: the reversibility of the process, the existence or not of adsorption process and the number of electrons that is involved in the electrochemical reactions. The resulted said that the reaction of ketoconazole reduction is irreversible, with one definite peaks at $-1,44V$ device phenomenon of reduction do CTZ. The analytical methodology that was developed is fast, sensible and precise, to routine analysis on pills of CTZ. The analytic curve was linear in the concentration area between $1,8$ and $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, with detection limit $1,7 \cdot 10^{-7}$ mol/L and quantification limit in $5,6 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

Keywords: ketoconazole; hemin; voltammetry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do grupo funcional imidazólico	5
Figura 2. Estrutura química do cetoconazol	5
Figura 3. Esquema de célula de dois eletrodos ligada ao polarógrafo	16
Figura 4. Célula polarográfica/voltamétrica de três eletrodos. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático	17
Figura 5. Voltametria de pulso normal. (a) esquema de aplicação do pulso começando em E_{base} . A corrente medida no fim dos pulsos supondo que I para E base é zero. No DME o fim do pulso está sincronizado com a queda da gota; (b) perfil $I - E$ esquemático	20
Figura 6. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial. (a) Em instrumentos analógicos; (b) Em instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença entre eles é que é registrada: $I = I_{S2} - I_{S1}$	21
Figura 7. Sequência potencial vs. tempo (E vs t) usada em voltametria de onda quadrada	23

Figura 8. Voltamograma cíclico para um sistema reversível, com destaque para os parâmetros mais importantes	24
Figura 9. Estruturas químicas: a) protoporfirina IX de ferro III; b) estrutura do grupo heme da hemoglobina	31
Figura 10. Esquema de um espectrofotômetro de UV – VIS de arranjo de diodos	36
Figura 11. Potenciostato AutoLab utilizado na realização dos experimentos.....	42
Figura 12. Representação de célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas: (CE) eletrodo auxiliar; (ET) eletrodo de trabalho (EPMC); e (ER) eletrodo de referencia	42
Figura 13. Esquema dos eletrodos de pasta de carbono e eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina	44
Figura 14. Estudo comparativo do sinal analítico obtido por VOQ em uma solução de CTZ $4,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, em tampão BR (pH 2,0), a) branco com EPC; b) solução de CTZ com EPC; c) branco com EPCM e d) solução de CTZ com EPCM. Condições $v = 200$ mV/s, $f = 40$ Hz e $\Delta E = 50$ mV.....	47
Figura 15. Perfil do sinal analítico para o estudo da variação da % em massa de hemina e pasta de carbono, com solução de [CTZ] = $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $\Delta E = 50$ mV, $v = 40$ mV/s e pH = 2.....	48
Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial para a redução de CTZ $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina em tampão (BR) pH 2,0; $v = 40$ mV/s para o estudo da variação da amplitude (em mV): a) branco; b) 10; c) 20; d) 30; e) 40; f) 50 e g) 100.....	49
Figura 17. Variação da corrente de pico em função da velocidade de varredura (v) para o cetoconazol ($3,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L), em solução tampão BR (pH = 2,0) e $\Delta E = 50$ mV	51
Figura 18. Variação da corrente de pico em função da amplitude (ΔE) para o cetoconazol ($2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L), em tampão BR (pH 2,0) e $v = 50$ mV/s, pela técnica de VDP.....	52
Figura 19. Voltamograma de onda quadrada para o CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L em tampão BR (pH 2,0), $v = 100$ mV/s, $f = 40$ Hz em função da variação da amplitude de pulso: a) 10 mV; b) 20 mV; c) 30 mV; d) 40 mV e e) 50 mV	53

Figura 20. Variação da corrente de pico catódica em função da raiz quadrada da frequência para o CTZ ($2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão BR (pH 2,0), $\Delta E = 50$ mV e $v = 100$ mV/s	55
Figura 21. Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico no sistema $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L de CTZ em solução tampão BR pH 2,0.....	59
Figura 22. Voltamogramas cíclicos sucessivos de uma solução de [CTZ] = $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, em tampão BR (pH 2,0) e $v = 200$ mV/s.....	60
Figura 23. Voltamograma cíclico de CTZ na solução de tampão BR (pH 2,0) utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, em a) branco; b) CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L e $v = 200$ mV/s.....	61
Figura 24. Voltamogramas cíclicos para a redução de CTZ utilizando eletrodo modificado com hemina em pH 2,0 e com diferentes concentrações: a) branco; b) $2,0 \cdot 10^{-6}$; c) $2,80 \cdot 10^{-6}$; d) $3,60 \cdot 10^{-6}$; e) $4,30 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $v = 200$ mV/s.....	62
Figura 25. Esquema geral do processo eletrolítico do cetoconazol na presença de hemina	64
Figura 26. Esquema simplificado do processo de redução do cetoconazol	65
Figura 27. Voltamograma de onda quadrada para a redução do CTZ utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina em pH 2,0 e com diferentes concentrações: a) branco; b) $2,50 \cdot 10^{-6}$; c) $3,07 \cdot 10^{-6}$; d) $4,00 \cdot 10^{-6}$; e) $4,37 \cdot 10^{-6}$; f) $4,70 \cdot 10^{-6}$; g) $5,00 \cdot 10^{-6}$ mol/L com $f = 40$ Hz e $\Delta E = 50$ mV	66
Figura 28. Curva analítica obtida para o CTZ empregando EPCM com hemina em solução tampão BR pH 2,0 obtida pela técnica de voltametria de onda quadrada	67
Figura 29. Curva analítica do CTZ utilizando espectrofotometria de UV – VIS (209 nm)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de alguns medicamentos e suas técnicas analíticas desenvolvidas para a sua determinação.....	11
Tabela 2. Técnicas usadas para a determinação de traços e seus limites de detecção típicos. ΔE = amplitude de pulso; f = frequência; t_d = tempo de pré-concentração; I_p = corrente de pico; E_p = potencial de pulso	19
Tabela 3. Comprimentos de onda aproximado das cores	34
Tabela 4. Procedência e pureza dos reagentes	40
Tabela 5. Parâmetros estudados e seus valores otimizados para voltametria de pulso diferencial.....	50
Tabela 6. Variação da corrente de pico e potencial de pico em função da frequência em voltametria de onda quadrada (CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L; pH = 2,0; v = 100 mV/s e ΔE = 50 mV).....	54
Tabela 7. Parâmetros estudados e valores otimizados para voltametria de onda quadrada	56

Tabela 8. Efeito do pH no potencial e na corrente de pico do cetoconazol ($v = 40\text{mV/s}$; $\Delta E = 50\text{ mV}$ e $[\text{CTZ}] = 2,0 \cdot 10^{-6}\text{ mol/L}$).....	56
Tabela 9. Parâmetros voltamétricos do sistema $2,0 \cdot 10^{-6}\text{mol/L}$ de cetoconazol em solução tampão pH 2,0	58
Tabela 10. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de cetoconazol	65
Tabela 11. Comparação de dados de análise estatística entre as técnicas de VPD e VOQ	68
Tabela 12. Determinação de cetoconazol em produtos farmacêuticos empregando-se o EPCM com hemina proposto e espectrofotometria de UV – VIS como método comparativo	70
Tabela 13. Dados comparativos da análise estatística da determinação de cetoconazol em produtos farmacêuticos empregando-se o EPCM com hemina e espectrofotometria de UV – VIS como método comparativo	71
Tabela 14. Valores obtidos pela execução dos testes estatísticos F e T para comparação de métodos diferentes que foram analisados para as amostras de medicamentos de marca e genérico	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento

EUA – Estados Unidos da América

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEME - Central de Medicamentos

a.c. – Antes de Cristo

CTZ – Cetoconazol

°C – Graus Celsius

pKa – Potencial da constante de ionização de ácidos

μg – Micrograma

mL – Mililitros

mg – Miligramas

pH – Potencial hidrogeniônico

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

% - Percentual

CYP – Citocromo da família P

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência

HMDE – Eletrodo gotejante de mercúrio

DNA – ácido desorribonúcleico

DME – Eletrodo de Mercúrio

VSL – Voltametria de pulso linear

VDP – Voltametria de pulso diferencial

VOQ – Voltametria de onda quadrada

VPN – Voltametria de pulso normal

VC – Voltametria cíclica

ΔE – Amplitude de pulso

f – Frequência

T_d – Tempo de pré-concentração

I_p – Intensidade de corrente de pico

E_p – Potencial de pico

DC – Corrente contínua

mV – milivolts

ms – milisegundos

V – Volts

t – Tempo

I_0 – Luz incidente

I_T – Luz transmitida

ϵ – Coeficiente de absorvidade molar

b – Caminho óptico

C – Concentração

EM – Eletrodo modificado

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

EPCM – Eletrodo de pasta de carbono modificado

GOD – Enzima glicose oxidase

Nm – Nanômetros

cm – Centímetros

g – Grama

μL – Microlitro

mol – Unidade de quantidade de matéria

L – Litros

BR – Tampão Britton-Robinson

v – Velocidade

$E_{1/2}$ - Potencial de meia-onda

s – Segundo

Hz – Hertz

n – Número de elétrons

F – Constante de Faraday

R – Constante dos gases ideais

T – Temperatura

\square - Concentração superficial da espécie adsorvida

Q – Carga

D – Coeficiente de difusão da espécie eletroativa

r – Raio

A – Área do eletrodo

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

ICH – Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation)

RDS – Desvio padrão relativo

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. A importância dos fármacos	1
1.2. O cetoconazol	5
1.2.1. A importância físico-química do cetoconazol	5
1.2.2. As propriedades farmacocinéticas.....	6
1.2.3. As propriedades farmacodinâmicas e o mecanismo de ação	7
2.0. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
2.1. Técnicas analíticas utilizadas para o controle de qualidade dos fármacos	9
2.2. Técnicas voltamétricas utilizadas no controle da qualidade dos fármacos.....	13
2.3. As células voltamétricas	15
2.4. Técnicas voltamétricas	18
2.4.1. Polarografia ou voltametria clássica	18
2.4.2. Voltametria de pulso.....	19
2.4.2.1. Voltametria de pulso normal	20
2.4.2.2. Voltametria de pulso diferencial.....	21
2.4.3. Voltametria de onda quadrada	22
2.4.4. Voltametria cíclica	23
2.5. Eletrodos quimicamente modificados utilizados na voltametria.....	24
2.5.1. Eletrodos de pasta de carbono modificados com materiais biológicos.....	28
2.5.2. Eletrodos de pasta de carbono modificados a base de hemina	30
2.6. Espectrofotometria Ultravioleta – Visível.....	34
3.0. JUSTIFICATIVA	37
4.0. OBJETIVOS	39
5.0. METODOLOGIA.....	40
5.1. Reagentes e soluções	40
5.1.1. Solução estoque padrão de cetoconazol.....	41
5.1.2. Preparo das soluções utilizadas como amostras.....	41
5.1.3. Solução tampão.....	42
5.2. Equipamentos	42
5.2.1. Medidas voltamétricas	42
5.2.2. pHmetro.....	43
5.2.3. Medidas espectrofotométricas.....	43
5.2.4. Balança analítica	43

5.3. Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina.....	43
5.4. Procedimento	44
6.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1. Estudo da composição da pasta de carbono modificado com hemina.....	46
6.2. Estudo do comportamento voltamétrico de cetoconazol por voltametria de pulso diferencial e otimização de parâmetros experimentais.....	48
6.3. Estudo do comportamento voltamétrico do cetoconazol por voltametria de onda quadrada e otimização dos parâmetros experimentais	51
6.3.1. Estudo da variação da amplitude de pulso.....	52
6.3.2. Estudo da variação da frequência de aplicação de pulso.....	53
6.4. Estudo do comportamento voltamétrico de cetoconazol frente ao eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina.....	56
6.4.1. Estudo do pH.....	56
6.4.2. Efeito da velocidade de varredura de potenciais	57
6.5. Estudo dos interferentes em potencial	65
6.6. Curvas analíticas.....	66
6.7. Aplicação e teste de recuperação	70
7.0. CONCLUÇÕES	73
8.0. ATIVIDADES FUTURAS.....	75
9.0. BIBLIOGRAFIA.....	76

Introdução

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. A importância dos medicamentos

Os medicamentos surgiram da necessidade de curar doenças graças ao instinto de sobrevivência dos nossos ancestrais. Na antiguidade, embora as práticas terapêuticas estivessem muitas vezes baseadas no misticismo, grande parte do tratamento das doenças envolvia o uso de drogas, principalmente de origem vegetal e animal. O homem buscou no meio ambiente o remédio, elemento externo, que proporcionara a cicatrização dos ferimentos, a melhoria dos sintomas, até mesmo a suspensão da morte (RENOVATO, 2008). No começo do século XIX a maioria dos medicamentos eram de origem natural, de estrutura química e natureza desconhecida (MELO e colaboradores, 2006). Com o desenvolvimento da síntese orgânica, no século XX, os fármacos de origem sintética foram substituindo os de origem natural.

A primeira síntese metódica e intencional de compostos químicos para combater uma doença, foi realizada em 1910 por Paul Ehrlich (Prêmio Nobel em Medicina de 1908). Ele modificou, de forma intencional e dirigida, a estrutura de uma série de substâncias para combater a sífilis, os arsenobenzenos, que se tornaram referência no tratamento dessa doença e só deixaram de ser utilizados com a introdução dos antibióticos. Estes últimos representaram um avanço, a partir da década de 30, com a síntese dos primeiros antibióticos pertencentes à família das sulfas (BNDES, 2003).

Após 1940, ocorreu a introdução maciça de novos fármacos, que trouxeram à população a possibilidade de curar enfermidades até então fatais (MELO e colaboradores, 2006). Se estendendo até a década de 80, quando foram introduzidos

no mercado farmacêutico dos EUA, cerca de 1.165 novos fármacos. Depois deste período houve uma redução do número de novos medicamentos, em parte devido às muitas exigências de testes farmacológicos e toxicológicos (BAUTITZ, 2006). No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2002 existiam 15.831 medicamentos em comercialização sendo que mais de 1 bilhão de unidades foram vendidas no mercado varejista (BAUTITZ, 2006). Nas últimas décadas, têm-se ampliado a abrangência do medicamento, de modo que, hoje, existem produtos para quase todas as enfermidades. Além disso, os medicamentos são cada vez mais seguros e eficazes, contribuindo para aumentar a expectativa e qualidade de vida da população (OLIVEIRA e colaboradores, 2006).

Os medicamentos são produzidos com a intenção de causar um efeito biológico (SANDERSON e colaboradores, 2004; URASE e KIKUTA, 2005a, PÉREZ e BARCELÓ, 2007). Têm um papel importante na prevenção e tratamento das doenças dos humanos e dos diversos animais. Sendo eles compostos por:

- Fármaco, também conhecido de princípio ativo ou base medicamentosa, que é a substância ativa que produz o efeito terapêutico desejado; e
- Aditivos, que são substâncias adicionadas ao fármaco para alterar e complementar suas propriedades, tais como organolépticas, e as formas de administração, o estado físico-químico e a velocidade de absorção (BNDES, 2003).

As suas classificações são dadas seguindo diversos critérios, entres eles: emprego terapêutico, estrutura química, forma de comercialização e ação farmacológica. Dentro de um dos critérios adotados classificam-se os medicamentos em dois grupos: os protegidos por direitos de patentes, os de marca; e aqueles cujas patentes estão vencidas, que são os genéricos (BNDES, 2003). Os medicamentos genéricos são comercializados com o nome da substância ativa e apresentam a mesma

quantidade do princípio ativo, a mesma concentração, forma farmacêutica e via de administração do medicamento (BNDES, 2003; PEREIRA e colaboradores, 2005).

No Brasil alguns fatos merecem destaques, estando esses relacionados com a produção e distribuição de fármacos. O primeiro foi quando em 1970 foi criada a Central de Medicamentos (CEME) (BNDES, 2003), que tinha como finalidade a definição de políticas públicas que procuravam comprar e distribuir os medicamentos mais importantes a população de menor poder aquisitivo (BNDES, 2003; MELO e colaboradores, 2006). E o outro fato importante, foi em 1999, com a aprovação da Lei 9.787 que instituiu os medicamentos genéricos no Brasil, seguindo modelos conceituais aplicados por vários países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, etc. A referida lei estabelece critérios para a produção, controle de qualidade, teste de bioequivalência, biodisponibilidade, registro, prescrição e dispensação dos genéricos (GONÇALVES, 2005). Os seis primeiros medicamentos genéricos do país foram: ampicilina e cefalexina (antibiótico); cloridrato de ranitidina (antiulceroso); cetoconazol (antimicótico); furosemida (diurético) e sulfato de salbutamol (broncodilatador).

Nos últimos anos houve um aumento das infecções fúngicas sistêmicas (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004) o que repercutiu no crescimento da produção e comercialização de medicamentos destinados ao tratamento desse tipo de enfermidade, os chamados de antimicóticos.

Os fungos, responsáveis pelas micoses, ocupam lugar privilegiado na medicina do ponto de vista fisioterápico. São microorganismos que se encontram no solo, na água, nos vegetais, no ar, nos animais e detritos em geral. São eucariontes, heterotróficos e possuem parede celular. Muitos fungos apresentam potencial

patogênico para seres humanos, e de acordo com os tecidos e órgãos afetados, as micoses são classificadas em micoses superficiais, da pele, unhas e pêlos; micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas (PEREIRA, 1999; BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

Desde épocas muito antigas que alguns agentes antimicóticos são conhecidos como, por exemplo; o enxofre, que de acordo com Homero no século VIII a.c. era empregado como purificante. Outros compostos eram também utilizados como sulfato de cobre, cloreto de zinco e o arsênio. No século XIX, foram utilizadas várias formas menos tóxicas de cobre, como sulfato básico, óxidos e silicatos de cobre e outras formas de enxofre (PEREIRA, 1999).

Somente a partir da década de 30, é que ocorreu o desenvolvimento de compostos orgânicos fungicidas. Os primeiros compostos foram os ditiocarbamatos (PEREIRA, 1999). Foi quando em 1944 (PÉREZ-RIVERA, 2009), Wooley descobriu um composto azólico, que foi o benzimidazol, o qual apresentava propriedades antimicóticas, contudo, ainda até os dias de hoje são realizadas pesquisas visando à obtenção de derivados azólicos com utilidade no tratamento de micoses (VIÇOSA, 2003).

As drogas antifúngicas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação. Os medicamentos disponíveis atuam: (1) na membrana celular: (a) azóis: miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol; (b) poliênicos: anfotericina B e nistatina; (c) alilaminas: terbinafina; (2) na síntese de ácidos nucleicos: (a) flucitosina; (b) griseofulvina; (3) na parede celular: (a) equinocandinas; (b) papulocandinas; (c) polioxinas; (d) nicomicinas. Os derivados azólicos são subdivididos em dois grandes grupos: os imidazólicos (Figura 1): possuem dois átomos de nitrogênio no anel (cetoconazol, clotrimazol, miconazol); e os triazólicos, de síntese mais recente e

apresentam três átomos de nitrogênio no anel (fluconazol e itraconazol) (PÉREZ-RIVERA e colaboradores, 2009).

