

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

CRISTIANE OLIVEIRA VALENTE

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
A BASE DE HEMINA PARA ANÁLISE DE AMODIAQUINA
EM LEITE MATERNO

São Cristóvão - Sergipe
2010

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
A BASE DE HEMINA PARA ANÁLISE DE AMODIAQUINA
EM LEITE MATERNO**

CRISTIANE OLIVEIRA VALENTE

**Dissertação apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Sergipe como um dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Química.**

ORIENTADORA: Prof^a Dra. MARIA de LARA P. de M. A. BEATRIZ

**São Cristóvão
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

V154d Valente, Cristiane Oliveira
Desenvolvimento de um biossensor a base de hemina para
análise de amodiaquina em leite materno / Cristiane Oliveira
Valente. – São Cristóvão, 2010.
Vii, 66 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-
Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e
Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria de Lara P. de M. A. Beatriz

1. Biossensor. 2. Análise química. 3. Voltametria. 4. Hemina.
5. Amodiaquina. 4. Leite materno. I. Título.

CDU 543.55:612.664.1

***"Aquilo que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano".***

(Isaac Newton)

*À minha filha Giovanna e ao meu
marido Daniel pelo apoio e
incentivo.*

*E aos meus pais Wagner e Maria
pela minha existência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.
- Ao meu marido pela paciência, incentivo e companheirismo.
- Aos meus pais e a minha família, a qual amo muito, pelo carinho e por fazerem parte da minha vida, em particular a minha mãe que me ajudou a dar continuidade a esse mestrado.
- À minha orientadora: PROF^a DRA. MARIA DE LARA P. DE M. A. BEATRIZ pela paciência, me mostrar o caminho da ciência, por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar em mim e no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de profissional e de pessoa a ser seguido.
- Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.
- Aos meus colegas de laboratório que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.
- A todos os colegas e professores da pós-graduação em Química pelo convívio e aprendizado.
- Ao Governo do Estado de Sergipe e a Prefeitura Municipal de Estância pela liberação para a realização deste curso.
- Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse trabalho, os nossos agradecimentos.