Vale também ressaltar que os fungicidas derivados dos compostos imidazólicos e triazólicos, além de serem usados no tratamento clínico de humanos, podem servir na agricultura exterminando fungos de plantações de hortaliças, e em outras culturas agrícolas (HASSELBERG e colaboradores, 2005) e com uso tópico veterinário (VERTZONI e colaboradores, 2006).

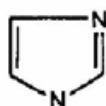


Figura 1. Estrutura química do grupo funcional imidazólico.

1.2. O cetoconazol

O cetoconazol (CTZ) (Figura 2) foi o primeiro composto imidazólico disponível para tratamento oral, sendo lançado no início da década de 80, representou um avanço na terapêutica das micoses sistêmicas, por apresentar atividade antimicótica ampla, no combate de fungos e microorganismos gram positivos. Pode ser absorvido por via oral, ser menos lipofílico e capaz de manter níveis sanguíneos mais elevados (ABDEL-GAWAD, 1997; SKIBA e colaboradores, 2000; VIÇOSA, 2003; ARRANZ e colaboradores, 2003; VERTZONI e colaboradores, 2006; KOVÁCS e colaboradores, 2009). Ainda sendo utilizado no tratamento de carcinoma prostático (VERTZONI e colaboradores, 2006) e da síndrome de Cushing, que é um excesso de secreção de glicocorticóide (LIBERMAN, 2003; HINSON e RAVEN, 2006).

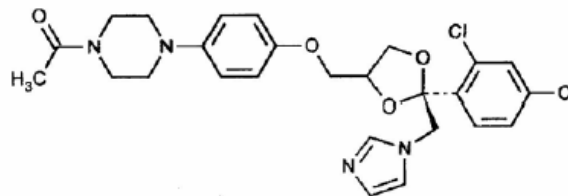


Figura 2. Estrutura química do cetoconazol.

1.2.1. As propriedades físico-químicas do cetoconazol

- O nome químico do cetoconazol é cis-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil) - 2-(1H-imidazol-1-ilmetil) - 1,3 -dioxalan - 4 -il[metoxi fenil] -peperazina, apresenta fórmula molecular $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e massa molar 531,44 g/mol (ABDEL-GAWAD, 1997; SKIBA e colaboradores, 2000; VIÇOSA, 2003; VERTZONI e colaboradores, 2006).

- O composto apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco ou quase branco, possui faixa de temperatura de fusão entre 148 – 152 °C.

- O cetoconazol é uma base fraca dibásica com $pK_a = 6,5$ e $pK_a = 2,9$ (SKIBA e colaboradores, 2000).

- É praticamente insolúvel em água com solubilidade intrínseca em água de 4,5 $\mu\text{g/mL}$. É solúvel em etanol 1:54, em clorofórmio 1:2, em metanol 1:9 e muito pouco solúvel em éter.

1.2.2. Propriedades farmacocinéticas

O Cetoconazol é rapidamente absorvido por via oral. Após a administração oral em doses de 200, 400 e 800 mg, o pico de concentração plasmática de CTZ é de aproximadamente 4,8 e 20 µg/mL, respectivamente após 2 – 3 horas (VIÇOSA, 2003). A absorção pode ser diminuída em alguns pacientes pela acidez estomacal reduzida. Os fármacos alcalinos (antiácidos orais) e bloqueadores de receptores H₂ diminuem a absorção do cetoconazol por aumentarem o pH do meio digestivo. Devido a sua baixa solubilidade em água não se utiliza o CTZ sob a forma de injetável, sendo assim, não se encontra descrita a biodisponibilidade absoluta do fármaco. Sua absorção é menor em indivíduos idosos, em pessoas submetidas à gastrectomia e em pacientes com AIDS, que têm deficiência de secreção gástrica ácida (VIÇOSA, 2003).

No sangue 84% do cetoconazol está ligado a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina; 15% está no fígado e eritrócitos, e 1% está na forma livre. É metabolizado no fígado e tem ação hepatotóxica, ocorrendo alterações da função hepática em 2% a 5% dos pacientes utilizando doses terapêuticas convencionais. Eventualmente, quadros clínicos de hepatite tóxica têm sido registrados. No homem a importante etapa metabólica é a oxidação do anel imidazol, degradação do imidazol oxidado, dealquilação oxidativa, degradação oxidativa do anel piperazínico e a hidroxilação do anel aromático. É excretado sob a forma de metabólitos inativos na urina (excreção menor que 1%), bile e fezes (VIÇOSA, 2003; ARRANZ e colaboradores, 2005).

1.2.3. Propriedades farmacodinâmicas e o mecanismo de ação

É um fármaco de amplo espectro de ação contra fungos, mostrando-se ativos contra os dermatófitos (VIÇOSA, 2003). As células fúngicas, de modo semelhante às células humanas, são eucarióticas. Existe, portanto, menor diferença fisiológica entre ambas do que entre as células bacterianas procarióticas e as células do hospedeiro humano eucariótico. Conseqüentemente, em comparação com as bactérias, existem menos pontos fracos nas células fúngicas que possam ser agredidas sem ao mesmo tempo afetar também as células dos hospedeiros (PEREIRA, 1999).

Como os demais derivados imidazólicos antifúngicos, o cetoconazol exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos sensíveis (SKIBA e colaboradores, 2000), que possam perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo por fim, o rompimento da membrana. Esta ação decorre de sua interferência na síntese de esteróis da membrana, inibindo a formação do ergosterol a partir do seu precursor, o lanosterol. Esta atividade resulta da ação inibitória do cetoconazol (e diversos derivados azólicos) sobre a enzima citocromo da família P-450 (CYP P-450) (LIBERMAN, 2003; VIÇOSA, 2003; SAADEDDIN e colaboradores, 2004; FOSSI e colaboradores, 2006; PÉREZ-RIVERA e colaboradores, 2009), especialmente CYP 1A e CYP 3A (HASSELBERG e colaboradores, 2005; HINSON e RAVEN, 2006; STAUB e colaboradores, 2007). Em vários órgãos como: fígado, rim, adrenal, testículos e ovários (LIBERMAN, 2003). As enzimas são responsáveis pela síntese e degradação dos ácidos graxos e esteróides endógenos nas células animais, vegetais e seres unicelulares. Esta ação sobre a membrana é variável de acordo com o fungo e a dose do medicamento, agindo não só sobre as células fúngicas, mas, também, inibindo a síntese de estrogênios e testosterona no homem. Além deste mecanismo de ação, o cetoconazol e demais derivados imidazólicos alteram a síntese de triglicerídeos e fosfolípidios e, em alta concentração, provocam a morte celular por causarem acúmulo de água oxigenada ao bloquearem enzimas peroxidativas (VIÇOSA, 2003).

A atividade e seletividade desses agentes antifúngicos dependem de sua afinidade com o íon ferro do heme no sistema enzimático 14 α –desmetilase dependente do CYP P-450 (PEREIRA, 1999; VIÇOSA, 2003; STAUB e colaboradores, 2007; PÉREZ-RIVERA e colaboradores, 2009). Os derivados imidazólicos e triazólicos ligam-se ao ferro da enzima CYP, via nitrogênio terciário dos imidazóis ou ao nitrogênio quaternário dos triazóis, formando um complexo hexacoordenado na ligação com o oxigênio. Isto resulta na inibição da reação monooxigenase catalisada pelo CYP P-450 de acordo com o esquema simplificado:



(RH = substrato lipofílico, em geral lanosterol) (PEREIRA, 1999).

A complexação do fármaco com o sítio ativo do heme, causa a inibição da síntese do ergosterol, provocando o acúmulo do esteróide 24-metilenodihidrolanosterol que, uma vez acumulado, provoca a desorganização do sistema compacto dos fosfolipídeos, prejudicando outros sistemas enzimáticos, como o ATPase e enzimas que são responsáveis pelo transporte de elétrons (PEREIRA, 1999).

Fundamentação Teórica

2.0. Fundamentação Teórica

2.1. Técnicas analíticas utilizadas no controle de qualidade de fármacos

A consciência da importância do controle de qualidade é histórica, pois, em 1352, João, o Bom, Rei da França, legislou sobre a necessidade de serem controladas as preparações farmacêuticas. Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas o controle de qualidade evoluiu significativamente (FERRÃO e SOUZA, 2006). A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreversíveis (LA ROCA e colaboradores, 2007).

E neste caminho, a química analítica é a área que centraliza a responsabilidade pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise, aplicáveis nos mais variados campos de pesquisa científica. Esta contínua procura pelo estabelecimento de metodologias adequadas, para os diversos tipos de necessidades, tem propiciado um crescimento significativo da área, assim como tem sido fundamental para o progresso científico de outras. Dentro deste contexto, é de fundamental importância o aporte que a química analítica tem dado a indústria, principalmente no que diz respeito ao estabelecimento de ferramentas capazes de serem aplicadas em rotinas nos laboratórios de controle de qualidade e de processos de produção.

A análise química de muitas substâncias de interesse corresponde a um processo bastante complexo, basicamente devido a três fatores limitantes:

- i) necessidade de determinar quantidades cada vez menores, muitas vezes abaixo do limite de quantificação oferecida pelas técnicas disponíveis;
- ii) interferências que derivam do caráter complexo de grande parte das matrizes de interesse, e
- iii) necessidade de diferenciar e quantificar diversas espécies únicas associadas a um mesmo produto (SOUZA e colaboradores, 2003; LA ROCA e colaboradores, 2007).

Com o objetivo de contornar alguns destes fatores limitantes, e graças ao progresso contínuo das técnicas instrumentais, a indústria farmacêutica busca o emprego de metodologias que ofereçam maior sensibilidade, seletividade, robustez, precisão, exatidão e rapidez (SOTOMAYOR e colaboradores, 2008).

Considerando-se o aumento expressivo do número de fármacos em comercialização nos últimos anos, torna-se necessário o estudo dos mesmos visando garantir a qualidade, eficácia e segurança destes medicamentos aos usuários. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de medicamentos. As análises a serem efetuadas devem partir de um bom planejamento, contemplando aspectos como identificação e quantificação da substância ativa, identificação e determinação dos níveis de impurezas, produtos de degradação e, finalmente, a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação, garantindo a análise completa do produto.

O controle da qualidade de produtos farmacêuticos é um ramo da química analítica que tem um grande impacto econômico, social e principalmente na saúde pública, de forma tal, que é imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas confiáveis, rápidas e precisas para a determinação de princípios ativos (SOTOMAYOR e colaboradores, 2008). Neste contexto, as técnicas analíticas apresentam-se como ferramentas adequadas e promissoras para esses objetivos. A literatura relata uma ampla gama de técnicas utilizadas na determinação de fármacos (Tabela 1). Tais como: as espectroscopias: de massa, infravermelho, UV – VIS, fluorescência; as técnicas de cromatografias e a eletroforese. Sejam elas aplicadas na determinação de princípios ativos, bem como em outras matrizes, como urina, plasma, sangue, etc.

Tabela 1. Relação de alguns medicamentos e suas técnicas analíticas desenvolvidas para a sua determinação.

Fármaco	Classe de atuação	Técnicas Analíticas	Fonte
Cetoconazol	Antimicótico	UV – VIS com derivatização	OJEDA e ROJAS, 2009
		HPLC	ABDEL- MOETY e colaboradores, 2002
		UV – VIS	ABOU-ATTIA e colaboradores, 2003
		Polarografia com	ABDEL-GAWAD,

		HMDE	1997
Clotrimazol	Antimicótico	HPLC	ABDEL-MOETY e colaboradores, 2002
		Polarografia de pulso	PEREIRA e colaboradores, 2002
Fluconazol	Antimicótico	HPLC	ABDEL-MOETY e colaboradores, 2002
Metronidazol	Antimicótico	Voltametria de pulso diferencial com eletrodo de carbono grafite modificado com DNA	LIN-JIANG, 2006
		Voltametria adsortiva de onda quadrada com eletrodo de fibra de carbono	BARTLETT e colaboradores, 2005
Miconazol	Antimicótico	Polarografia de pulso diferencial	PEREIRA e colaboradores, 2002
Voriconazol	Antimicótico	HPLC	SRINUBABU e colaboradores, 2007
Secnidazol	Antimicótico	Polarografia de pulso diferencial	LICHTIG e colaboradores, 1996

Benznidazol	Antiparasitário	Voltametria de pulso diferencial com eletrodo de carbono grafite modificado com DNA	La-SCALEA e colaboradores, 2002
		HPLC	DA SILVA e colaboradores, 2007

Adicionalmente as técnicas eletroanalíticas têm sido usadas para a determinação de um grande grupo de fármacos, apresentando vantagens como: rapidez, sensibilidade e ausência de efeito de matriz, quando comparada a outras técnicas (BOSCH e colaboradores, 2007). Além da realização de análises diretamente na amostra sem a necessidade de etapas de pré-tratamento ou de reações por derivatização, inclusive para materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas, sendo aspectos muito positivos que motivam o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos (SOUZA e colaboradores, 2003). A intensa utilização desta técnica na análise de compostos com aplicações farmacêuticas, está intimamente ligado com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, que possibilitam a determinação de ultra-traços, principalmente no controle de qualidade de fármacos. Dessa forma têm sido largamente empregada, apresentando várias vantagens que justificam o aumento do número de trabalhos descritos na literatura (SOUZA e colaboradores, 2003).

2.2. As técnicas voltamétricas utilizadas no controle de qualidade de fármacos

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroquímicos nos quais as informações sobre o analito são obtidas através de medidas de correntes em função do potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo de trabalho, também chamado de indicador (SKOOG, 2002).

As espécies químicas analisadas são colocadas em uma cela eletroquímica, a qual é constituída por no mínimo dois eletrodos: O microeletrodo (eletrodo de trabalho: comumente feito de material inerte, como ouro, platina, carbono, mercúrio) (WANG, 2000) e o eletrodo de referência: que apresenta uma grande área superficial. Ao aplicar um potencial de varredura aos dois eletrodos, o eletrodo de trabalho assume o potencial aplicado a ele (eletrodo polarizável) enquanto que o de referência mantém seu potencial constante (eletrodo não-polarizável). Isso ocorre em decorrência dos eletrodos apresentarem áreas superficiais de tamanhos diferentes.

Historicamente, o campo da voltametria foi o que mais se desenvolveu, a partir da polarografia, que é um tipo particular de voltametria, a qual foi descoberta pelo químico tchecoslovaco Jaroslav Heyrovsky no início dos anos 1920 (Skoog, 2002). A polarografia que é ainda um ramo importante da voltametria, difere dos outros tipos de voltametria porque o microeletrodo tem a forma de um eletrodo gotejante de mercúrio (DME) (SKOOG, 2002; WANG, 2000), a sua importância deve-se às suas propriedades especiais deste tipo de eletrodo como em particular, a fácil restauração do eletrodo e o largo alcance na faixa de potenciais catódicos (WANG, 2000).

A voltametria é largamente utilizada pelos químicos inorgânicos, físico-químicos, bioquímicos entre outros, que aplicam em estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em diferentes meios, bem como no estudo de processos de adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados (SKOOG, 2002). Diante de tantas oportunidades de estudos que podem ser realizados observa-se que as medidas eletroquímicas podem ser usadas com largos propósitos de aplicações, incluindo monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial e análises bioquímicas (WANG, 2000).

As técnicas voltamétricas apresentam algumas características que permitem a sua automação a baixos custos, o que permite a realização de medidas *in situ*, que podem minimizar algumas mudanças nas amostras quando estão sendo transportadas para o laboratório (BUFFLE e WAEBER, 2005). Nos últimos anos com o seu desenvolvimento e aperfeiçoamento tem possibilitado a sua utilização, e algumas destas características podem-se citar:

- Podem ser realizadas em aplicações ambientais, com técnicas convencionais ou derivadas, e ainda podem ser executados trabalhos de rotina no campo ou *in situ*;
- O desenvolvimento de equipamentos mais resistentes, sensores e microeletrodos que monitoram por um longo período de tempo;
- O desenvolvimento de conceitos específicos que permitam a interpretação correta dos sinais voltamétricos desses sensores;
- O desenvolvimento da eletrônica, com a produção de aparelhos mais compactos, de baixo custo e de fácil automação (BUFFLE e WAEBER, 2005).

2.3. As células voltamétricas

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria são evidentemente, do tipo eletrolítica, e podem ser encontradas com dois ou três eletrodos. As primeiras versões apresentavam células com dois eletrodos que foram utilizadas por um longo tempo. Na célula com dois eletrodos (Figura 3) tem-se um eletrodo de trabalho, de superfície pequena, ou seja, um microeletrodo. No caso da polarografia o eletrodo de trabalho é um microeletrodo gotejante de mercúrio. O potencial é aplicado no eletrodo de trabalho frente a um eletrodo de referência, usualmente um eletrodo de calomelano saturado, de área superficial grande, para que apenas o eletrodo de trabalho se polarize. Essa célula apresenta alguns inconvenientes, pois a corrente resultante de varredura de potencial passa através do eletrodo de referência, isto obriga a usar-se em eletrodo de calomelano de reservatório grande de KCl , devido às reações que ocorrem no mesmo (ALEIXO, 2006).

Devido à passagem de corrente através do eletrodo de referência e reações que ocorrem no mesmo, isto afetara as medidas de concentrações da ordem de 10^{-4} mol/L, pois essa corrente se aproximara do valor de corrente de difusão. Outra limitação é a resistência da célula. Quando ela aumenta, como no caso de meio não aquoso, aumentará a corrente que passará através dos eletrodos o que provocará distorções nos polarogramas, tornando inviável a utilização da técnica nas condições descritas (ALEIXO, 2006).

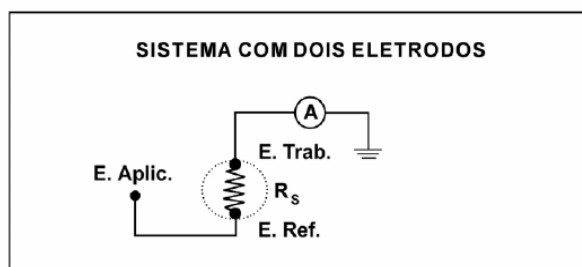


Figura 3. Esquema de célula de dois eletrodos ligada ao polarógrafo (ALEIXO, 2006).

Para resolver essas limitações das células de dois eletrodos, foi desenvolvida a célula de três eletrodos (Figura 4). Onde o terceiro eletrodo é chamado de eletrodo auxiliar, podendo ser platina, ouro, carbono vítreo, etc. Ele foi introduzido na célula voltamétrica para assegurar o sistema potenciostático (ALEIXO, 2006).

Nesta célula, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional, pertencente ao circuito eletrônico do polarógrafo. O amplificador operacional atua quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua. Assim a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como, eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência (ALEIXO, 2006). Com este recurso o eletrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. Por isto, pode-se usar além do eletrodo de trabalho e do auxiliar, um eletrodo de referência de dimensões pequenas, o que facilita o uso de recipientes polarográficos de tamanho reduzido. De modo geral, a célula de três eletrodos apresenta as seguintes vantagens:

1. é mais adequada as soluções diluídas;

2. pode ser usada para soluções de altas resistências (solventes orgânicos, mistura de água mais solventes orgânicos) e
3. pode ser usada com eletrólitos de suporte diluídos (ALEIXO, 2006).

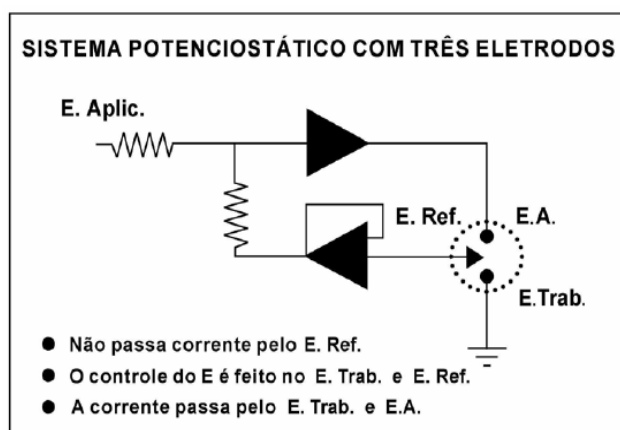


Figura 4. Célula polarográfica/voltamétrica de três eletrodos. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático (ALEIXO, 2006).

Os microeletrodos de mercúrio tem sido amplamente utilizados em voltametria por várias razões. Uma delas é a faixa de potencial negativo relativamente ampla já mencionada. Além disso, uma nova superfície metálica é formada rapidamente, simplesmente pela produção de uma nova gota. A habilidade de se obter rapidamente uma superfície nova é importante porque as correntes medidas em voltametria são bastante sensíveis à limpeza e à ausência de irregularidades. Uma vantagem adicional dos eletrodos de mercúrio é que muitos íons metálicos são reduzidos sensivelmente a amálgamas na superfície de um eletrodo de mercúrio o que simplifica a química do processo (SKOOG, 2002). O microeletrodo mais simples é um filme de mercúrio formado pela eletrodeposição do metal sobre um eletrodo cilíndrico. Os que estão disponíveis no comércio, consistem de um tubo capilar muito fino conectado a um reservatório de mercúrio. O metal é forçado para fora do capilar por um pistão

controlado por uma rosca micrométrica. Esse micrômetro permite a formação de gotas com áreas que são reprodutíveis em cinco por cento ou ainda melhor.

2.4. Técnicas Voltamétricas

Existem várias técnicas voltamétricas que são utilizadas, na tabela 2 abaixo, observam-se as principais técnicas e seus sinais de excitação. Três importantes técnicas em eletroquímica; a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial, que foram utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho são descritas a seguir.

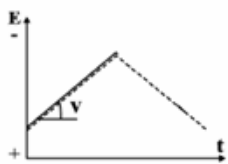
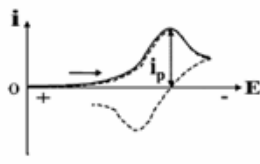
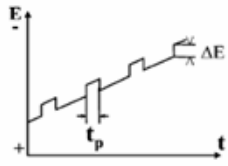
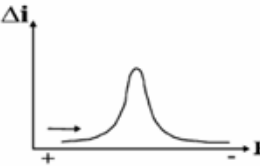
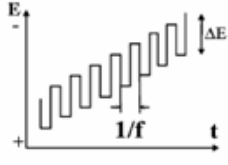
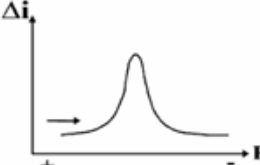
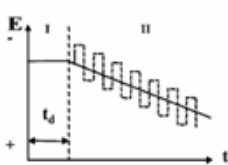
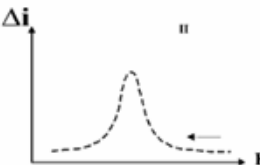
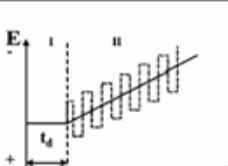
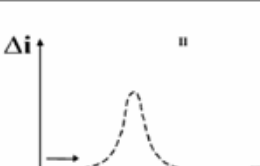
2.4.1. Polarografia ou Voltametria Clássica

A polarografia é uma subclasse da voltametria na qual o eletrodo de trabalho é o eletrodo de mercúrio gotejante (DME). Por causa de suas propriedades especiais particularmente em restaurar com facilidade a sua superfície e largo potencial catódico, a polarografia tem sido largamente utilizada na determinação de várias espécies (WANG, 2000).

Do ponto de vista analítico esta técnica é muito limitada para os dias atuais, pois não consegue determinar espécies com concentrações abaixo de 10^{-4} a 10^{-5} mol/L (ALEIXO, 2006). A atual análise de traços exige determinações de concentrações da ordem de até 10^{-12} mol/L ou mesmo menor. Portanto, a razão para o baixo limite de detecção da polarografia clássica é porque a corrente faradaica, isto é, a corrente

devido à reação no eletrodo da substância a ser determinada, fica da mesma ordem ou menor do que a corrente capacitiva, e quanto a sua concentração, atinge valores da ordem 10^{-4} a 10^{-5} mol/L, não sendo mais possível distingui-la da corrente de fundo (WANG, 2000).

Tabela 2. Técnicas usadas para determinação de traços e seus limites de detecção típicos. ΔE = amplitude de pulso; f = frequência; t_d = tempo de pré-concentração; i_p = corrente de pico; E_p = potencial de pico (adaptado de BUFFLE e WAEBER, 2005).

Técnica	Perturbação	Sinal	Conc.
Voltametria Linear			$10^{-2} - 10^{-6}$
Voltametria de Pulso Diferencial			$10^{-4} - 10^{-7}$
Voltametria de Onda Quadrada			$10^{-4} - 10^{-8}$
Voltametria de Redissolução Anódica			$10^{-6} - 10^{-11}$
Voltametria de Redissolução Adsorviva			$10^{-6} - 10^{-12}$

2.4.2. Voltametria de Pulso

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação da corrente faradaica da capacitiva viria a ser conquistada com o desenvolvimento de técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizadas em intervalos de tempo muito pequenos.

Esta técnica voltamétrica, foi introduzida por Barker e Jenkin. Tem como objetivo diminuir o limite de detecção das medidas voltamétricas, através do substancial aumento das taxas de razões entre a corrente faradaica e não faradaica, o que pode permitir uma quantificação a níveis abaixo de 10^{-8} mol/L (WANG, 2000).

2.4.2.1. Voltametria de Pulso Normal

Consiste na execução de uma série de pulsos de potencial aplicados ao eletrodo, cujo tempo de aplicação de pulso encontra-se pré-selecionado. Entre um pulso e outro, mantém um potencial constante (base) no qual as reações do analito não ocorrem (WANG, 2000). Neste potencial constante não ocorre nenhum processo faradaico e apenas uma corrente residual é observada (Figura 5). Esta corrente residual pode ser causada pela presença de oxigênio dissolvido, ou outras impurezas eletroativas que porventura estejam presentes em solução, e uma corrente capacitiva que no momento de aplicação de pulso de potencial é, praticamente, constante. O aumento do potencial do eletrodo causado por este pulso, oxida e/ou reduz o analito gerando uma corrente faradaica (SOUZA e colaboradores, 2003).

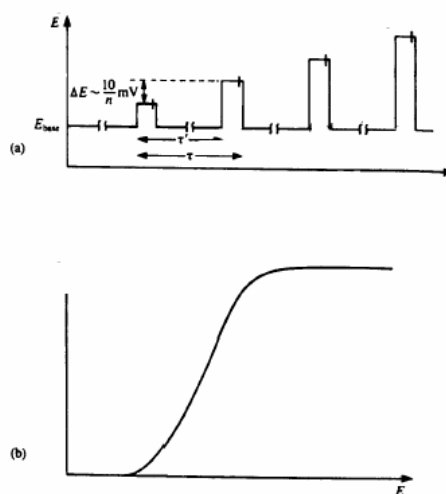


Figura 5. Voltametria de pulso normal. (a) Esquema de aplicação do pulso começando em E_{base} . A corrente medida no fim dos pulsos supondo que I para E base é zero. No DME o fim do pulso está sincronizado com a queda da gota; (b) perfil $I - E$ esquemático (BRETT, 2003).

2.4.2.2. Voltametria de Pulso Diferencial

Com o desenvolvimento instrumental, a voltametria de pulso diferencial, possibilitou medidas de correntes e aplicações de potencial e pulso de potencial em intervalos de tempo pequenos. Esta técnica de voltametria é semelhante à voltametria de pulso normal. Porém o potencial-base é aumentado entre os pulsos com aumentos sempre iguais, e a corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso.

Na voltametria de pulso diferencial a programação de potencial é feita aplicando-se um pulso de potencial superposto em uma rampa de potencial linearmente crescente em instrumentos analógicos (uma rampa DC) e cada etapa de aplicação de pulso é combinada a varredura de potencial utilizada. O pulso aplicado é de pequena amplitude (10 a 100 mV) e é imposto durante 50 a 60 ms. A corrente é amostrada em dois intervalos de tempo de cerca de 15 ms cada um; o primeiro intervalo imediatamente antes da aplicação do pulso (S_1) e o segundo no final do pulso (S_2) (Figura 6). O valor final da corrente é a diferença entre esses dois valores medidos (ALEIXO, 2006).

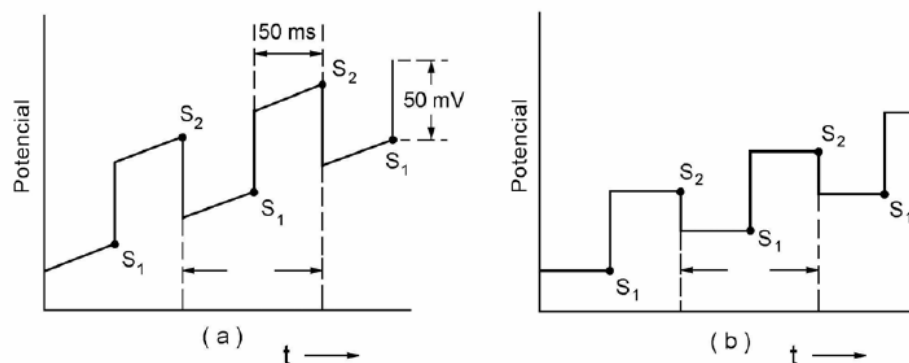


Figura 6. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial. (a) Em instrumentos analógicos; (b) Em instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença entre eles é que é registrada: $I = I_{S_2} - I_{S_1}$ (ALEIXO, 2006).

Uma vantagem do voltamograma tipo derivada é que máximos individuais podem ser observados para substâncias com potenciais de meia-onda que diferem entre si por valores pequenos como 0,04 a 0,05 V. Ao contrário das voltametrias clássica e de pulso normal, que requerem uma diferença de potencial de cerca de 0,2 V para resolução das ondas. Mais importante, entretanto, é que a voltametria de pulso diferencial aumenta a sensibilidade do método voltamétrico. Geralmente os limites de detecção com a voltametria de pulso diferencial são de duas ou três ordens de magnitude mais baixa do que a voltametria clássica e caem no intervalo de 10^{-7} a 10^{-8} mol/L (SKOOG, 2002). Com isso observa-se que esta técnica é extremamente usada para medidas de traços de espécies orgânicas e inorgânicas (WANG, 2000).

2.4.3. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de pulso diferencial ainda é a técnica mais usada presentemente para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detectabilidade e à resolução frente às técnicas de corrente contínua. Mas, ao lado dela, uma técnica muito conveniente do ponto de vista analítico tem sido incorporada em diversos instrumentos comerciais é a voltametria de onda quadrada (ALEIXO, 2006).

A voltametria de onda quadrada é umas das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (SOUZA e colaboradores, 2003). Apresenta uma larga amplitude das técnicas diferenciais na qual a forma da onda consiste de uma onda quadrada simétrica, superposta por uma base potencial em forma de escada, quando aplicadas no eletrodo de trabalho (Figura 7) (WANG, 2000). Os resultados das formas de pico dos voltamogramas são simétricos aos potenciais de meia-onda, e os picos de corrente são proporcionais as concentrações. A sua principal vantagem é a velocidade (SKOOG, 2002; WANG, 2000).

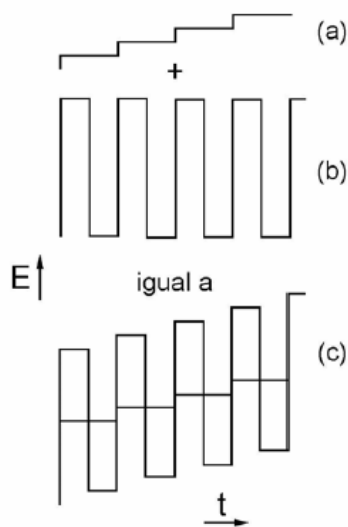


Figura 7. Seqüência potencial vs. tempo (E vs t) usada em voltametria de onda quadrada (ALEIXO, 2006).

2.4.4. Voltametria Cíclica

Das diversas técnicas eletroquímicas existentes, a voltametria cíclica é uma das mais utilizadas, pois, permite obter rapidamente uma quantidade extraordinária de informações sobre as reações de transferência eletrônica, investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e identificar espécies presentes em solução, com a obtenção de dados cinéticos e, por fim, auxilia na elucidação do mecanismo eletródico em questão (BRETT, 2003).

A voltametria cíclica é uma técnica de varredura reversa de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade, onde é obtido, como resposta a essa perturbação, um par de picos, catódico e anódico (Figura 8), para sistemas reversíveis (WANG, 2000).

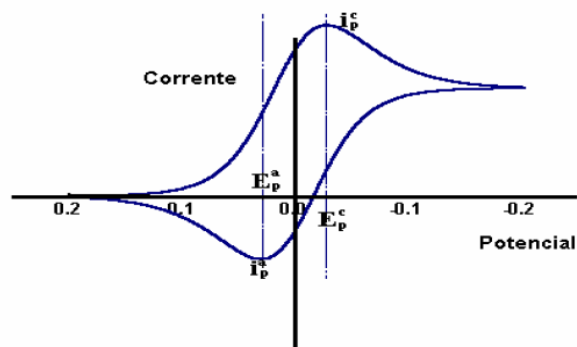


Figura 8. Voltamograma cíclico para um sistema reversível, com destaque para parâmetros mais importantes.

Os parâmetros mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódica e anódica (i_{pc} e i_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$). A análise da dependência do potencial e da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, é a base de testes de diagnósticos, que permitem obter informações importantes, como a reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a variação da presença de reações químicas acopladas, de adsorção e de fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico, ou seja, a difusão, migração ou convecção (COSTA, 2006a).

2.5. Os eletrodos Quimicamente modificados utilizados na voltametria

O desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação em concentrações em nível de traços é de grande relevância para a química analítica. Com o advento das técnicas eletroanalítica, os sensores eletroquímicos ganharam um importante espaço nas diversas áreas de pesquisa (JANEGITZ e colaboradores, 2007).

Os eletrodos de trabalho são eletrodos no qual ocorrem reações de interesse. Geralmente em voltametria são caracterizados por apresentarem uma pequena área superficial que permite a polarização. Sua escolha é muito importante, pois, deve garantir a sensibilidade e reprodutibilidade necessárias em uma análise voltamétrica (EL-MAALI, 2004). Até a metade da década de 70, os eletrodos utilizados na química analítica, bem como em outras áreas, eram eletrodos convencionais como ouro, platina, mercúrio e carbono, porém esses eletrodos apresentam alguns problemas que limitavam as suas ações. As principais desvantagens eram fenômenos de adsorção do analito na superfície do eletrodo; baixas velocidades de algumas reações eletroquímicas; e o alto custo desses materiais nobres para aplicação prática em larga escala. Verificou-se, posteriormente que essas desvantagens poderiam ser controladas, favorecendo assim o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados para várias aplicações (SUAREZ, 2005).

A produção de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínica e ambiental, que tem levado a crescente busca por sensores de melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade. Apesar da grande versatilidade e perspectiva apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a sua passivação gradual da superfície, que é consequência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de redox utilizada na detecção (FREIRE e

colaboradores, 2003). Os que se baseiam em propriedades eletroquímicas são os mais conhecidos, podendo ser classificados em condutométricos, impedimétricos, potenciométricos, voltamétricos e amperométricos. A análise potenciométrica permite a determinação de atividades ou concentração do analito, sendo que a especificidade é inerente ao material do eletrodo. Já os amperométricos (ou voltamétricos), além dos citados acima, também é possível a obtenção de parâmetros cinéticos e termodinâmicos dos processos envolvidos (QUINTINO, 2003).

Uma área que oferece grande potencial para minimizar os problemas descritos, e conseqüentemente para aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos, é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados (FREIRE e colaboradores, 2003; DO CARMO e colaboradores, 2004). O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (EM) tem sido de crescente interesse nas áreas de ciências e tecnologia, com utilização em diversos campos, tais como: eletrocatalise, síntese orgânica, conversão de energia solar, cinética de transferência de elétrons, permeação de membranas e sensores químicos (QUINTINO, 2003; TANAKA e colaboradores, 2003; DO CARMO e colaboradores, 2004). A denominação de eletrodos quimicamente modificados foi sugerida por Murray na década de 70 para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas devidamente imobilizadas na superfície desse eletrodo (SUAREZ, 2005; JANEGITZ e colaboradores, 2007). Mas de acordo com alguns dados, o termo foi inicialmente utilizado na eletroquímica por Moses em 1975 (JUNIOR, 2007). A modificação do eletrodo normalmente confere a este as características físico-químicas: reatividade, seletividade, (DO CARMO e colaboradores, 2004; JANEGITZ e colaboradores, 2007), estabilidade química, excelente condutividade elétrica e resistência mecânica (TURDEAN e colaboradores, 2006); apresenta como uma das suas principais vantagens é a capacidade de catalisar a oxidação de algumas espécies que exibem elevado potencial em eletrodos não modificados (NAKASHIMA e colaboradores, 2000; DO CARMO e

colaboradores, 2004), possibilitando assim o desenvolvimento de dispositivos com respostas adequadas para vários propósitos e aplicações.

A modificação da superfície de um sensor base pode ser conduzida com vistas a diferentes propostas de aplicações:

(i) alterar as propriedades de transporte para a superfície do eletrodo (barreira para excluir interferentes);

(ii) forçar reações na superfície do eletrodo (por exemplo, reações de pré-concentração, empregando propriedades de ligantes e reações enzimáticas);

(iii) melhorar a transferência de elétrons, por exemplo, por eletrocatalise (QUINTINO, 2003).

A escolha do material como eletrodo base, cuja superfície será modificada, é um aspecto muito importante na preparação de um eletrodo modificado. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de modificação escolhido. Entre os materiais convencionais destacam-se o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono (JUNIOR, 2007).