Sumário

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABELAS | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS | iv |
| LISTA DE SÍMBOLOS | v |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| I-INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1- A malária e os antimaláricos..... | 1 |
| 1.2- A interação entre os antimaláricos e a hemina | 4 |
| 1.3- Amodiaquina, um antimalárico aminoquinolínico | 7 |
| 1.4 - O uso de antimaláricos durante a lactação | 11 |
| II-FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 13 |
| 2.1-Voltametria | 13 |
| 2.1.1- Voltametria cíclica (VC)..... | 15 |
| 2.1.2 -Voltametria de pulso diferencial (DPV) | 17 |
| 2.1.3- Voltametria de onda quadrada (VOQ) | 18 |
| 2.2- Eletrodos de pasta de carbono modificados | 19 |
| 2.3- Uso da hemina como agente modificador..... | 22 |
| III- OBJETIVO | 24 |
| 3.1- Geral..... | 24 |
| 3.2- Específicos | 24 |
| IV- METODOLOGIA..... | 25 |
| 4.1 - Reagentes e soluções | 25 |
| 4.2 - Instrumentação | 26 |
| 4.3 - Otimização da proporção hemina/grafite..... | 27 |
| 4.4-Montagem dos eletrodos | 27 |
| 4.5- Medidas de pH | 28 |
| 4.6- Medidas espectrofotométricas..... | 28 |
| 4.7- Preparação do biossensor | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.8- Otimização das condições voltamétricas de análise..... | 29 |
| 4.9- Coleta e preparo da amostra de leite materno..... | 29 |
| V- RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| 5.1 Voltametria cíclica | 30 |
| 5.2-Desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos | 32 |
| 5.2.1 -Estudo da porcentagem de hemina na pasta de carbono | 32 |
| 5.2.2 -Influência do pH do meio | 33 |
| 5.2.3-Influência da amplitude | 35 |
| 5.2.4-Influência da velocidade de varredura | 35 |
| 5.2.5-Influência da concentração do analito | 36 |
| 5.3-Voltametria de onda quadrada em biossensor de hemina | 39 |
| 5.3.1- Influência da frequência | 39 |
| 5.3.2- Influência da amplitude | 40 |
| 5.3.3-Influência do incremento de varredura | 41 |
| 5.3.4-Influência da concentração do analito | 42 |
| 5.4- Aplicação da metodologia para determinação de amodiaquina em leite materno | 45 |
| 5.5 - Estudo de interferentes..... | 49 |
| 5.6- Método comparativo: uv-vis..... | 50 |
| VI- CONCLUSÃO..... | 54 |
| VII-REFERÊNCIAS..... | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa mundial de ocorrência de malária..... | 2 |
| Figura 2: Estrutura molecular da amodiaquina..... | 7 |
| Figura 3. (a) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (b) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível..... | 16 |
| Figura 4. 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 S1 e S2 e a diferença entre eles é que é registrada: $I = I_{s2} - I_{s1}$ | 18 |
| Figura 5. Seqüência potencial vs. Tempo (E vs t) usada em Voltametria de onda quadrada | 19 |
| Figura 6. Estrutura química da hemina..... | 22 |
| Figura 7. Célula polarográfica/voltamétrica de três eletrodos. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático..... | 26 |
| Figura 8. Célula eletroquímica utilizada nos ensaios de voltametria, com o eletrodo de trabalho, de referência e o auxiliar, imersos no eletrólito suporte..... | 27 |
| Figura 9. Esquema de construção do biossensor a base de hemina..... | 28 |
| Figura 10. Voltamogramas cíclicos de uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de amodiaquina em solução BR pH 7,0 com velocidade de varredura variando de 20 a 100 mV s^{-1} | 30 |
| Figura 11. Variação da resolução de pico da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes porcentagens de hemina no eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado. $\Delta E = 40 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ | 33 |
| Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs em eletrodo modificado com 10% de hemina. $\Delta E = 40 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ | 34 |
| Figura 13. Intensidade de corrente da amodiaquina em função do pH na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções BR em eletrodo modificado com 10% de hemina. $\Delta E = 40 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ | 34 |

- Figura 14.** Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10% de hemina em função da amplitude $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ 35
- Figura 15.** Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em função da velocidade de varredura em eletrodo modificado com 10% de hemina. $\Delta E = 100 \text{ mV}$ 36
- Figura 16.** Curva analítica da amodiaquina em solução B-R pH 7,0 por voltametria de pulso diferencial. $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ 37
- Figura 17.** Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10% de hemina em função da frequência $\Delta E = 100 \text{ mV}$ $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ 40
- Figura 18.** Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10% de hemina em função da amplitude $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$ 41
- Figura 19.** Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em função da velocidade de varredura em eletrodo modificado com 10% de hemina. $\Delta E = 200 \text{ mV}$ e $F = 150 \text{ Hz}$ 42
- Figura 20.** Curva de calibração obtida para amodiaquina em solução BR pH 7,0 por voltametria de onda quadrada. $F = 150 \text{ Hz}$ $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$ 43
- Figura 21.** Voltamogramas de onda quadrada da determinação de amodiaquina em leite materno em solução BR pH 7,0 com biossensor de hemina. Condições: $F = 150 \text{ Hz}$ $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$ 47
- Figura 22.** Curva analítica da amodiaquina em amostra de leite materno em solução BR pH 7,0 com biossensor de hemina. Condições: $F = 150 \text{ Hz}$ $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$ 48
- Figura 23:** Espectros de absorção para a determinação de amodiaquina em leite materno51
- Figura 24:** Curva analítica para determinação da amodiaquina em leite materno em solução BR pH 6,0 em UV -Vis52