A introdução da pasta de carbono e suas aplicações estão relacionadas com o grupo de Adms 1958 (JUNIOR, 2007), que estudou algumas características básicas e algumas aplicações para os eletrodos de pasta de carbono na tentativa de preparar um eletrodo gotejante de pó de grafite e tribromometano (JUNIOR, 2007). No final da década de 70 surgiram vários trabalhos empregando eletrodos modificados (JANEGITZ e colaboradores, 2007). Os eletrodos de carbono apresentam uma capacidade

particular de quimissorver reagentes que possuem sistemas de elétrons π estendidos, como por exemplo, compostos orgânicos aromáticos. Esta adsorção é devida à forte interação entre o plano basal do eletrodo de carbono e o sistema de elétrons π da molécula aromática (QUINTINO, 2003). Como exemplo, KUWANA e FRENCH, apud JUNIOR 2007, investigaram o comportamento eletroquímico de alguns compostos orgânicos, do tipo: ferroceno, antraquinona, 5-aminobenzofenona utilizando o próprio composto como aglutinante na preparação da pasta (JUNIOR, 2007).

O eletrodo de pasta de carbono (EPC) é uma mistura de pó de grafite e aglutinante em proporções pré-definidas. No caso de um eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM), um modificador específico é incorporado à pasta. Como características desejáveis o pó de grafite deve ter alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas contidas na solução, além de apresentar uma boa distribuição granulométrica uniforme (JUNIOR, 2007). Quanto ao aglutinante, esse deve preencher os interstícios entre as partículas de grafite, deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível em água (ou outros solventes), possuir baixa volatilidade e não conter impurezas (JANEGITZ e colaboradores, 2007; JUNIOR, 2007) sendo um dos mais utilizados o óleo mineral.

Uma das mais importantes vantagens do eletrodo de pasta de carbono sobre todos os outros eletrodos sólidos está no preparo de forma simples e rápida e na possibilidade de renovação da superfície a cada medida, se necessário. Isso é extremamente importante na análise de compostos onde os produtos da reação são adsorvidos na superfície do eletrodo, diminuindo o seu tempo de vida. Outra importante propriedade é a baixa corrente residual, que é menor que nos eletrodos de grafite pirolítico e carbono vítreo (SUAREZ, 2005; JUNIOR, 2007).

MATUSZEWSKI e TROJANOWICZ, apud, JUNIOR 2007, desenvolveram o primeiro biossensor de pasta de carbono, para determinação de glicose, o qual foi obtido pela incorporação direta da enzima glicose oxidase (GOD) na pasta de carbono contendo pó de grafite e óleo de silicone. No mesmo ano, WANG e LIN, apud, JUNIOR 2007, desenvolveram um eletrodo utilizando tecido vegetal como fonte enzimática. Diversos outros biossensores de pasta de carbono utilizando enzimas purificadas, tecidos vegetais, proteínas e células foram e continuam sendo desenvolvidos.

2.5.1. Eletrodos de pasta de carbono modificados com materiais biológicos

A exploração de materiais biológicos tem se constituído em um fator positivo para o desenvolvimento da química analítica, promovendo avanços significativos sob os pontos de vista teórico, metodológico e aplicativo nos mais diferentes campos. O conhecimento da estrutura biológica e o bom entendimento dos processos de transferência de elétrons, e algumas de suas propriedades têm mostrado a importância em processos biológicos e tecnológicos de enzimas e proteínas. Pois, são bons sítios ativos de sistemas redox, capazes de realizar reações muito seletivas. É essencial o entendimento das reações redox, devido as suas mediações em fenômenos fundamentais, não somente celulares, mas também de interesse biotecnológico na produção de biossensores (FREIRE e colaboradores, 2003).

Um biossensor é usualmente definido como um aparelho sensível, que consiste em um elemento biológico, quando em contato íntimo com uma espécie emite um sinal,

proveniente de um processo biológico ou biocatalítico, sendo este sinal em seguida quantificado (FREIRE e colaboradores, 2003).

Em relação à eletroanalítica, nos últimos anos tem sido dada uma grande ênfase aos biossensores, utilizando-se componentes biológicos, tais como enzimas e anticorpos, estes dispositivos têm demonstrado alta seletividade, sensibilidade e baixo custo, podendo ser empregados em métodos analíticos específicos para a determinação de compostos alvos (FREIRE e colaboradores, 2003). As enzimas são comumente usadas como biossensores em técnicas como potenciometria e amperometria.

Várias enzimas têm sido utilizadas em biossensores para a determinação de analitos de interesse clínico, industrial e ambiental (FREIRE e colaboradores, 2003). O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo aos biossensores pode ser realizada através de diferentes mecanismos: 1 – pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (primeira geração); 2 – pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (segunda geração) e 3 – finalmente pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração) (FREIRE e colaboradores, 2003).

Com base no exposto existe um grande esforço para a produção de biossensores a partir de metaloenzima, que são estruturas hábeis em reproduzir e mimetizar diferentes reações mediadas por enzimas, principalmente reações de oxidação e de hidroxilação (COSTA, 2006a). A importância destes compostos estende-se ainda a outros mecanismos e estruturas, como por exemplo, na estabilidade conformacional de biomoléculas, além de proporcionarem centros de reatividade extremamente versáteis em enzimas.

Metaloenzimas e metalocoenzimas estão envolvidas em grande parte da atividade enzimática, que depende da presença de íons metálicos no sítio ativo da enzima ou na “chave” da coenzima. Da última podemos citar a vitamina B12, que contém cobalto. Já importantes metaloenzimas incluem a carboxipeptidase (Zn), álcool desidrogenase (Zn), superóxido-dismutase (Cu, Zn) e o citocromo P450 (Fe) (COSTA, 2006a). Com isso pode-se observar parte da química de transferência de elétrons, depende de forma crítica de um agente metálico que será o responsável por processos de transferência de elétrons.

2.5.2. Eletrodos de pasta de carbono modificados a base de hemina

Uma grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento de metodologias e técnicas, que procuram determinar esses produtos bem como promover a sua decomposição. Neste sentido muitos estudos analíticos são baseados em eletroanálise utilizando eletrodos a base de hemina (Figura 9), devido sua notável sensibilidade, precisão e simplicidade (NAKASHIMA e colaboradores, 2000; NAN e colaboradores, 2002).

As metaloporfirinas constituem uma classe de compostos macrocíclicos encontrados na natureza e que apresentam um papel importante no metabolismo de organismos vivos (QUINTINO, 2003). Elas têm encontrado diversas aplicações em eletroanálise, sendo que muitas metaloporfirinas tem sido empregadas como

componentes eletroativos na construção de biossensores eletroquímicos (QUINTINO, 2003).

A hemina, protoporfirina IX de ferro III (Figura 9), é uma conhecida metaloporfirina (NAKASHIMA e colaboradores, 2000; NAN e colaboradores, 2002; FREIRE e colaboradores, 2003; TURDEAN e colaboradores, 2006) constituinte do grupo prostético de algumas proteínas como citocromo, mioglobina e hemoglobina (NAKASHIMA e colaboradores, 2000; QUINTINO, 2003; TURDEAN e colaboradores, 2006). As metaloporfirinas são moléculas formadas essencialmente por um anel porfirínico tetradentado e por um metal que se encontra coordenado no centro do sistema (COSTA, 2006a). Medidas quantitativas e evidências qualitativas mostram que as metaloporfirinas são estáveis apresentando um alto grau de estabilidade termodinâmica. Esse fato se deve à presença do ligante tetradentado e à alta aromaticidade do anel porfirínico (COSTA, 2006a).

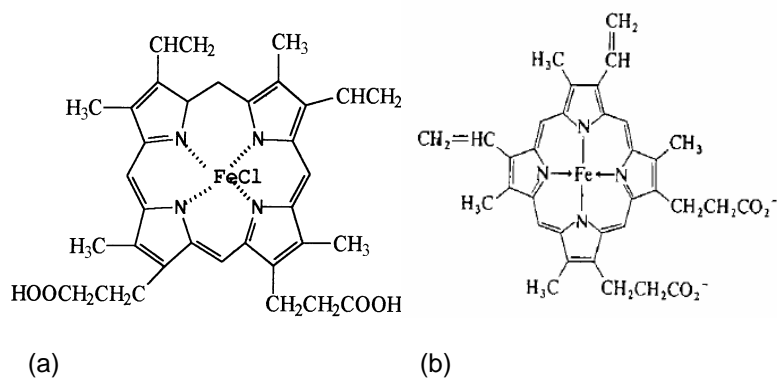


Figura 9. Estruturas químicas a) Protoporfirina IX de ferro III (Nan e colaboradores, 2000). b) estrutura do grupo heme da hemoglobina (COSTA (a), 2006).

De acordo com TANAKA e colaboradores (2003), com a realização de estudo sobre as propriedades eletrocatalíticas dos eletrodos de carbono modificados com metaloftalocianinas e metaloporfirinas para a reação de redução de oxigênio em soluções aquosas, foi possível observar que o metal de transição atua como o centro

ativo e que a atividade eletrocatalítica depende principalmente das propriedades redox do eletrodo modificado, que muitas vezes não se apresenta explicitamente definida. Além disso, dentre os diferentes metais que a princípio podem ser incorporados a centros metálicos, cobalto e ferro têm se destacado como os mais promissores para a utilização nestes fins (TANAKA e colaboradores 2003).

Os estudos dos processos de transferência de elétrons nestes eletrodos são convenientes, pois, fornecem conhecimentos sobre a cinética e a termodinâmica de vários processos (TURDEAN e colaboradores, 2006). Com isso a hemina é bastante importante por permitir o entendimento de alguns mecanismos como:

i) o modelo molecular de atividade redox de heme-proteínas e o carreamento de oxigênio por meio destas (TURDEAN e colaboradores, 2006);

ii) mimetização de compostos (COSTA, 2006a; TURDEAN e colaboradores 2006);

iii) utilização das espécies biológicas nativas imobilizadas para a determinação amperométrica de algumas espécies, como por exemplo: triptofano (NAN e colaboradores, 2000), haletos orgânicos (NAKASHIMA e colaboradores, 2000), superóxidos (CHEN e colaboradores, 2000), monóxido de mononitrogênio e nitritos (NO/NO_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TURDEAN e colaboradores, 2006).

Estudos da atividade eletrocatalítica de EPCM com macromoléculas, particularmente de metaloporfirinas. Demonstram que estes compostos pertencem a uma classe que fornece oportunidades singulares para se examinar em detalhes os fatores envolvidos na ativação e posterior redução da molécula de oxigênio. Tais

fatores favorecem os efeitos associados com substituições nas posições axiais e periféricas do anel macrocíclico, a natureza do centro metálico e o grau de conjugação do anel (TANAKA e colaboradores, 2003).

Alguns dos biossensores utilizados com a intenção de monitoramentos de drogas estão baseados no citocromo P450. O citocromo P450 são enzimas de origem microsomas, mitocôndrias ou ainda em micróbios (IWUOHA e colaboradores, 1998). Pertencendo a larga família das heme enzimas (BISTOLAS e colaboradores, 2005). Cujas atividades catalíticas resultam da mono oxigenação ou redução de um largo grupo de substâncias (SHUMYANTSEVA e colaboradores, 2007), ou ainda reações de epoxidação, hidroxilação e oxidação de heteroátomos (BISTOLAS e colaboradores, 2005).

A habilidade catalítica dos CYP tem atraído o interesse da engenharia de enzimas desde 1970 (BISTOLAS e colaboradores, 2005). As microsomas P450 catalisam e convertem as drogas e outros xenobióticos como: medicamentos, suplementos alimentares, colesterol, esteróides, ácidos graxos, etc (JOSEPH e colaboradores, 2003; BISTOLAS e colaboradores, 2005; SHUMYANTSEVA e colaboradores, 2007), para metabólitos que são mais solúveis em água e facilmente excretados do que seus compostos de origem. Neste sentido existe uma grande necessidade de desenvolver ferramentas analíticas de fácil uso e capazes de identificar substâncias e poder realizar as suas quantificações. E por isso, que o uso destes dispositivos pode ser visto como uma boa alternativa, por que são geralmente pequenos, capazes de realizar medidas continuamente, rápidas e a baixo custo, quando comparados com técnicas convencionais (IWUOHA e colaboradores, 1998).

O CYP P450 é a designação de uma família de enzimas com sítios ativos de porfirina de ferro que catalisam a adição de oxigênio em um substrato de hidrocarboneto. As reações de hidroxilação do substrato pela CYP monoxigenase funciona de acordo com a seguinte equação geral:

$$\text{RH} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} \quad (3) \text{ (FREIRE e colaboradores, 2003; Bistolas e colaboradores, 2005).}$$

Com isso, eletrodos modificados têm sido desenvolvidos para a determinação de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos, fenóis e aminas aromáticas. Estas moléculas são substratos, ativadores ou inibidores de reações catalisadas por enzimas oxidorrredutases. E sendo assim o entendimento das condições de operação, e de composição do eletrodo é essencial para o monitoramento de analitos em amostras que representam interesse (FREIRE e colaboradores, 2003).

2.6. Espectrofotometria Ultravioleta – Visível

Além das técnicas eletroanalíticas, outra técnica bastante empregada na análise de fármacos e freqüentemente citada nas farmacopéias é a espectrofotometria. A sua instrumentação comum, os procedimentos simples, a rapidez, a precisão e a exatidão da técnica, fazem com que ela permaneça como uma técnica bastante atrativa. Alguns métodos espectrofotométricos de análise são mais econômicos e simples, quando comparados com algumas técnicas de cromatografia e de eletroforese. É uma importante ferramenta para análises quantitativas, caracterização e controle de qualidade na agricultura, farmacêutica e no campo biomédico (OJEDA e ROJAS, 2009).

A luz branca consiste de radiações eletromagnéticas para as quais a visão é sensível, a luz branca é composta por todos os comprimentos de onda do espectro visível que abrange um intervalo de 400 – 760 nm. Comprimentos de onda diferentes provocam cores diferentes. A percepção visual das cores é provocada pela absorção seletiva por um objeto, que absorve certos comprimentos de onda da luz incidente. Outros comprimentos de onda ou são refletidos ou transmitidos, de acordo com a natureza do objeto, e são percebidos pela vista humana como a cor do objeto. A Tabela 3 apresenta os comprimentos de onda aproximados para as cores no espectro na região do visível.

Tabela 3. Comprimento de onda aproximado das cores.

Cores	Comprimento de onda (nm)
Violeta	400 – 450
Azul	450 – 500
Verde	500 – 570
Amarelo	570 – 590
Alaranjado	590 – 620
Vermelho	620 – 760
Infravermelho	□ 760

A variação da intensidade da cor de um sistema com a modificação da concentração de um certo componente constitui a base da análise espectrofotométrica.

A cor é provocada pela formação de um cromóforo, resultante da adição de um reagente apropriado ou pode ser propriedade intrínseca do analito. A intensidade da cor pode ser comparada com a que se obtém pelo tratamento idêntico de uma quantidade conhecida de substância (SKOOG, 2002).

A equação fundamental que rege a espectrofotometria é a Lei de Beer – Lambert. Lambert – Beer estudaram o efeito da concentração do cromóforo numa solução, sobre a transmissão ou absorção da luz e descobriram que a intensidade de um feixe de luz monocromática diminui exponencialmente com a concentração da substância que absorva a luz. Ou seja:

$$A = \log I_0 / I_t = \epsilon b c \quad (4) \text{ (SKOOG, 2002)}$$

Onde A é a absorbância, I_0 é a luz incidente, I_t é a luz transmitida, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar (L/mol.cm), b, o caminho óptico (cm) e c é a concentração do cromóforo (mol/L). Como o coeficiente de absorvidade molar é um valor intrínseco da substância e, portanto constante, dependendo do tipo de sistema, o mesmo ocorrendo com o caminho óptico, a absorbância medida deve ser proporcional à concentração de uma espécie de interesse, obtendo-se assim uma dependência linear entre as duas variáveis, onde o coeficiente angular da reta é o produto ϵb .

O instrumento usado para medir a quantidade de luz absorvida em cada comprimento de onda, nas regiões do visível e do ultravioleta, é denominado espectrofotômetro (Figura 10).

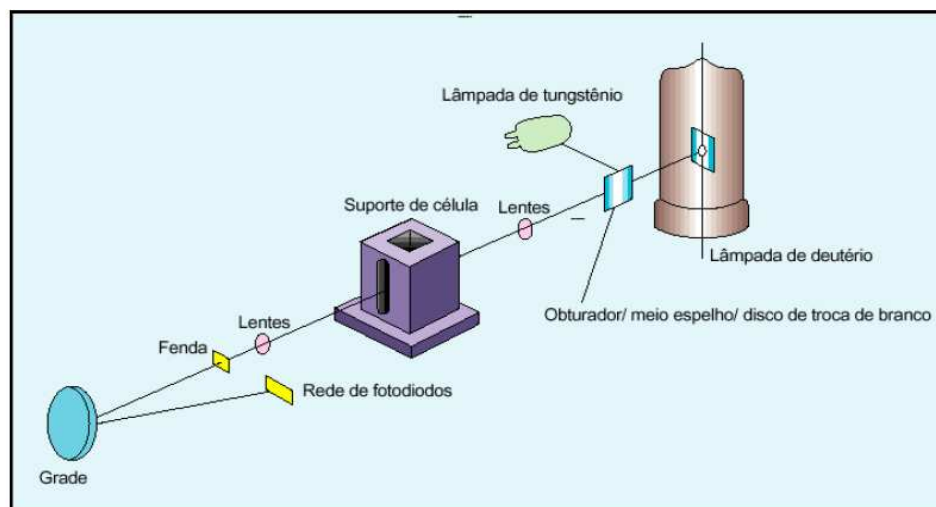


Figura 10. Esquema de um espectrofotômetro de UV – VIS de arranjos de diodos (COSTA, 2006b).

Na maioria desses instrumentos o feixe de luz é um feixe único que passa pela amostra através de um arranjo de diodos, e no outro tipo o feixe é duplo, em que uma das metades do feixe (o feixe da amostra) passa através de uma célula transparente que contém solução do analito, e a outra metade (o feixe de referência) passa através de outra célula idêntica à primeira, no entanto contendo o solvente da solução sem o composto, o denominado comumente de branco (COSTA, 2006b).

Justificativa

3.0. JUSTIFICATIVA

A indústria farmacêutica mundial vem se mostrando ao longo dos anos um dos ramos industriais de vertiginosa ascensão. O crescimento da produção de medicamentos se deve ao conjunto de vários fatores, desde o aumento do consumo, passando por fomentos em pesquisas, e chegando até investimentos públicos que procuram garantir a distribuição de medicamentos de uso contínuo para as parcelas mais carentes da população.

O Brasil não obstante desse cenário mundial, vem ao longo dos anos, incrementando um conjunto de ações em saúde pública, que visam garantir uma melhor qualidade de vida a sua população. Ações essas que podemos citar; desde a criação do sistema único de saúde, chegando à promulgação de leis que facilitam o processamento e a logística dos medicamentos aqui comercializados, como exemplo, a liberação dos medicamentos genéricos.