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Principais antimalariais que atuam na inibição da hemozoína..... | 6 |
| Tabela 2. Otimização dos parâmetros da análise de amodiaquina em biossensor de hemina pela técnica de voltametria de pulso diferencial..... | 38 |
| Tabela 3. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para a amodiaquina, utilizando a técnica de pulso diferencial com ECME..... | 39 |
| Tabela 4. Otimização dos parâmetros da análise de amodiaquina em biossensor de hemina pela técnica de voltametria de onda quadrada..... | 44 |
| Tabela 5. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para a amodiaquina, utilizando a técnica de onda quadrada..... | 44 |
| Tabela 6. Resumo dos resultados analíticos obtidos para cada método desenvolvido para a determinação de amodiaquina em biossensor de hemina..... | 44 |
| Tabela 7. Tipos de leite durante a fase de lactação..... | 45 |
| Tabela 8. Composição do leite materno (100mL)..... | 46 |
| Tabela 9. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para determinação de amodiaquina em leite materno, utilizando a técnica de onda quadrada..... | 49 |
| Tabela 10. Resultados analíticos obtidos para o estudo de interferentes de cada composto analisado em biossensor de hemina..... | 50 |
| Tabela 11. Resultados para o estudo de comparação da precisão de métodos usados para a análise de amodiaquina em leite materno..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAP - Academia Americana de Pediatria
AMQ - amodiaquina
ASV - Anodic Stripping Voltammetry
ASV - voltametria de redissolução anódica
BR - Britton Robinson
CE - Condutividade Elétrica
CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-ultravioleta
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CSV - Cathodic Stripping Voltammetry
CSV - voltametria de redissolução catódica
CV- Coeficiente de variação
DAQ - desetilamodiaquina
DDT - Dicloro Difenil Tricloroetano
DME - Eletrodo gotejante de mercúrio
DP- Desvio padrão
ECME - Eletrodo de carbono modificado com hemina
ECS - Eletrodo de Calomelano Saturado
ECV - Eletrodo de Carbono Vítreo
EPC - Eletrodo de Pasta de Carbono
EPCM - Eletrodos de pasta de carbono modificados
EPCME - Eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina
EQM - Eletrodo Quimicamente Modificado
FUNASA - Fundação Nacional da Saúde
GC / MSD - Gas Chromatography / Mass Spectrometry Detector
IPA - incidência parasitária anual
LD - Limite de Detecção
LLE - Liquid / Liquid Extraction
LQ - Limite de Quantificação
MS - Ministério da Saúde
NPV - Voltametria de pulso normal
OMS - Organização Mundial da Saúde
ONU - Organização das Nações Unidas
ppb - Parte por Bilhão
RNA-Ácido ribonucleico
Sb - Desvio padrão
SI - Sistema Internacional
SMDE - Static Mercury Dropping Electrode
SNVS - Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária
SPE - Solid / Phase Extraction
UV-Vis - ultravioleta - visível
VC . Voltametria Cíclica
VOQ - voltametria de onda quadrada
VPD . Voltametria de Pulso Diferencial
WHO - World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

A - Área do eletrodo
a - Ordenada na origem da reta de regressão linear
Ag - Prata
AgCl - Cloreto de prata
b - Coeficiente angular da reta
C - Concentração, mmol L⁻¹ ou mol L⁻¹
D - Coeficiente de difusão das espécies eletroativas
e⁻ - Elétron
E⁰ - Potencial padrão
E_{1/2} - Potencial de meia onda, mV ou V
E_p - Potencial de pico, mV ou V
E_{pc} - Potencial de pico, mV ou V
F - Constante de Faraday, C mol⁻¹
f - Frequência (s⁻¹)
g - gramas
I_{pc} - Corrente de pico, μA ou A
k - Constante
Kcal - quilocalorias
n - Quantidade de matéria de elétrons por mol de substância
N - Número de pontos da curva de calibração
N₂ - Nitrogênio molecular
r - Coeficiente de correlação
t - Intervalo de tempo de queda de uma gota de mercúrio, s
T - Temperatura absoluta, K
v - Velocidade de varredura, mV s⁻¹
ΔE - Amplitude de pulso, mV ou V
% - porcentagem
°C - graus celsius