Em um cenário mundial tão propício, conforme esperado, ocorreu um aumento não só no número de novas drogas lançadas no mercado, bem como, quer se queira ou não, aumento expressivo no seu consumo por parte da população. Valendo ressaltar, que os brasileiros estão entres os povos que mais consomem remédios no mundo.

Diante dessas colocações não se pode deixar de pensar na qualidade desses produtos lançados no mercado consumidor. Sendo assim, o trabalho do químico se

apresenta como imprescindível nos estudos do controle de qualidade dos produtos farmacêuticos. Neste caminho, a química analítica se apresenta como um braço forte para a garantia da qualidade dos remédios comercializados, com estudos que passam desde as análises das matérias-primas, as linhas de produção até as análises de conformidades do produto acabado.

Com suas técnicas cada vez mais avançadas, mas diante de tantas drogas comercializadas se faz necessário o desenvolvimento de metodologias específicas para as determinações desses fármacos. Diversos desses métodos têm sido utilizados por vários grupos de pesquisa em todo mundo, sejam eles: cromatográficos, espectrofotométricos, eletroforéticos e eletroquímicos. Quanto aos eletroquímicos vem ao longo do tempo ganhando uma enorme propulsão por conta de algumas vantagens perante aos outros métodos.

Neste contexto pretende-se, neste trabalho, desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação de cetoconazol em formulações farmacêuticas, através do emprego de um eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina. . Para a confirmação da aplicabilidade da técnica o eletrodo será utilizado na determinação do princípio ativo presentes em comprimidos.

Objetivos

4.0. OBJETIVOS

Em razão da escassez de trabalhos na literatura que abordem determinações eletroquímicas de cetoconazol este trabalho tem por objetivo geral introduzir a utilização do eletrodo de pasta de grafite modificado com hemina como uma alternativa para o estudo mecanístico e analítico deste composto. Tendo abaixo relacionadas, as etapas experimentais, que foram estudadas nesta dissertação como os objetivos específicos.

1 - Estudar o comportamento voltamétrico do cetoconazol frente ao eletrodo de pasta de carbono modificado.

2 – Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação de cetoconazol através da escolha da técnica voltamétrica e otimização dos seus parâmetros experimentais.

3 – Aplicar a metodologia eletroanalítica desenvolvida na validação do método pela comparação e análise com os dados obtidos pela espectrofotometria de UV- VIS.

4 – Aplicação do método de análise de formulações farmacêuticas contendo cetoconazol.

Metodologia

5.0. METODOLOGIA

5.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (P.A.) e foram utilizados sem prévia purificação. Na Tabela 4 são apresentadas as suas procedências.

Tabela 4. Procedência e Pureza dos reagentes

Reagente	Procedência
Carvão ativado em pó	Synth
Óleo Mineral	Schering – Plough
Ácido L – ascórbico	Synth
Hidróxido de sódio	Quimex
Etanol	Merck
Cetoconazol	Janssen – Cilag
Nizoral	Janssen – Cilag
Cetoconazol genérico	Medley
Hemina	Porphyrin Products

Ácido clorídrico	Quimex
Miconazol	Neo Química
Hidroclotiazida	Laboratório Farmacêutico do estado de Pernambuco (LAFEPE)
Ciprofloxacina	União Química
Ácido acético	Synth
Ácido Fosfórico	Vetec
Ácido Bórico	Quimex
Dipirona	Janssen – Cilag

5.1.1. Solução Estoque do padrão de cetoconazol

As soluções estoques de cetoconazol (10^{-4} mol/L) foram preparadas pela dissolução do fármaco em uma solução contendo 5% de ácido clorídrico e 5% de etanol.

5.1.2. Preparo das Soluções utilizadas como amostra

Amostras comerciais *contendo* cetoconazol foram adquiridas no comércio local (200 mg por comprimido) e foram analisadas neste experimento: Genérico – Medley e Nizoral – Janssen Cilag. As soluções das amostras na concentração de 10^{-4} mol/L foram preparadas pela dissolução do medicamento em uma solução contendo 5% de ácido clorídrico e 5% de etanol.

5.1.3. Solução tampão

A solução tampão Britton Robinson (BR) 0,1 mol/L foi preparada a partir dos ácidos acético (0,04 mol/L), fosfórico (0,04 mol/L) e bórico (0,04 mol/L). E o pH desejado no experimento foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 2,0 mol/L.

5.2. Equipamentos

5.2.1. Medidas voltamétricas

Para as medidas de voltametria empregou-se um potenciostato/galvanostato da AutoLab PGSTAT30 (EcoChemie) gerenciado pelo software GPES 4.9 (Figura 11).

O sistema eletroquímico empregado foi constituído de três eletrodos: o eletrodo auxiliar de carbono vítreo, o eletrodo de referência de Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificada com hemina (Figura 12).



Figura 11. Potenciostato Autolab utilizado na realização dos experimentos.

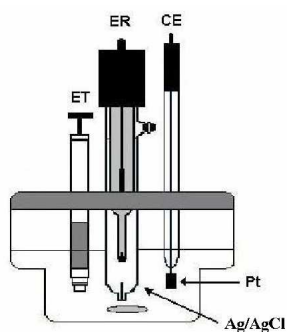


Figura 12. Representação de célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas: (CE) eletrodo auxiliar, (ET) eletrodo de trabalho (EPCM), (ER) eletrodo de referência.

5.2.2. pHmetro

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando um pHmetro do tipo Analion PM 608.

5.2.3. Medidas Espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas UV – VIS foram realizadas com o auxílio de um aparelho da Biochrom Libra S12 num comprimento de onda de 209nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm.

5.2.4. Balança Analítica

Todas as medidas de massa foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Denver Instrument DPX – 200 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

5.3. Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina

Na preparação da pasta de carbono foi empregada uma proporção de 3:1 p/p de grafite e óleo mineral. A pasta foi inicialmente pré-aquecida à 100°C por 12 horas, após resfriamento.

Os eletrodos de pasta de carbono modificados com hemina foram preparados pela mistura mecânica do aglutinante com grafite em pó e a hemina (10% a 60% na

massa) em um almofariz, por 20 min. A pasta de carbono modificada com hemina foi inserida em uma das extremidades de um tubo plástico ($\varnothing = 0.1 \text{ cm}$) e então compactada com uma haste de platina formando o contato elétrico. A superfície do eletrodo foi uniformizada pelo polimento em papel de filtro (Figura 13).

Para a determinação eletroanalítica empregaram-se as técnicas de voltametria de pulso diferencial, cíclica e onda quadrada, nas quais foram avaliados os parâmetros relativos às técnicas empregadas: como amplitude e velocidade de varredura de potencial, o efeito do pH do meio e da concentração do analito.

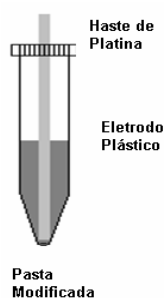


Figura 13. Esquema dos eletrodos de pasta de carbono e eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina.

5.4. Procedimento

Nas determinações por voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, alíquotas de 5,0 mL de solução tampão BR foram adicionadas à célula eletroquímica contendo um sistema com três eletrodos, sendo aplicado um fluxo de nitrogênio por um intervalo de 10 minutos para a remoção de oxigênio molecular. Em seguida, foram realizadas adições de alíquotas da solução

estoque do padrão, bem como das amostras analisadas. Por fim, vários voltamogramas foram realizados para a promoção de diversos estudos de variáveis como: velocidade de varredura, frequência, amplitude de pulso e pH.

Posteriormente foram realizados estudos da dependência da corrente de pico catódico com relação à concentração do analito. A dependência da corrente de pico catódico em função da concentração do cetoconazol foi investigada no intervalo de $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L até $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Os diferentes valores de corrente foram obtidos.

Resultados e Discussão

6.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroquímica moderna tem sido empregada como uma ferramenta poderosa para estudar processos tecnológicos em uma variedade de campos de pesquisa, incluindo biotecnologia, eletrônica e ciência dos materiais. Dos muitos métodos eletroquímicos disponíveis, a voltametria, nas suas diversas formas, é talvez a técnica mais versátil e efetiva para estudar sistemas redox, além de ser bastante útil em eletroanálise (QUINTINO, 2003). A intensa utilização de técnicas voltamétricas na análise de compostos orgânicos, inorgânicos, compostos com aplicações farmacológicas e de moléculas de interesse biológico está intimamente ligada ao desenvolvimento de métodos mais sensíveis, que possibilitam determinações em níveis de ultra-traços (SOUZA e colaboradores, 2004).

É nesta direção que as técnicas eletroquímicas são de bastante importância, pois, estas podem fornecer informações sobre a concentração do analito na amostra, bem como fornecer dados relevantes sobre mecanismos cinéticos dessas drogas. Sem contar que são técnicas que apresentam baixo custo, pois consomem pequenas quantidades de reagentes, relativamente rápidas e ainda permitem monitoramentos em tempos reais em amostras de campo para analitos específicos.

6.1. Estudo da composição da pasta de carbono modificada com hemina

Inicialmente foi realizada a análise comparativa entre o sinal voltamétrico emitido pelo eletrodo de pasta de carbono (EPC) e o eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM) com 50% de hemina. De acordo com a Figura 14, é possível observar que o EPCM, apresentou um pico catódico bem definido em torno de $-1,44\text{V}$ referente à redução do fármaco em estudo com eletrodo de pasta de modificado com hemina

(curva d), enquanto que o EPC, nas mesmas condições não apresentou nenhum sinal de redução do cetoconazol (curva b).

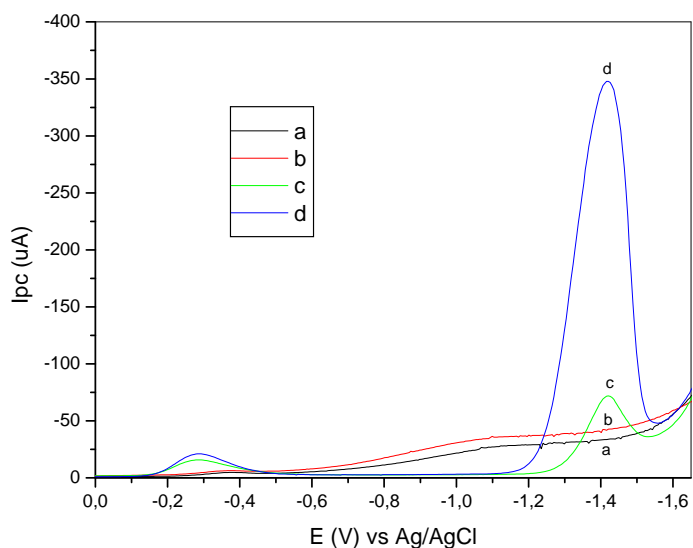


Figura 14. Estudo comparativo do sinal analítico obtido por VOQ em uma de solução de CTZ $4,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, em tampão BR (pH 2,0), a) branco com EPC; b) solução de CTZ com EPC; c) branco com EPCM e d) solução de CTZ com EPCM. Condições $v = 200\text{mV/s}$, $f = 40\text{ Hz}$, $\Delta E = 50\text{ mV}$.

Dando continuidade, estudou-se a composição da pasta de carbono variando a percentagem de carbono e de hemina na mistura produzida entre 10 a 60% de hemina na pasta, em uma solução de tampão BR pH 2,0, dados da Figura 15.

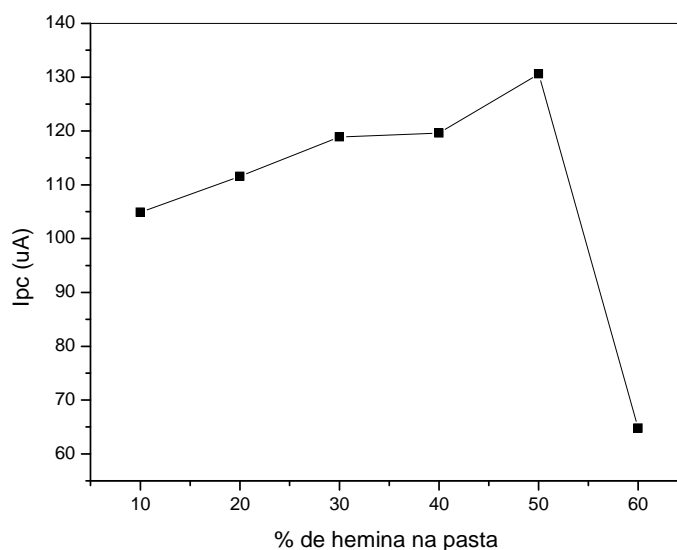


Figura 15. Perfil do sinal analítico para o estudo da variação da % em massa de hemina e pasta de carbono, com solução de [CTZ] = $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $\Delta E = 50$ mV, $v = 40$ mV/s e pH = 2.

De acordo com a figura 15, o aumento da concentração da hemina na pasta levou a um aumento na corrente de pico catódica obtida até uma composição de 50%. Para concentrações superiores observa-se um decréscimo acentuado na corrente catódica, uma vez que a menor percentagem de pó de grafite compromete a transferência eletrônica devido à baixa concentração do material condutor presente, devendo promover um aumento da resistência da pasta de carbono, diminuindo dessa forma a magnitude de corrente (SUAREZ, 2005; JANEGITZ e colaboradores, 2007). Pela análise da Figura 15, a composição de 50% de hemina e 50% de pasta de carbono foi a selecionada por proporcionar melhor perfil voltamétrico e maior sinal analítico para o cetoconazol.

6.2. Estudo do comportamento voltamétrico do cetoconazol por voltametria de pulso diferencial e otimização de parâmetros experimentais

A voltametria de pulso diferencial apresenta-se com uma técnica de pulso das mais importantes, onde a corrente é medida antes e depois da aplicação de pulso potencial. A altura correspondente à corrente de pico é proporcional à concentração da espécie oxidada/reduzida. A voltametria de pulso diferencial fornece picos bem definidos e apresenta sensibilidade significativamente maior que os métodos voltamétricos clássicos, com limite de detecção que chegam a ordem de 10^{-6} a 10^{-8} mol/L (ROSA e colaboradores, 2003).

Foi estudada a influência da amplitude (10 a 100 mV) na resolução do sinal analítico correspondente às correntes de picos catódicas do cetoconazol com eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina. A Figura 16, apresenta as sobreposições dos voltamogramas de pulso diferenciais. E de acordo com a avaliação dos dados apresentados graficamente observa-se que a amplitude ($\Delta E = 50$ mV) apresenta o melhor sinal analítico para o supracitado estudo.

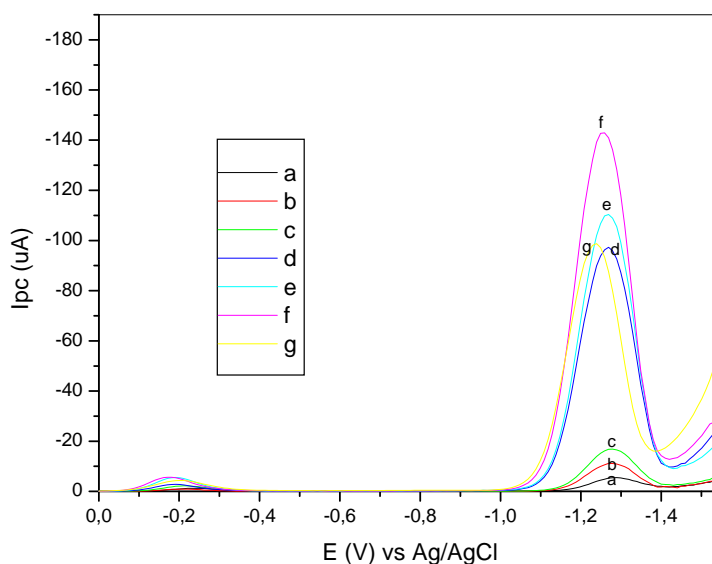


Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial para a redução do CTZ $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina em tampão (BR) pH 2,0; $v = 40$ mV/s para o estudo da variação da amplitude (em mV): a) branco; b) 10; c) 20; d) 30; e) 40; f) 50 e g) 100

A variação da velocidade (Figura 17) também é um dos fatores importantes a ser avaliado com a aplicação de métodos voltamétricos. O referido trabalho realizou o estudo da variação da velocidade por voltametria de pulso diferencial entre 5 - 150 mV/s e obteve a velocidade de 40 mV/s como a que apresenta o maior sinal analítico, bem como a melhor definição desse sinal.

Com o estudo dos diferentes parâmetros que foram analisados com a intenção de estabelecer as melhores condições para o estudo obteve-se os seguintes resultados que são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros estudados e seus valores otimizados para voltametria de pulso diferencial

Parâmetros estudados	Variação	Valor otimizado
pH	2,0 – 5,0	2,0
Velocidade de varredura (mV/s)	5,0 – 150	40
Concentração (mol/L)	$2,0 \cdot 10^{-6}$ – $5,5 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$ – $5,5 \cdot 10^{-6}$
Amplitude (mV)	10 – 100	50

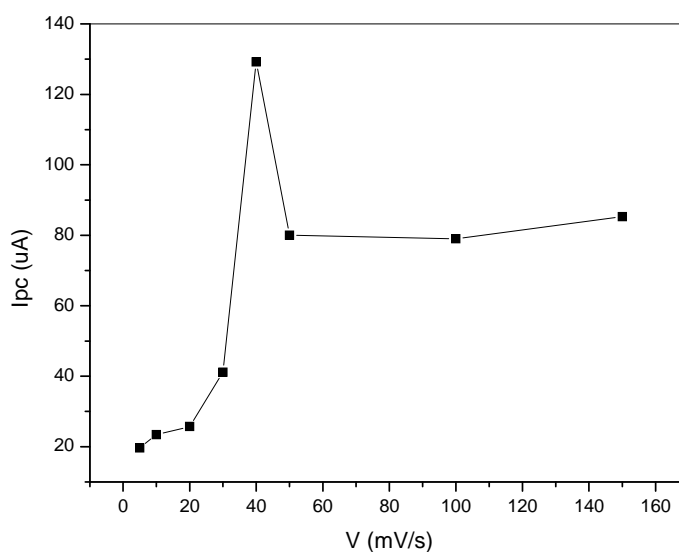


Figura 17. Variação da corrente de pico em função da velocidade de varredura (v) para o cetoconazol ($3,0 \times 10^{-6}$ mol/L), em tampão BR (pH 2,0) e $\Delta E = 50$ mV, pela técnica de VDP.

6.3. Estudo do comportamento voltamétrico do cetoconazol por voltametria de onda quadrada e otimização de parâmetros experimentais

A influência de alguns parâmetros inerentes a técnica de voltametria de onda quadrada no sistema foram observados. Dentro deste contexto, registraram-se voltamogramas de onda quadrada de soluções de cetoconazol para que fossem determinadas as melhores condições de aplicações desta técnica. Cabendo como ressalva, que esta técnica é mais rápida e há um consumo menor de espécies eletroativas quando comparado com a voltametria de pulso diferencial e seu limite de detecção é da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} mol.L⁻¹ (ROSA e colaboradores 2003).