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação de amodiaquina em leite materno, utilizando um biossensor a base de hemina, uma porfirina presente na hemoglobina e responsável pelo transporte de oxigênio. A amodiaquina, por sua vez, é um derivado 4-aminoquinoquinolínico amplamente utilizada no tratamento da malária, com propriedades antiinflamatória e antipirética. Sua transferência para o leite materno é moderada, porém mesmo em baixas dosagens pode ser considerada prejudicial ao lactante. A caracterização e a preparo do biossensor foi a primeira etapa deste trabalho. O comportamento eletroquímico do biossensor foi explorado pelo emprego da técnica voltametria de pulso diferencial. As melhores respostas voltamétricas foram obtidas com a composição da pasta de carbono contendo 10% de hemina em solução-tampão Britton-Robson de pH 7,0. Para o estudo do comportamento eletródico da amodiaquina foi utilizada a técnica de voltametria cíclica, que apresentou em meio neutro um processo de oxidação em 0,054 V vs. Ag/AgCl na velocidade de 20 mV s⁻¹ em pH 7,0. As técnicas voltamétricas utilizadas para o desenvolvimento da metodologia foram a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada. Nesse estudo as condições otimizadas encontradas foram: pH = 7; velocidade de varredura = 40 mV s⁻¹; amplitude = 200 mV e frequência = 150 Hz, onde os parâmetros indicaram a voltametria de onda quadrada como a melhor técnica para a determinação voltamétrica da amodiaquina por apresentar melhor desempenho. Os limites de detecção e quantificação obtidos na determinação da amodiaquina por voltametria de onda quadrada foram de 8,7 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 2,9 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, respectivamente. Após a otimização de todos os parâmetros relevantes, o método analítico desenvolvido foi aplicado com sucesso em amostras de leite materno. A concentração de amodiaquina analisada foi de 1,7 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. O método desenvolvido mostrou-se eficiente e reprodutível na determinação de amodiaquina presente no leite materno, não sendo necessário qualquer tratamento prévio da amostra.

Palavras-chave: leite materno, amodiaquina, voltametria de onda quadrada, hemina.

ABSTRACT

This research had as main objective to develop an electroanalytical procedure for the determination of amodiaquine in human milk, using a carbon paste electrode modified with hemin, hemoglobin functional group responsible for transporting oxygen. The amodiaquine (a derivative 4-aminoquinoquinolínico) is a drug used to treat malaria with anti-inflammatory and antipyretic properties. The characterization and preparation of carbon paste electrode modified with hemin was investigated. The electrochemical behavior of modified electrode was explored using differential pulse voltammetry. The best voltammetric response was obtained for the composition of carbon paste 10% hemin solution in Britton-Robson buffer pH 7.0. To study the electrochemical behavior of amodiaquine was used the technique of cyclic voltammetry, which presented in a neutral medium oxidation process at 0.054 V vs. Ag / AgCl at a rate of 20 mV s⁻¹. The voltammetric techniques used to develop the methodology where the differential pulse voltammetry and square wave voltammetry. In this study the optimized conditions were: pH 7, scan rate = 40 mV s⁻¹, amplitude = 200 mV and frequency = 150 Hz, where the parameters indicated the square wave voltammetry as the best technique for determining the voltammetric amodiaquine has a minor detection limit. The limits of detection and quantification were obtained in the determination of 8.7 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ and 2.9 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, respectively. After optimization of all relevant parameters, the analytical method developed was successfully applied in samples of breast milk. The concentration of amodiaquine obtained was 1.7 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. The method was efficient and reproducible in the determination of amodiaquine present in breast milk, there is no need any pretreatment of the sample.

Key words: breastfeeding, amodiaquine, square wave voltammetry, hemin

I-INTRODUÇÃO

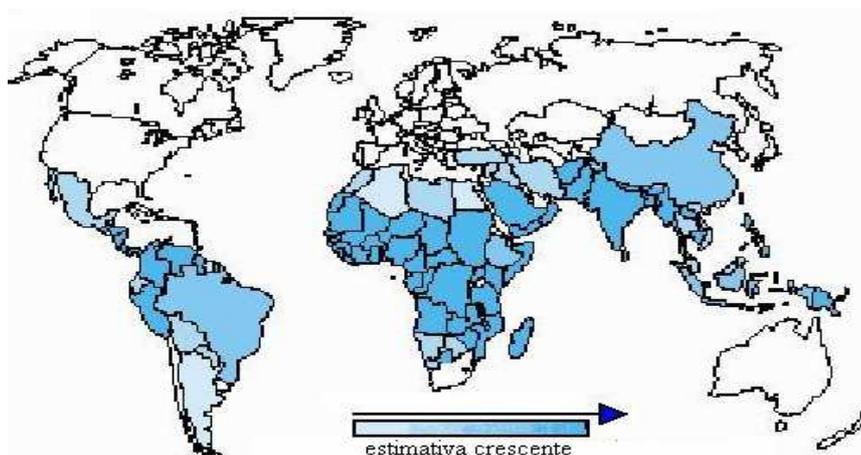
1.1- A malária e os antimaláricos

A malária é considerada uma das doenças tropicais mais devastadoras, sendo a causa de morte de 1 milhão de pessoas por ano. No século XX, a malária foi erradicada de vários países de clima temperado. Entretanto, atualmente ainda continua sendo um dos problemas de saúde coletiva mais importante, pois apesar do grande desenvolvimento científico e tecnológico alcançado pela humanidade, muitos países ainda não conseguiram controlar essa doença, principalmente os países das regiões tropicais e subtropicais, onde ainda se encontram um número considerável de casos.

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* transmitidos ao homem por fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. Somente 4 de aproximadamente 100 espécies desses protozoários são responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale* e *P. malariae*, sendo o *P. falciparum* o mais perigoso de todos os parasitas da malária por causar a forma mais grave dessa doença, a malária cerebral, que aniquila os glóbulos vermelhos do sangue, provocando estados anêmicos, na maioria dos casos levando à morte. É caracterizada por ataques de febre (temperaturas acima de 40 °C) acompanhados por severas dores de cabeça, arrepios, náuseas, algum delírio e dores gástricas (Kasture et al., 1993).

A malária é uma preocupação de dimensões globais, mas com características locais. No Brasil, mais de 60 % do território é favorável à transmissão da malária. No país, a doença é causada por *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e, mais raramente, *P. malariae*. O *P. vivax* é responsável pelo maior número de casos e o *P. falciparum* é responsável pelo maior número de mortes. No Brasil, os programas de controle da malária instituídos na década de cinquenta, foram eficientes e reduziram consideravelmente o número de casos. Vinte anos depois, devido ao desenvolvimento da Região Amazônica impulsionada principalmente pela construção de usinas hidroelétricas e pelo

desenvolvimento de projetos agropecuários incentivados por órgãos governamentais, houve um aumento do número de casos de malária em trabalhadores rurais, garimpeiros e outros tipos de trabalhadores. (Marques, 1987). Nesta época, 97,5% dos casos de malária registrados no Brasil foram oriundos da Região Amazônica (Marques et al., 1982). Segundo Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2008, observou-se uma redução na incidência parasitária anual (IPA) nos estados da Região da Amazônia Brasileira. A letalidade por malária também foi reduzida, assim como a proporção de internações que passou de 3,3% em 1999 para 1,3% em 2008. Fora da Amazônia, o maior número de casos foi observado em Goiás, seguindo-se Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. (Marques et al., 1982). Na década de 90 eram 700 mil novos casos por ano rendendo ao Brasil o título de país das Américas com o maior risco de contaminação por malária (World Health Organization, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 40 % da população mundial está sujeita a contrair malária, A figura abaixo mostra as regiões onde a malária está mais presente (Figura 1).



Fonte: WHO (2003).

Figura 1. Mapa mundial de ocorrência de malária.

Diante desta gravíssima situação, no ano 2000 o Ministério da Saúde intensificou suas ações em parceria com os municípios e estados amazônicos.

Em 2002, observou-se o maior declínio de casos de malária dos últimos 40 anos. Porém, em 2004 constatou-se um aumento da doença no Brasil, com 459.000 casos e esse número continuou a aumentar em 2005. Em 2006, embora tenha havido uma pequena redução em relação a 2005, ainda foram registrados 546.000 casos de malária no Brasil. (World Health Organization, 2005).