Algumas investigações foram realizadas com o auxílio da voltametria de onda quadrada, entre elas temos o estudo da frequência e amplitude de aplicação de pulsos de potenciais, que são considerados como parâmetros determinantes para a

intensidade do sinal analítico (JANEGITZ e colaboradores, 2007; La-SCALEA e colaboradores, 2007).

6.3.1. Estudo da variação da amplitude de pulso

Para reações redox irreversíveis a sensibilidade analítica na VOQ sofre uma grande influência do aumento da amplitude de onda, isto porque a largura de meia-onda se mantém constante para amplitudes maiores que 20 mV. Com isso, a variação na amplitude de pulso é um dos parâmetros a ser otimizados na análise por VOQ (CABRAL e colaboradores, 2003).

O sistema investigado foi submetido ao estudo da influência da amplitude através de uma varredura entre 10 a 100 mV. A Figura 18 mostra as variações desse parâmetro na determinação das melhores condições experimentais. Observou-se que para valores de amplitudes menores que 100 mV, o aumento da intensidade de corrente é linear. Amplitudes maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para fins analíticos. Com isso as análises foram realizadas com uma amplitude de 50 mV, por apresentar o maior e melhor sinal analítico.

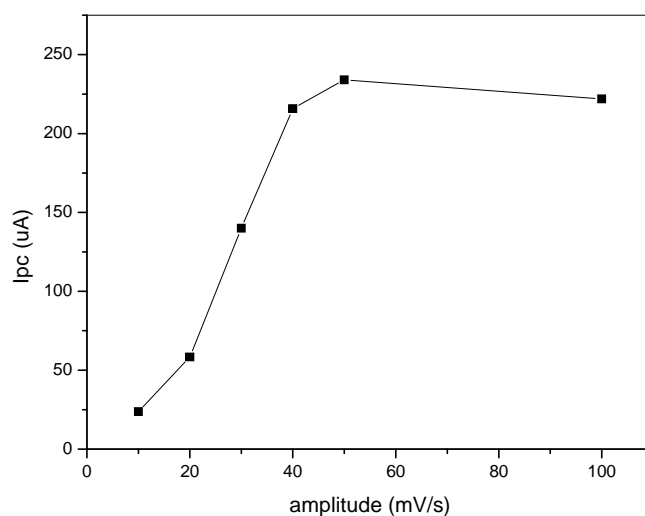


Figura 18. Variação da corrente de pico em função da amplitude (ΔE) para o cetoconazol ($2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L), em tampão BR (pH 2,0) e $v = 50 \text{ mV/s}$, pela técnica de VOQ.

Para o cetoconazol, a variação na amplitude de pulso provocou aumento na intensidade de corrente de pico e um deslocamento dos potenciais para valores mais positivos. A Figura 19 apresenta os voltamogramas resultantes da variação de amplitude de pulso de potencial.

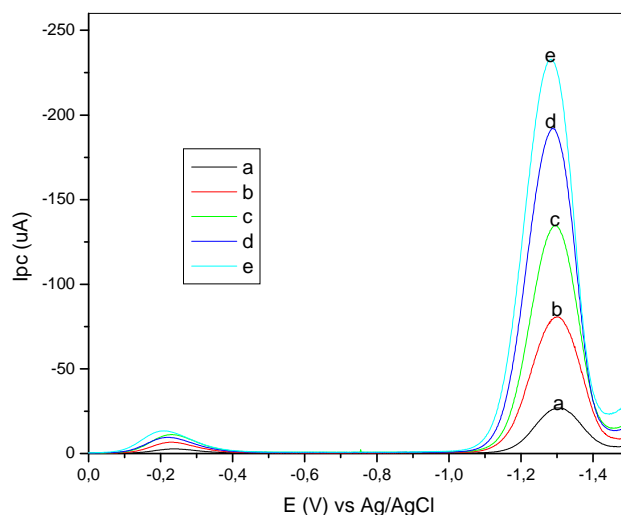


Figura 19. Voltamograma de onda quadrada para o CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, em tampão BR pH (2,0), $v = 100$ mV/s, $f = 40$ HZ em função da variação de amplitude de pulso: a) 10 mV; b) 20 mV; c) 30 mV; d) 40 mV e e) 50 mV.

Uma análise do comportamento da corrente de pico em função das mudanças na amplitude dos pulsos de potenciais mostrou que o aumento linear até amplitude de 50 mV, após este valor a aumento não é mais linear, tendendo a se tornar constante com o aumento da amplitude, evidenciando um patamar (Figura 18). Esse comportamento está de acordo com a teoria de VOQ, desenvolvida para sistemas irreversíveis, que afirma para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico é constante (CABRAL e colaboradores, 2003).

6.3.2. Estudo da variação da frequência da aplicação de pulso

A frequência de aplicação de pulsos de potencial (f) é um dos parâmetros voltamétricos envolvidos na VOQ (La-SCALEA, 2007), pois além de melhorar a sensibilidade da análise ainda possibilita uma observação do tipo de processo e o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica (CABRAL e colaboradores, 2003; La-SCALEA, 2007)

Neste estudo, foi feita uma varredura, com variações da frequência entre 10 a 150 Hz, conforme mostrado na Tabela 6 abaixo. Com base nos dados obtidos e pela sua respectiva análise foi selecionada a frequência de 40 Hz, que apesar de não ter a maior intensidade de pico catódico (I_{p_c}), suas curvas apresentavam uma melhor definição de seus sinais analíticos para os correspondentes I_{p_c} . Corroborando com o exposto acima, de acordo com CABRAL e colaboradores (2003), que frequências de pulso acima de 100s aumentam o valor da corrente, mas não promovem uma melhora significativa nas respostas voltamétricas.

Tabela 6. Variação da corrente de pico e potencial de pico em função da frequência em voltametria de onda quadrada.

Frequência (Hz)	- I _{pc} (uA)	- E (V)
10	26,60	1,300
20	33,10	1,321
30	36,60	1,343
40	42,60	1,362
50	48,20	1,377
100	69,00	1,438
150	82,70	1,477

Condições: CTZ ($2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão BR (pH = 2,0), $v = 100$ mV/s e $\Delta E = 50$ mv.

Para o cetoconazol o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial promoveu um aumento linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência (Figura 20). E de acordo com os critérios utilizados para o diagnóstico da VOQ, este comportamento é típico de processos controlados por difusão do reagente, de acordo com o proposto por CABRAL e colaboradores (2003), reafirmando as discussões propostas anteriormente.

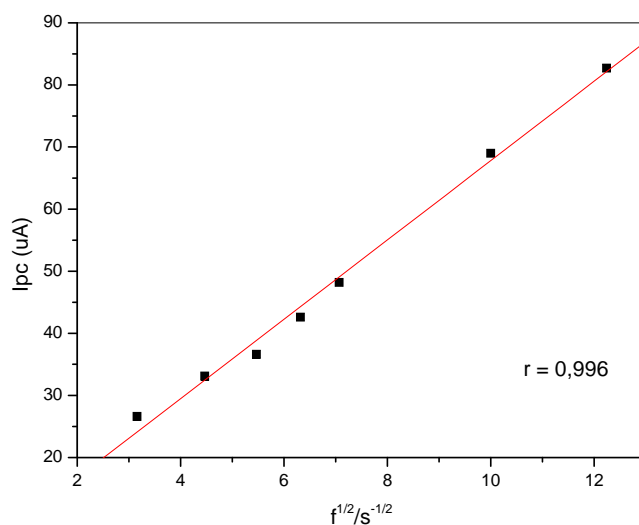


Figura 20. Variação da corrente de pico catódica em função da raiz quadrada da frequência para o CTZ ($2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L) em solução tampão BR (pH 2,0), $\Delta E = 50\text{mV}$ e $v = 100$ mV/s.

Com base no estudo dos diversos parâmetros que foram analisados com a intenção do estabelecimento das melhores condições experimentais para o estudo do cetoconazol em presença de eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina pode-se assim apresentar de acordo com a Tabela 7 os seguintes resultados:

Tabela 7. Parâmetros estudados e seus valores otimizados para voltametria de onda quadrada

Parâmetros estudados	Variação	Valor otimizado
----------------------	----------	-----------------

pH	2,0 – 5,0	2,0
Concentração (mol/L)	$1,81 \cdot 10^{-6} - 5,50 \cdot 10^{-6}$	$1,81 \cdot 10^{-6} - 5,50 \cdot 10^{-6}$
Amplitude (mV)	10 – 100	50
Frequência (Hz)	10 – 150	40

6.4. Estudo do comportamento voltamétrico do cetoconazol frente ao eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina

6.4.1. Estudo do pH

O cetoconazol apresenta valor de pKa 6,5 e 2,9 e a sua solubilidade é de bastante relevância devido a presença de grupos ionizáveis. Com isso estudou-se o comportamento voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, empregando a voltametria cíclica em tampão BR, contendo $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L de CTZ no intervalo de pH entre 2,0 e 5,0. Tendo seus resultados apresentados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Efeito do pH no potencial e na corrente de pico do cetoconazol

pH	E (V)	I_{pc} (μA)
2,0	-1,30	- 141,60
3,0	-1,30	- 78,50
4,0	-1,30	- 30,90
5,0	-1,40	- 23,70

Condições: $v = 40 \text{ mV/s}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$ e $[\text{CTZ}] = 2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$.

Os dados acima apresentam uma resposta eletroquímica com aumento pronunciado do sinal analítico em pH 2,0. Normalmente, sistemas redox irreversíveis, no qual ocorrem transferências de prótons é comum observar deslocamento dos valores de $E_{1/2}$ para valores mais negativos de potencial com a variação do pH (PEREIRA, 1999; CABRAL e colaboradores, 2003). Ainda corroborando com a discussão acima, sabe-se que, as correntes de pico aumentam com a diminuição do pH em mecanismos que envolvem a transferência de prótons (H^+) na região do eletrodo para a redução do cetoconazol (NAN e colaboradores, 2002; ARRANZ e colaboradores 2003).

Reforçando a discussão acima, KOVÁCS e colaboradores (2009), realizaram um estudo do comportamento da solubilidade do miconazol (composto imidazólico semelhante ao cetoconazol) em função do pH, e concluíram que a solubilidade desse composto aumenta com a diminuição do pH, isto se deve ao fato nitrogênio da droga se encontrar sob a forma protonada, e isso polariza a molécula, fazendo com que o composto se torne mais solúvel na presença de solventes polares (KOVÁCS e colaboradores, 2009). Deste modo, o deslocamento de potencial para valores mais negativos, ou a diminuição das correntes de pico na redução do CTZ podem ser indicativos de que o processo de redução envolva uma transferência de prótons.

6.4.2. Efeito da velocidade de varredura de potenciais.

A influência da velocidade de varredura sobre os potenciais de pico de redução nos voltamogramas (Figura 21) obtidos para $2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ de CTZ foi investigado nos

intervalos entre 5 a 150 mV/s em meio ácido (tampão BR pH 2,0). O efeito da mudança na velocidade de varredura sobre os parâmetros, potencial de pico e corrente de pico é mostrado na Tabela 9. Com base na tabela tem-se que o potencial de pico de redução do cetoconazol apresenta um deslocamento acima de 25 mV para valores mais negativos neste intervalo de velocidade de varredura. Estes deslocamentos para valores mais negativos de potencial são típicos de processos de transferência eletrônica irreversível ou com reação química subsequente à transferência de carga (EC) (PEREIRA, 1999).

Tabela 9. Parâmetros voltamétricos do sistema $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L de cetoconazol em solução tampão pH 2,0.

Velocidade de varredura (mV/s)	- Ep (V)	- Ip (uA)
5	1,240	12,00
10	1,244	23,00
15	1,251	30,70
20	1,262	43,00
30	1,262	52,30
40	1,269	60,10
50	1,276	72,00
100	1,276	95,70
150	1,276	117,70

De acordo com a literatura (BRETT, 2003) os processos eletródicos envolvendo corrente de pico proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura são controlados por processos de difusão, e de acordo com a Figura 21, a corrente de pico (i_{pc}) catódica varia linearmente com v , evidenciando que o comportamento do processo de transferência de carga, que foi estudado é controlado por processos de difusão, (PEREIRA, 1999; BARTLETT e colaboradores, 2005; DAS e colaboradores, 2006; TURDEAN e colaboradores, 2006; La-SCALEA e colaboradores, 2007; JANEGITZ e colaboradores, 2007) onde se observa que essas evidências, estão de acordo com as informações apresentadas na discussão da VOQ, reforçando assim o comportamento do cetoconazol frente ao eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado com hemina.

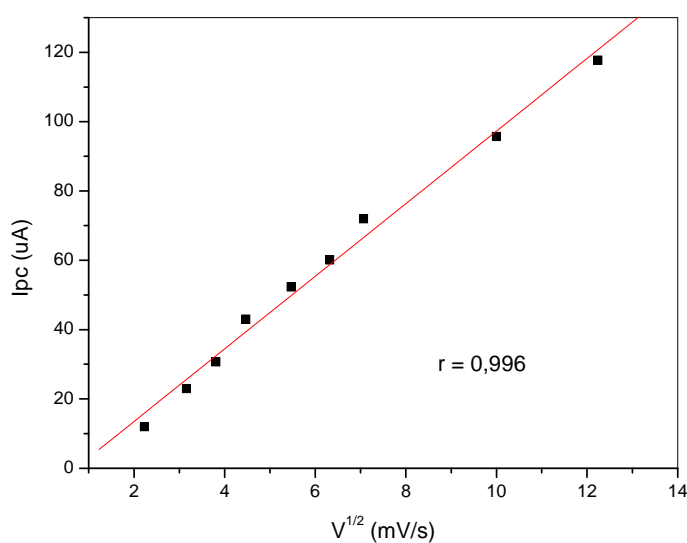


Figura 21. Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico no sistema $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L de CTZ em solução tampão BR pH 2.

Por outro lado, os resultados mostrados na figura 22, foram obtidos a partir de sucessivas medidas sem que ocorresse a renovação da área superficial do eletrodo e

como pode se observar existiu uma diminuição significativa da magnitude da intensidade da corrente de pico, situação essa que evidencia uma hipótese de que podem ocorrer processos de passivação do analito e ou produto de redução.

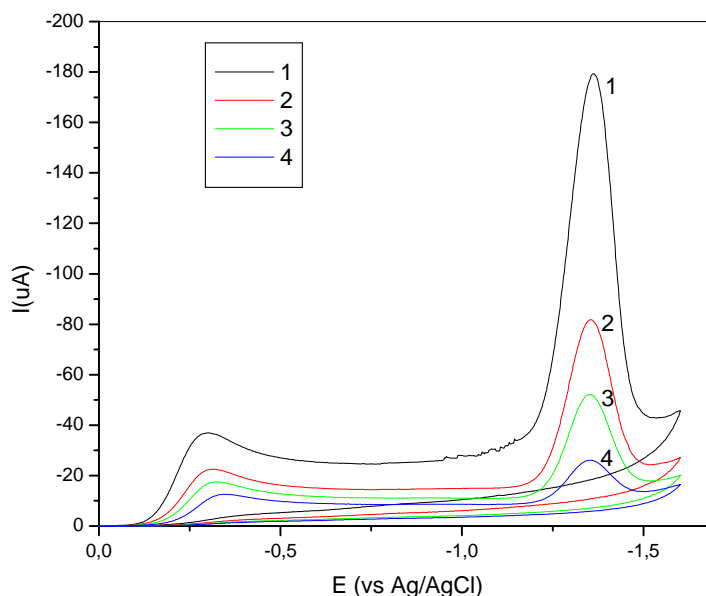


Figura 22. Voltamogramas cíclicos sucessivos de uma solução de $[CTZ] = 2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L em tampão BR (pH=2,0) e $v = 200$ mV/s.

O comportamento eletroquímico do cetoconazol foi estudado empregando a voltametria cíclica (Figura 23). A redução eletroquímica do CTZ em eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina é representada por um pico irreversível em torno de $-0,22$ V que caracteriza a redução do Fe(III) da hemina em Fe(II) (NAN e colaboradores, 2002; IWUOHA e colaboradores, 2003; La-SCALEA e colaboradores, 2007; HENDRICKS, e colaboradores, 2008), sendo uma característica de sistemas redox que apresentam ferroporfirinas confinadas (BEHERA e RAJ, 2008). Em seguida um pico em $-1,44$ V (vs Ag/AgCl) em solução tampão BR pH 2,0 conforme o voltamograma a seguir (Figura 23), trazendo evidências da redução do cetoconazol pelo eletrodo modificado com hemina. Observando-se nesta varredura que o fármaco apresenta comportamento

eletroquímico onde os picos catódicos não são acompanhados pelos picos anódicos, indicando um processo irreversível, como discutido anteriormente, e confirmado pelos trabalhos realizados por ARRANZ e colaboradores (2003), o qual se utilizou de um eletrodo de mercúrio no estudo da redução do cetoconazol.

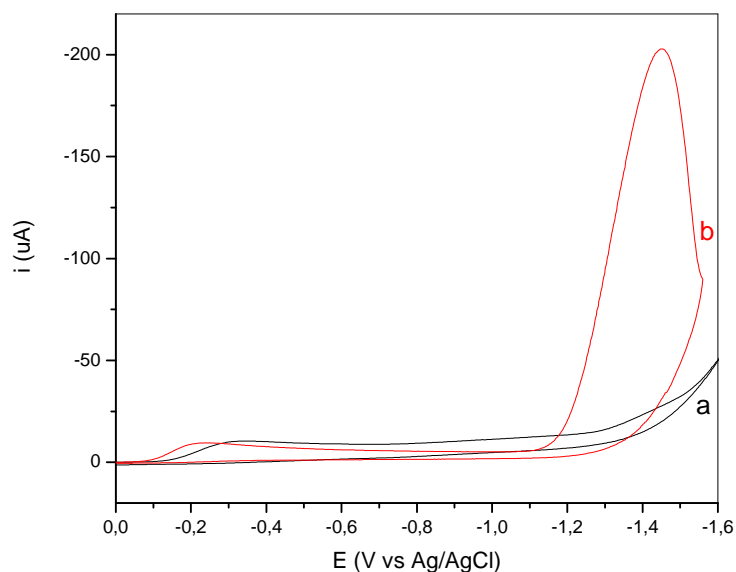


Figura 23. Voltamograma cíclico do CTZ na solução de tampão BR (pH 2,0) utilizando eletrodo de pasta de carbono com hemina, em a) branco, b) CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L e $v = 200$ mV/s.

O eletrodo de pasta carbono modificado com hemina mostrou-se sensível a presença de cetoconazol em solução. Com efeito, o valor de corrente de pico registrado pelo EPCM em pH 2,0 aumentou com a adição de padrão de cetoconazol (Figura 24), levando-se à conclusão que a reação entre o fármaco e a hemina ocorre predominantemente sobre a superfície do eletrodo de trabalho.