A malária passou a chamar a atenção de praticamente todos os países, após relatos de que muitas cepas do protozoário causador da doença têm se tornado resistentes aos medicamentos utilizados atualmente, bem como devido ao aumento do número de casos da doença entre os chamados países de primeiro mundo (Mendis et al., 2001)

Na década de 1950, grande parte das tentativas mundiais de erradicar este flagelo falhou, principalmente, devido ao desenvolvimento da resistência aos agentes antimaláricos (Mendis et al., 2001). Até a 2ª Guerra Mundial, a quinina era o único agente antiparasitário eficaz frente à malária. Após a introdução de derivados sintéticos, a quinina foi descartada. Entretanto, com o aparecimento de cepas resistentes de *Plasmodium*, este fármaco foi reintroduzido. Durante a 2ª Guerra Mundial, as forças aliadas inauguraram um programa de pesquisa de antimaláricos, onde foram desenvolvidos vários fármacos, com destaque para a cloroquina e a primaquina. A cloroquina, uma 4-aminoquinolina, tornou-se, então, o fármaco mais usado empregado no combate a malária (Wolf, 1995).

Desde 1960, a transmissão da malária aumentou em muitas regiões onde a infecção é endêmica. Cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina e a múltiplos agentes disseminaram-se e o grau de resistência medicamentosa aumentou (Mendis et al., 2001). A incidência de resistência a malária por parte do *Plasmodium falciparum*, em relação às drogas antimaláricas, continua a aumentar em grandes áreas do mundo em desenvolvimento e este aumento da resistência às drogas limita a escolha de uma quimioterapia eficaz contra a malária pelo *Plasmodium falciparum*. A resistência é um fator importante a ser considerado, porém a segurança e o custo também limitam o uso destes

compostos. A completa erradicação do mosquito, que é o transportador do *Plasmodium falciparum*, ainda não foi possível. Por conseguinte, a procura de novas drogas antimaláricas potentes vem sendo levada a cabo em todo mundo (Khalil et al., 2000).

O tratamento da malária é longo, complexo e muitas vezes ineficaz devido à reinfecção do paciente, fenômeno muito comum em regiões endêmicas. Isto acontece porque muitas das estratégias consideradas eficazes para o combate a esta doença são pouco acessíveis nos países endêmicos, como a educação da população de risco, a quimioterapia eficiente, o controle do vetor por meio de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas para evitar a infecção (Soares et al., 1998). Somando-se a isso o rápido surgimento de cepas do *Plasmodium falciparum* resistentes aos antimaláricos atualmente disponíveis, a ineficácia das vacinas e o desinteresse das grandes indústrias farmacêuticas em desenvolver fármacos baratos e acessíveis contra a doença, não é difícil entender porque a malária ainda é uma emergência global de saúde pública (Santos Filho, 2000).

1.2- A interação entre os antimaláricos e a hemina

A complexidade do ciclo de vida do parasita explica as dificuldades enfrentadas, ao longo dos tempos, para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. O desenvolvimento de um fármaco antimalárico ideal pressupõe a existência de uma atividade antiparasitária ótima com um mínimo de efeitos adversos para o hospedeiro. No entanto, os vários fármacos antimaláricos que vem sendo desenvolvidos e patenteados ao longo dos anos deram origem a ciclos de esperança seguidos de desilusão, face aos problemas que foram surgindo, em especial a crescente resistência por parte do parasita. A quimioterapia adequada e oportuna da malária é hoje fundamental no controle da doença. Tão importante quanto é o conhecimento das características químicas e farmacológicas dos antimaláricos, é o entendimento

das propriedades farmacocinéticas, eficácia, grau de tolerância e a capacidade de induzir os efeitos tóxicos do parasita. (Page et al., 1999 ; Wilson et al., 2008).

Os antimaláricos podem ser classificados de acordo com as características químicas, farmacológicas, locais de ação no ciclo biológico do parasita. (Wilson et al., 2008).

Os fármacos antimaláricos são eficientes devido ao mecanismo de ação, pois se ligam fortemente a proteínas presentes no sangue, formando complexos que são tóxicos ao parasita. (Peters, 1998 ; Wilson et al., 2008). Quando a forma merozoíta se reproduz assexuadamente dentro das hemácias, os parasitas necessitam de uma enorme quantidade de nutrientes e, por terem capacidade limitada de sintetizar aminoácidos, eles suprem suas necessidades pela degradação da hemoglobina humana. Os parasitas degradam cerca de 75% da hemoglobina dos eritrócitos e a utilizam como fonte alimentar. A hemoglobina é importada para dentro de um compartimento ácido do parasita, conhecido como vacúolo alimentar, e é quebrada por enzimas proteolíticas, chamadas plasmecinas, em peptídeos que, posteriormente, são degradados a aminoácidos (Egan e Marques, 1999). Mais de 80% das hemoglobinas de uma célula infectada podem ser degradadas dessa forma. Durante este processo, que ocorre dentro do vacúolo digestivo do parasita, há também a liberação da hemina, que é tóxica ao parasita, devido a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Para evitar sua toxicidade, a hemina é polimerizada pelo parasita, formando um pigmento cristalino, insolúvel e não tóxico chamado hemozoína. (Wilson et al., 2008). Sem dúvida, a ação deste tipo de drogas está intimamente relacionada à presença de hemina livre que é gerada no interior do vacúolo alimentar do parasita. Além disso, os antimaláricos aminoquinolínicos acumulam-se no interior do vacúolo e são capazes de formar complexos com a hemina e, assim, inibir a formação de hemozoína. (Dorn et al., 1995).

Os antimaláricos quinolínicos, aril-alcoóis e derivados da artemisinina ficam concentrados no vacúolo alimentar (Tabela 1). Existem algumas evidências que a interação entre esses antimaláricos e a hemina esteja envolvida na toxicidade desses fármacos ao parasita. Vários experimentos *in*

vitro estabeleceram que fármacos antimaláricos quinolínicos agem por interferência na cristalização da hemozoína. (Sullivan et al.,1998). Persiste, entretanto, uma divergência sobre como isso ocorre (Egan e Marques, 1999).

Segundo Slater e Cerami,1992 sugeriram que a reação de formação da hemozoína no parasita é catalisada por uma enzima, que seria inibida pelos antimaláricos quinolínicos. Outra hipótese é que os antimaláricos quinolínicos podem inibir a formação de hemozoína, pela interação direta com a hemina. Warhurst, 1981 demonstrou espectroscopicamente que antimaláricos quinolínicos formam, em solução benzênica, complexos com a hemina e que o epímero inativo da quinina, a 9-epiquinina, não forma o complexo. Egan e colaboradores,1994 demonstraram que a cloroquina, quinina e amodiaquina são capazes de inibir a polimerização espontânea da hemina em solução acídica acética, enquanto a 9-epiquinina e outras substâncias inativas na fase eritrocítica da malária não são capazes de inibir.

Tabela 1. Principais antimaláricos que atuam na inibição da hemozoína.

| | |
|-------------------------|--|
| Quinolínicos | Quinina; Mefloquina; Amodiaquina ; Primaquina ; Cloroquina ; Etaquina ; Hidroxicloroquina; Plasmoquina |
| Aril-alcoóis | Halofantrina ;Pironaridina ; Lumefantrina |
| Derivados da Artemisina | Artemeter; Arteeter ;Artemisinina; Artesunato |

Fonte: Rev. Bras. Farm., 89(1), 2008 .

Como a hemina é um dos principais alvos da ação antimalárica. O estudo da amodiaquina e da sua interação com a hemina reveste-se de interesse especial, pois além do objetivo químico da pesquisa, este estudo pode vir a

contribuir para um maior entendimento do mecanismo de ação antimalárica da amodiaquina.

1.3- Amodiaquina, um antimalárico aminoquinolínico

A amodiaquina é um antimalárico de baixo custo, de elevada tolerância e grande eficácia no tratamento da malária *vivax*, e quando usada em associação com a tetraciclina mostra-se ainda com maior atividade que a cloroquina no tratamento da malária *falciparum* (Rieckmann et al., 1972.).

A amodiaquina surgiu em 1945, quimicamente é um composto 4-aminoquinolínico que apresenta massa molecular de 267 g mol^{-1} (Figura 2) e característica de base fraca.