Drogas que contém nitrogênio, com a presença do grupo imidazólico, ligam-se ao ferro do grupo prostético heme (COHEN e colaboradores, 1998; DAS e colaboradores, 2006; AMENDOLA e colaboradores, 2008). Interações intensas são

observadas: eletrostáticas, ligações de hidrogênio (STEPHANOS e colaboradores, 1996; BEHERA e RAJ e colaboradores, 2008). A afinidade das ferroporfirinas pelos ligantes N-doadores pode ser modulado por efeitos estéricos e/ou por ligações de hidrogênio com os resíduos de cadeia próximos ao sítio ativo (DAS e colaboradores, 2006). Os derivados imidazólicos e triazólicos ligam-se via nitrogênio terciário dos imidazóis ou ao nitrogênio quaternário dos triazóis dos grupos heterocíclicos pela sexta coordenação do átomo de ferro da heme porfirina. (PEREIRA, 1999, AMENDOLA e colaboradores, 2008; AHER e colaboradores, 2009). Deve-se ainda levar em consideração que no pH em que foi realizada a análise, o cetoconazol encontra-se protonado, essencialmente no anel imidazólico. Estudos realizados por BEHEJA e RAJ (2008), evidenciaram interações entre grupo imidazólico, substituído ou não, e microperóxidos, que são heme proteína eletroativas. Este grupo apresenta uma natureza doadora de elétrons π , sendo assim, afirmam que quanto maior for o caráter básico da espécie a uma maior tendência em estabilizar o ferro da heme proteína sob a forma Fe(III) do que na forma de Fe(II) (STEPHANOS e colaboradores, 1996; DAS e colaboradores, 2006; BEHERA e RAJ, 2008). Outra observação que fortalece as colocadas anteriormente, é que os potenciais de pico sofrem pequenos deslocamentos para valores mais negativos, o que indica que o estado oxidado é mais estável do que o estado reduzido da proteína (DAS e colaboradores, 2006).

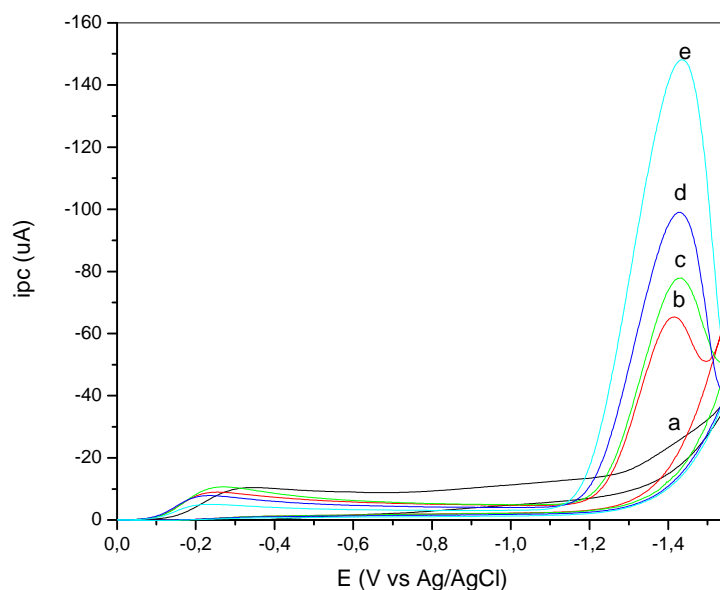


Figura 24. Voltamogramas cíclicos para a redução de CTZ utilizando eletrodo modificado com hemina em pH 2,0 e com diferentes concentrações: a) branco; b) $2,0 \cdot 10^{-6}$ c) $2,8 \cdot 10^{-6}$ d) $3,6 \cdot 10^{-6}$ e) $4,3 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $v = 200$ mV/s.

De acordo com TANAKA e colaboradores (2003), para um dado pico voltamétrico, assumindo comportamento nernstiano ideal, a corrente de pico (I_p) pode ser relacionada com a velocidade de varredura do potencial (v) pela equação:

$$I_p = (n^2 F^2 / 4RT) v A \square (5)$$

I_p – corrente de pico catódica (μA);

n – número de eletrons do processo redox;

F – constante de Faraday (96 485C);

T – temperatura (298 k);

R – constante dos gases ideais (8,314 J/k.mol);

v – velocidade (V/s);

A – área do eletrodo (cm²);

□ - concentração superficial da espécie adsorvida (mol/cm²).

Sabe-se que a concentração superficial da espécie adsorvida esta relacionada com a carga Q sob o pico voltamétrico pela equação:

$$Q = n F A \square \quad (6)$$

Q – carga (Coulomb);

do rearranjo das equações 5 e 6, em uma maneira mais simples, é possível obter a expressão:

$$n = 4RT I_p / vFQ \quad (7)$$

A partir desta equação e dos valores das cargas, calculadas com base nas áreas dos picos voltamétricos obtidos em uma determinada velocidade, os valores obtidos para n foram, próximos a 2, ou seja, o processo redox, muito provavelmente, envolve 2 elétrons.

A quantidade de hemina ou de sítios ativos pode ser mais bem avaliado a partir da estimativa da concentração superficial da espécie adsorvida (\square) sobre o eletrodo de trabalho (La-SCALEA e colaboradores, 2007). Assim sendo, utilizando a equação 6, para o cálculo foi encontrado um valor de aproximadamente $3,26 \cdot 10^{-10}$ mol/cm², no trabalho realizado por WANG, apud, La-SCALEA e colaboradores 2007, eles obtiveram um valor de $2,2 \cdot 10^{-10}$ mol/cm².

A hemina, heme proteínas contendo ferro III como grupo prostético, quando em sistemas que apresentam algumas espécies de substratos, podem se comportar mediante a equação 8 abaixo (Figura 25) (FREIRE e colaboradores, 2003; BISTOLAS e colaboradores, 2005; La-SCALEA e colaboradores, 2007):

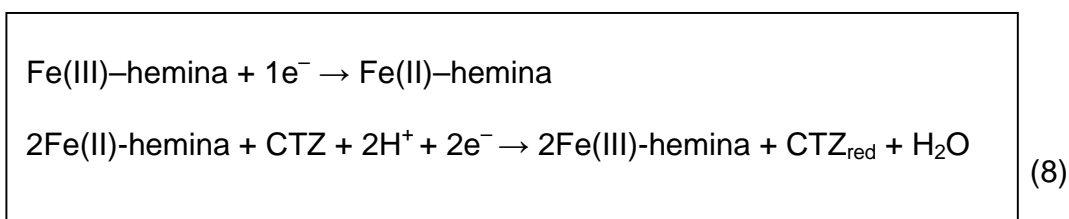


Figura 25. Esquema geral do processo eletrolítico do cetoconazol na presença de hemina.

STEPHANOS e colaboradores (1996), SERRANO e colaboradores, (1999), SOTOMAYOR e KUBOTA (2002), SABRY e colaboradores (2004) e AMENDOLA e colaboradores (2008), fizeram estudos de interação de metaloproteínas com compostos heterocíclicos nitrogenados que apresentam semelhanças com imidazol, do tipo: piridina, histidina, glicina; bases nitrogenadas; adenina, citosina, etc. E propuseram mecanismos semelhantes. Os resíduos de compostos nitrogenados são facilmente reduzidos, estes sítios de redução, que realizam ligações de hidrogênio, têm como

condição primária a protonação, seguida da transferência de carga (SERRANO e colaboradores, 1999). O íon Fe(II), promove interações eletrônicas envolvendo o ligante, o metal, e os orbitais π que são fatores importantes para as suas ligações. Enquanto que a espécie Fe(III), apresenta ligações coloumbianas com ligantes aniônicos. E em soluções aquosas a espécie de Fe(III) se apresenta mais estável do que a Fe(II). Então, de acordo com o esquema representado acima, pode-se sugerir a seguinte equação (Figura 26) (STEPHANOS e colaboradores, 1996; FREIRE e colaboradores, 2003; BISTOLAS e colaboradores, 2005; La-SCALEA e colaboradores, 2007).

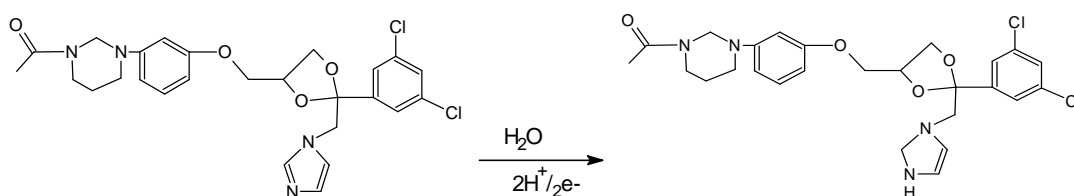


Figura 26. Esquema simplificado do processo de redução do cetoconazol.

6.5. Estudo dos interferentes em potencial

Estudou-se a possível interferência em potencial de diversos fármacos; miconazol, hidroclotiazida, ácido L-ascórbico; ciprofloxacina e dipirona; nas medidas de voltametria de onda quadrada na presença de CTZ $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Variaram-se as concentrações dos interferentes de $2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Tendo sido observado na varredura de potencial entre 0,0 e 1,8V nenhuma interferência significativa.

Tabela 10: Estudo dos possíveis interferentes na determinação de cetoconazol.

Fármaco	Concentração (mol/L)
Miconazol	$2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$

Hidroclotiazida	$2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$
Ácido L-ascórbico	$2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$
Ciprofloxacina	$2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$
Dipirona	$2,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,0 \cdot 10^{-5}$

6.6. Curvas analíticas

A técnica escolhida foi à voltametria de onda quadrada pela rapidez das análises, os parâmetros experimentais da técnica, tais como frequência, amplitude foram otimizados em pH 2,0. Após otimizar as condições de trabalho para o eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de potencial de 0,0 a $-1,8$ V(vs. Ag/AgCl) em diferentes concentrações de cetoconazol, afim de se obter a curva analítica. As Figuras 27 e 28 mostram as curvas analíticas que foram obtidas para o CTZ. A equação da curva foi $I_{pc} (\mu A) = 1,71 \cdot 10^{-6} + 2,07 \cdot [CTZ] (\text{mol/L})$, para um intervalo de concentração de $1,8$ a $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $r = 0,9989$, $n = 7$ e $N = 6$.

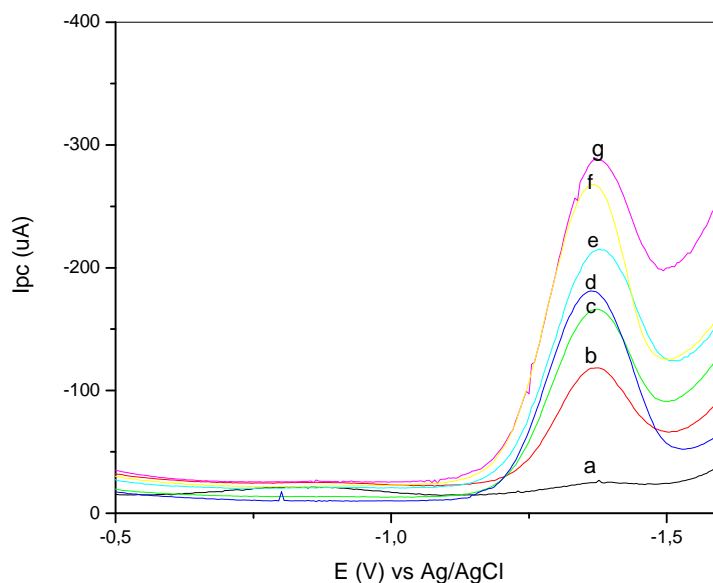


Figura 27. Voltamograma de onda quadrada para a redução do CTZ utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina em pH 2,0 e com diferentes concentrações: a) branco; b) $2,5 \cdot 10^{-6}$; c) $3,07 \cdot 10^{-6}$; d) $4,0 \cdot 10^{-6}$; e) $4,37 \cdot 10^{-6}$; f) $4,70 \cdot 10^{-6}$; g) $5,00 \cdot 10^{-6}$ mol/L com $f = 40$ Hz; $\Delta E = 50$ mV e $v = 100$ mV/s.

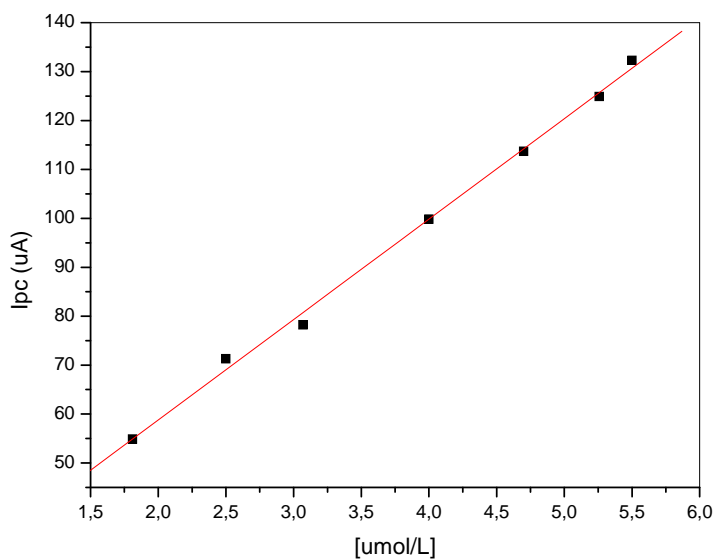


Figura 28. Curva de analítica obtida para CTZ empregando EPCM com hemina em solução tampão BR pH 2 obtida pela técnica de voltametria de onda quadrada, com $f = 40$ Hz; $\Delta E = 50$ mV e $v = 100$ mV/s.

No desenvolvimento de um método analítico, na adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processos de avaliação que estimem a eficiência na rotina de laboratório. Esse processo costuma ser chamado de validação. Seu objetivo consiste em demonstrar quando se desenvolvem ou se efetuam adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO e colaboradores, 2003).

Os parâmetros para a validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da ICH ("International Conference on Harmonization"), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para a validação dos métodos analíticos. Já no Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, são a ANVISA e o INMETRO (RIBANI e colaboradores, 2004).

Os parâmetros analíticos do método desenvolvido foram estipulados segundo critério descrito na norma RE nº 899 da Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), com avaliação da linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, observando-se as condições experimentais do estudo.

Com base no exposto alguns parâmetros foram avaliados a fim de validar o método desenvolvido. Dentre estes foram calculados matematicamente os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), através da relação entre o desvio padrão

da curva de calibração (SD) e o coeficiente angular (b), usando um fator multiplicador como sugerido pela ANVISA.

$$\boxed{LD = 3.SD/b} \quad e \quad \boxed{LQ = 10.SD/b} \quad (9)$$

A partir das análises estatísticas pode-se ter uma estimativa de qual é a melhor técnica para ser empregada na determinação do fármaco estudado, com base nos LD, LQ, r e SD. A Tabela 11 abaixo mostra os dados comparativos.

Tabela 11. Comparação de dados de análise estatística entre as técnicas VPD e VOQ.

Técnica voltamétrica	LD	LQ	R	SD
VPD	$1,46.10^{-7}$	$4,86.10^{-7}$	0,9996	$2,02.10^{-8}$
VOQ	$1,68.10^{-7}$	$5,59.10^{-7}$	0,9989	$1,15.10^{-7}$

Observando-se os dados descritos na Tabela 11, tem-se que os dois métodos apresentam regressões lineares fortíssimas e que pela análise de LD e LQ, chega-se a conclusão que qualquer um dos métodos pode ser empregado na determinação de cetoconazol. Valendo ressaltar que esta avaliação, e as determinações dos outros fatores que envolveram os processos de desenvolvimento do método foram bastante importantes para se chegar a uma conclusão definitiva de qual o melhor método a ser empregado.

Com o objetivo de se obter resultados adicionais que mostrassem a sensibilidade da metodologia analítica desenvolvida, curva analítica para o CTZ também foi construída com o emprego da técnica de espectrofotometria de absorção UV – VIS, uma vez que o composto apresenta uma banda de absorção ótica em 209 nm. A Figura 29 mostra a curva analítica obtida para o CTZ. A equação da curva obtida foi $Abs = 0,7090 + 22909,77 [CTZ] (mol/L)$, para um intervalo de concentração de $2,0 \cdot 10^{-6}$ a $1,0 \cdot 10^{-5} mol/L$, $r = 0,9990$, $n = 8$, $N = 3$, $LD = 3,69 \cdot 10^{-7} mol/L$ e $LQ = 1,23 \cdot 10^{-6} mol/L$.

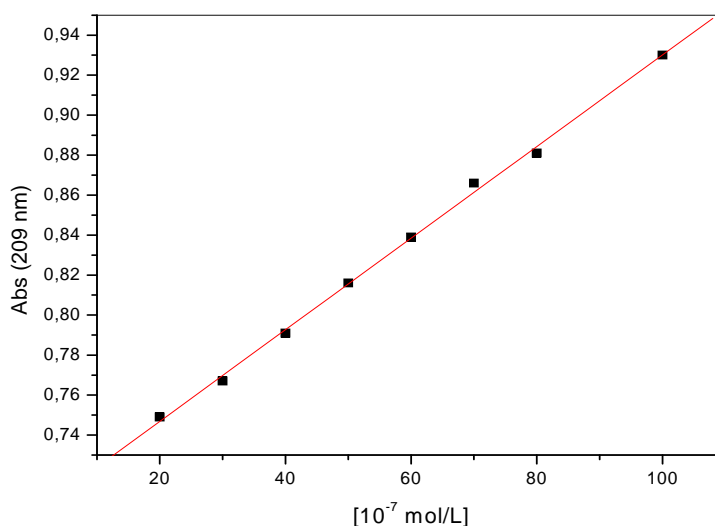


Figura 29. Curva analítica do CTZ utilizando espectrofotometria de UV – VIS (209 nm) em solução de CTZ aquosa de 5% de etanol e 5% de HCl .

6.7. Aplicação de testes estatísticos

Considerando a exatidão dos métodos adequada, quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F. Este se baseia no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos ($F_{calc} = S_A^2/S_B^2$), colocando-se a maior no numerador, de modo que

a razão seja maior ou igual a um. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de F. Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões (INMETRO, 2007).

O método proposto foi aplicado na determinação de cetoconazol em duas formulações farmacêuticas e os resultados obtidos comparados com aqueles obtidos empregando-se o método comparativo. Os resultados obtidos do procedimento voltamétrico desenvolvido e o método comparativo espectrofotométrico (UV – VIS) são apresentados nas Tabelas 12 e 13 abaixo. Com um nível de confiança de 99%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de um intervalo aceitável, mostrando assim a confiabilidade do procedimento voltamétrico desenvolvido e a importância do mesmo.

Tabela 12. Determinação de cetoconazol em produtos farmacêuticos empregando-se o EPCM com hemina proposto e espectrofotometria de UV-VIS como método comparativo.

Amostras	Cetoconazol (mg/comprimido)		
	Rotulado	Comparativo (UV - VIS)	Proposto (voltamétrico)
Nizoral	200	188,23 ± 2,13	191,69 ± 1,12
Genérico	200	189,03 ± 1,56	186,64 ± 0,87

Tabela 13. Dados comparativos da análise estatística da determinação de cetoconazol em produtos farmacêuticos empregando-se o EPCM com hemina e espectrofotometria de UV – VIS como método comparativo.

Técnica utilizada	Amostra analisada	LD	LQ	r	SD
Técnica voltamétrica (EPCM)	Nizoral	$4,22 \cdot 10^{-7}$	$1,40 \cdot 10^{-6}$	0,9976	$1,02 \cdot 10^{-7}$
	Genérico	$3,37 \cdot 10^{-7}$	$1,12 \cdot 10^{-6}$	0,9988	$7,88 \cdot 10^{-8}$
Técnica espectrofotométrica (UV – VIS)	Nizoral	$6,90 \cdot 10^{-7}$	$2,22 \cdot 10^{-6}$	0,9963	$3,86 \cdot 10^{-3}$
	Genérico	$5,40 \cdot 10^{-7}$	$1,80 \cdot 10^{-6}$	0,9976	$2,96 \cdot 10^{-3}$

Vários testes estatísticos podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra em analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste T (student) de comparação das médias (Tabela 14) (INMETRO, 2007). Com base no exposto acima, observa-se que tanto no teste $F_{3,6}$ quanto no teste $T_{3,6}$ os valores calculados para as amostras são menores que os valores críticos para um nível de confiança de 99%, com isso pode-se concluir que as variâncias podem ser consideradas próximas, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração do estudo, em outras palavras, isso pode confirmar a precisão aceitável para o método proposto.

Tabela 14. Valores obtidos pela execução dos testes estatísticos F e T para comparação de métodos diferentes que foram analisados para as amostras de medicamentos de marca e genérico.

Teste executado		Valor calculado	Valor crítico
Teste (Nizoral)	F	2,77	3,29
Teste (Nizoral)	T	2,14	3,70
Teste Genérico	F	3,26	3,29
Teste Genérico	T	2,39	3,70

Conclusão

7.0. CONCLUSÃO

O eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina foi utilizado com sucesso para avaliar o comportamento eletroquímico e também para o desenvolvimento de nova metodologia analítica para a determinação do antimicótico cetoconazol.

A interação entre o eletrodo modificado e o CTZ resultou em uma resposta voltamétrica bem definida, o que tornou possível o estudo da reação de redução do composto até então pouco explorado na literatura. Observando-se um processo de redução irreversível, com a ocorrência de um pico bem definido a $-1,44$ V vs (Ag/AgCl) tampão BR pH 2, envolvendo uma reação de protonação e possivelmente a transferência de dois elétrons.

A partir da sensibilidade alcançada com o emprego da técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ), uma nova metodologia analítica foi desenvolvida para a análise de rotina do cetoconazol em comprimidos com rapidez, exatidão, boa precisão, baixo custo e de fácil construção; uma vez que este foi preparado misturando-se pó de grafite, o modificador e óleo mineral. Enfatizando que a metodologia pode ser utilizada como uma boa alternativa aos procedimentos de análises usuais.

O método se apresentou linear ($r = 0,9989$) numa faixa entre $1,80 \cdot 10^{-6}$ mol/L a $5,50 \cdot 10^{-6}$ mol/L, com limites de detecção e de quantificação de $1,67 \cdot 10^{-7}$ e $5,59 \cdot 10^{-7}$, respectivamente. Valendo ressaltar que dos possíveis interferentes analisados (miconazol, hidroclotiazida, ácido L-ascórbico, ciprofloxacina e dipirona) não foi observado qualquer modificação na resposta do cetoconazol.

O procedimento de adição de padrão permitiu a eliminação de erros devido às matrizes, permitindo assim a análise da amostra de produtos farmacêuticos com boa exatidão. E estudo comparativo utilizando os testes T e F mostraram que os resultados obtidos pelo método comparativo foram concordantes a um nível de confiança de 99%.

Diante das informações levantadas pela pesquisa, conclui-se que os resultados alcançados são bastante promissores para a determinação do cetoconazol, mas também de futuros estudos de um diverso número de drogas que são comercializadas, devido à sua grande possibilidade de versatilidade observada pelo eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, tendo em vista, a sensibilidade, a exatidão e o seu baixo custo de produção.

Atividades Futuras

8.0. ATIVIDADES FUTURAS

Durante o desenvolvimento desse trabalho e após análise dos resultados obtidos, surgiram algumas perspectivas de trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa, como o eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, dentre eles podemos citar:

- ✓ A determinação de CTZ em amostras de água de abastecimento;
- ✓ A determinação de fármacos como: captopril, hidroclotiazida utilizando o eletrodo modificado com hemina;
- ✓ A aplicação do eletrodo na determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas comercializados, bem como em comprimidos efervescentes;
- ✓ Realização de estudos de processos oxidativos avançados de degradação de CTZ.

Bibliografia

9.0. BIBLIOGRAFIA

ABDEL-GAWAD, F.M. Spectrophotometric determination of some pharmaceutical piperazine derivatives through charge-transfer and ion-pair complexation reaction. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 15, p. 1679 – 1685, 1997.

ABDEL-MOETY, E.M.; KHATTAB, F.I.; KELANI, K.M.; ABOUAL-ALAMEIN, A.M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. **II Farmaco**. v. 57, p. 931 – 938, 2002.

ABOU-ATTIA, F.M.; ISSA, Y.M.; ABDEL-GAWAD, F.M.; ABDEL-HAMID, S.M. Quantitative determination of some pharmaceutical piperazine derivatives through complexation with iron(III) chloride. **II Farmaco**. v. 28, p. 573 – 579, 2003.

AHER, N.G.; PORE, V.S.; MISHRA, N.N.; KUMAR, A.; SKUKLA, P.K.; SHARMA, A.; BHAT, M.K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.19, p. 759 – 763, 2009.

ALEIXO, L.M. Voltametria: conceitos e técnicas. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil. Disponível em: <http://ishtar.iqm.unicamp.br/downloads/chemkeys/voltametria-vf.pdf>. acessado em: 12 agosto 2008.

AMENDOLA, V.; DALLACOSTA, C.; FABBRIZZI, L.; MONZANI, E. A hybrid molecular machine. **Tetrahedron**. v. 64, p. 8318 – 8323, 2008.

ARRANZ, P.; ARRANZ, A.; MOREDA, J. M.; CID, A.; ARRANZ, J. F. Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode. **Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**. v. 33, p. 589-596, 2003.

BARTLETT, P.N.; GHONEIM, E.; EL-HEFNAWY, G.; EL-HALLANG, I. Voltametry and determination of metronidazole at a carbon fiber microdisk electrode. **Talanta**. v. 66, p. 869 – 874, 2005.

BAUTITZ, I. R. Degradação de tetraciclina utilizando o processo de foto-fenton. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo – Brasil, 2006.

BEHERA, S.; RAJ, R. Electrochemistry of surface wired redox protein: Axial ligation and control of redox potential. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v.619 – 620, p. 159 – 163, 2008.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 159 – 172, 2004.

BISTOLAS, K.; WOLLENBERGER, U.; JUNG, C.; SCHELLER, F.W. Cytochrome P450 biosensors – a review. **Biosensors and Bioelectronics**. v.20, p. 2408 – 2423, 2005.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento. Cadeia Farmacêutica no Brasil: Avaliação preliminar e perspectivas. n. 18, p. 3 – 22, 2003.

BOSCH, E.M.; SÁNCHEZ, A.J.R.; ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B. Analytical methodologies for the determination of omeprazole: An overview. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical of Analysis**. v. 44, p. 831 – 844, 2007.

BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A. Eletroquímica: Princípios, métodos e aplicações. 2ª ed, v.5, Oxford University Press, 2003.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. v.13, p. 129 – 146, 2003.

BUFFLE, J.; WABER-TERCIER, M.L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 172 – 191, 2005.

CABRAL, M.F.; DE SOUZA, D.; ALVES, C.R.; MACHADO, S.A.S. Estudo do comportamento do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**. v. 28, n. 2, p. 41 – 47, 2003.

CHEN, J.; WOLLENBERGER, U.; LISDAT, F.; GE, B.; SCHELLER, F.W. Superoxide sensor based on hemin modified electrode. **Sensors and Actuators B**. v. 70, p. 115 – 120, 2000.

COHEN, D.J.; KING, B.C.; HAWKRIDGE, F.M. Spectroelectrochemical and electrochemical determination of ligand binding and electron transfer properties of myoglobin, cyanomyoglobin and imidazolemyoglobin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 447, p. 53 – 62, 1998.

COSTA, A.A. Síntese, Caracterização e aplicação de catalisadores metaloporfirínicos suportados em MCM – 41. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília – Brasil, 2006a.

COSTA, C.O. Estudos bioeletroquímicos e eletroanalíticos da diospirina: agente leishmancida e antitumoral. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió – Brasil, 2006b.

DA SILVA, A.L.M.; SOBRINHO, J.L.S.; NETO, P.J.R.; DA SILVA, R.M.F.; DE MEDEIROS, F.P.M.; LIMA, L.G. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em

comprimidos de benzenidazol para doenças de chagas. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1163 – 1166, 2007.

DAS, A.; TRAMMELL, S.A.; HECHT, M.H. Electrochemical and ligand binding studies of a new heme protein. **Biophysical Chemistry**. v. 123, p. 102 – 112, 2006.

DO CARMO, D.R.; DA SILVA, R.M.; STRADIOTTO, N.R. Electrocatalysis and determination of Ascorbic Acid through graphite paste electrode modified with iron nitroprusside. **Portugaliae Electrochimica Acta**. v. 22, p. 71 – 79, 2004.

EL-MAALI, N.A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**. v. 64, p. 99 – 107, 2004.

FERRÃO, F.M.; DE SOUZA, J.S. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 3, p. 437 – 445, 2006.

FOSSI, M.C.; MARSILI, L.; CASINI, S.; BUCALOSSI, D. Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans. **Marine Environmental Research**. v. 62, p. 200 – 204, 2006.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; MELLO, L.D.; KUBOTA, T.L. Direct electron transfer: An Approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 14, n. 2, p. 230 – 243, 2003.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**. v. 26, n. 3, p. 381 – 389, 2003.

GONÇALVES, T.M. Desenvolvimento e Validação de metodologias analíticas para estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Brasil, 2005.

HASSELBERG, L.; CELANDER, M.C.; GROSVIK, B.E.; GOKSOYR, A. Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Hepatology**. v. 4, n. 2, p. 1 – 15, 2005.

HENDRICKS, N.R.; WARYO, T.T.; AROTIBA, O.; JAHED, N.; BAKER, P.G.L.; IWUOHA, E.I. Microsomal cytochrome P450-3A4 (CYP3A4) nanobiosensor for the determination of 2,4-dichlorofenol-An endocrine disruptor compound. **Electrochimica Acta**. 2008, doi:10.1016/j.electacta.2008.09.073.

HINSON, J.P.; RAVEN, P.W. Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. **Best Practice e Research Endocrinology & Metabolism**. v. 20, n. 1, p. 111 – 120, 2006.

IWOUHA, E.; JOSEPH, S.; ZHANG, Z.; SMYTH, M.R.; FUHR, U.; MONTELLANO, P.R.O. Drug metabolism biosensors: electrochemical reactivities of cytochrome P450_{cam} immobilized in synthetic vesicular systems. **Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**. v. 17, p. 1101 – 1110, 1998.

JANEGITZ, B. C.; JUNIOR, L.H.M.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu(II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Química Nova**. v. 30, n. 7, p. 1673 – 1676, 2007.

JOSEPH, S.; RUSLING, J.F.; LVOV, Y.M.; FRIEDBERG, T.; FUHR, U. An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 1817 – 1826, 2003.

JUNIOR, L.H.M. Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo – Brasil, 2007.

KÓVACS, K.; STAMPF, G.; KLEBOVICH, I.; ANTAL, I.; LUDÁNYI, K. Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 36, p. 352 – 358, 2009.

La-SCALEA, M.A.; SERRANO, S.H.P.; FERREIRA, E.I.; BRETT, A.M.O. Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 29, p. 561 – 568, 2002.

La-SCALEA, M.A.; SILVA, H.S.R.C.; FERREIRA, E.I. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 43, p. 371 – 383, 2007.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 88, n. 4, p. 177 – 180, 2007.

LIBERMAN, B. Papel da terapia medicamentosa da síndrome de Cushing. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 47, n. 4, p. 381-387, 2003.

LIN, X.; JIANG, X. Voltametry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. **Bioelectrochemistry**. v. 68, p. 206 – 212, 2006.

LINDEN, K.G.; KUNUKCU, Y.K.; SHEMER, H. Degradation of the pharmaceutical Metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes. **Chemosphere**. v. 63, p. 269 – 276, 2006.

LICHTIG, J.; ANDRADE, R.F.; VAZ, J.M. Determination of secnidazol in pharmaceutical tablets an intestinal fluids by differential pulse polarography. **Analytical Chimica Acta**. v. 332, p. 161 – 164, 1996.

MELO, D.O.; RIBEIRO, E.; STORPIRTIS. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 4, p. 475 – 485, 2006.

NAKASHIMA, N.; TOKUNAGA, T.; OWAKI, H.; MURAKAMI, H.; SAGARA. Catalytic redution of organohalides at hemin and hemin-imidazole polymer films on pyrolytic graphite electrodes. **A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 169, n. 163 – 170, 2000.

NAN, C.G.; FENG, Z.Z.; LI, W.X.; PING, D.J.; QIN, C.H. Electrochemical behavior of tryptophan and its derivates a glassy carbon electrode modified with hemin. **Analytica Chimica Acta**. v. 452, p. 245 – 254, 2002.

OJEDA, C.S.; ROJAS, F.S. Recent development in derivate ultravioleta/visible absortion spectrophotometry: 2004 – 2008. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 22 – 44, 2009.

OLIVEIRA, E.A.; LABRA, M.E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. **Caderno de Saúde Pública**. v. 22, n. 11, p. 2379 – 2389, 2006.

PEREIRA, F.C. Estudo do comportamento eletroquímico de alguns agentes antifúngicos utilizando polarografia de pulso diferencial e voltametria de redissolução catódica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo – Brasil, 1999.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. s107 – s111, 2005.

PEREIRA, F.C.; ZANONI, M.V.B.; GAURATINI, C.G.I.; FOGG, A.G. Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE – 3B. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 27, p. 201 – 208, 2002.

PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 6, p. 494-514, 2007.

PÉREZ – RIVERA, A.A.; HU, T.; AARDEMA, M.J.; NASH, J.F. Evaluation of the imidazole antifungal climbazole: Comparison to published results for the azole compounds. **Mutation Research**. v. 672, p. 27 – 39, 2009.

QUINTINO, M.S.M. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil, 2003.

RENOVATO, R.D. O uso de medicamentos no Brasil: uma revisão crítica. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 89, n. 1, p. 64 – 69, 2008.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

ROSA, T.F.; SACZK, A.A.; ZANONI, M.V.B.; STRADIOTTO, N.R. Determinação voltamétrica de nedocromil de sódio utilizando eletrodo de carbono vítreo. **Eclética Química**. v. 28, n.2, p. 63 – 68, 2003.

SAADEDIN, A.; TORRES-MOLINA, F.; CÁRCEL-TRULLOLS, J.; ARAICO, A.; PERIS, J.E. Effect of cytochrome P450 inhibitors (diethyl dithiocarbamate, ketoconazole, and grapefruit juice) on the pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid. **Farmaco**. v. 59, p. 697 – 702, 2004.

SABRY, S.M.; BARACY, M.H.; ABDEL-HAY, M.H.; BELAL, T.S. Adsorptive stripping voltammetric behavior of azomethine group in pyrimidine-containing drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.34, p. 509 – 516, 2004.

SANDERSON, H.; JONHSON, D.J.; REITSMA, T.; BRAIN, R.A.; WILSON, C.J.; SOLOMON, K.R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 39, p. 158 – 183, 2004.

SERRANO, S.H.P.; La-SCALEA, M.A.; GUTZ, I.G.R. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**. v. 22, n. 3, p. 417 – 424, 1999.

SHUMYANTSEVA, V.V.; BULKO, T.V.; RUDAKOV, Y.O.; KUZNETSOVA, G.P.; SAMENKOVA, N.F.; LISITSA, A.V.; KARUZINA, I.I.; ARCHAKOV, A.I. Electrochemical properties of cytochroms P450 using nanostructured electrodes: Direct electron transfer and electro catalysis. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 101, p. 859 – 865, 2007.

SKIBA, M.; LAHIANI-SKIBA, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 198, p. 1 – 6, 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios da Análise Instrumental. 5ª ed. Ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.

SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T. Enzymaltes biosensors: Uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 123 – 128, 2002.

SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T.; MOREIRA, B.A.; DIAS, T.L.I.; LANZA, M.R.V. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**. v. 31, n.7, p. 1755 – 1774, 2008.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**. v. 26, n. 1, p. 81 – 89, 2003.

SRINUBABU, G.; RAJU, C.A.I.; SARATH, N.; KUMAR, P.K.; RAO, J.V.L.N.S. Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceuticals formulation using an experimental design. **Talanta**. v. 71, p. 1424 – 1429, 2007.

STAUB, I.; CRUZ, A.S.; PINTO, T.J.A.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BERGOLD, A.M. Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 2, p. 302 307, 2007.

STEPHANOS, J.J.; FARINA, S.A.; ADDISON, A.W. Iron ligand recognition by monomeric hemoglobins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1295, p. 209 – 221, 1996.

SUAREZ, W.T. Desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de N-acetilcisteína em produtos farmacêuticos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brasil, 2005.

TANAKA, A.A.; CHAVES, J.A.P.; ARAÚJO, M.F.A.; VARELA, J.J.G. Eletrocatalise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina tetracarboxilada de ferro. **Eclética Química**. v. 28, n. 2, p. 9 – 19, 2003.

TURDEAN, G.L.; POPESCU, J.C.; CURULLI, A.; PALLESCHI, G. Iron(III) protoporphyrin IX – single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection. **Electrochimica Acta**. v. 51, p. 6345 – 6641, 2006.

URASE, T.; KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceuticals substances and estrogens in the activated sludge process. **Water Research**. v. 39, p. 1289 – 1300, 2005a.

URASE, T.; KAGAWA, C.; KIKUTA, T. Factors affecting removal of pharmaceuticals substances and estrogens in membrane bioreactors. **Desalination**. v. 178, p. 107 – 113, 2005b.

VERTZONI, M.V.; RAPPAS, C.; ARCHONTAKI, H.A. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection and determination in canine plasma. **Journal Chromatography B**. v. 839, p. 62 – 67, 2006.

VIÇOSA A.L. Estudo da utilização de incrementadores de dissolução para compressão direta: Enfoque no desenvolvimento de medicamentos genéricos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2003.

WANG, J. Analytical Electrochemical. 2^a ed. Ed. Jonh Wiley e Sons, 2000, Canada.