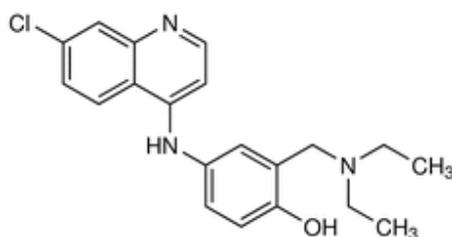


Figura 2. Estrutura molecular da amodiaquina.

A investigação de antimaláricos 4-aminoquinolínicos reveste-se de grande importância, já que a síntese de 4-aminoquinolinas como a cloroquina ou a amodiaquina é fácil e de baixo custo, e estes compostos são, de forma geral, bem tolerados e com níveis de toxicidade aceitáveis para o tratamento da malária aguda.

Adicionalmente, a amodiaquina é eficaz contra determinadas estirpes do parasita resistentes a cloroquina. Este último aspecto justifica o recente interesse no desenvolvimento de novos derivados da amodiaquina, com o intuito conceber novos antimaláricos mais eficientes.

Estudos recentes sobre o tratamento de malária por *P falciparum* sem complicações, realizados durante os últimos dez anos na África, mostrou que a amodiaquina teve uma eficácia terapêutica mais alta que a cloroquina, com uma tendência para restabelecimento clínico mais rápido. Esta diferença também foi observada em zonas com resistência à cloroquina fraca ou moderada (Brasseur *et al.*, 1999). Contudo, alguns países têm continuado a utilizá-la no tratamento de malária sem complicações e não tem havido notificações de casos graves.

Recentemente, a amodiaquina foi reclassificada como pró-fármaco, pois após a administração oral, a amodiaquina é rápida e extensamente metabolizada dando origem aos derivados farmacologicamente ativos, como a “desetilamodiaquina” (DAQ), por perda de um grupo *N*-etila, e ao metabólito secundário 2-hidroxi-amodiaquina, sendo ambos eliminados por excreção renal (Gião, 2001), que provavelmente é a responsável pela maior parte do efeito terapêutico (Winstanley *et al.*,1990). Em contraste com outros antimaláricos, a amodiaquina acumulada nos neutrófilos humanos dá origem a um metabólito eletrofílico que contribui para a diminuição dos níveis de glutathione (antioxidante hidrossolúvel), resultando, portanto, numa maior toxicidade (Naisbitt,1997).

A redução da toxicidade da amodiaquina tem sido estudada nos últimos anos, objetivando o desenvolvimento de novos derivados da amodiaquina. Uma outra abordagem, bastante recente, baseia-se na combinação da amodiaquina, ou do seu metabólito ativo desetilamodiaquina, com outros agentes antimaláricos, como a artemisinina ou antifolatos (Mariga,,2005; Gupta *et al.*,2002).

Pesquisas realizadas revelam a presença de amodiaquina em medicamentos e em amostras biológicas. A amodiaquina e seus metabólitos foram detectados em plasma humano, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (Lindegandh *et. al.* 2002). A presença de amodiaquina em amostras de sangue capilar, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e extração em fase sólida em amostras biológicas foi investigada por Minzi *et al.* (2003) e em urina por Pussard *et al.*, (1986). Minzi *et al.*, 2003, utilizando a

técnica de cromatografia líquida determinou amodiaquina, cloraquina e seus metabólicos em amostras de sangue, plasma e urina. O limite de quantificação foi de 10nm para todos os compostos.

O método desenvolvido por Pussard et al., 1986, determinou a quantidade de amodiaquina e desetilamodiaquina simultaneamente em fluidos biológicos com um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Foi determinada também a presença da amodiaquina e seus metabólicos em amostras de sangue utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica, apresentando um limite de determinação de $3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (Mount, 1986). Em medicamentos o derivado da amodiaquina obtido pela reação com periodato foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular por Verma et al.,1990. Vários métodos têm sido descritos para a quantificação simultânea da amodiaquina e seu principal metabólico em amostras biológicas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica. O limite de quantificação dos métodos foram de $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para amodiaquina e $200,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para desetilamodiaquina(Dua et al., 2004). No estudo de Mount, 1986, a técnica de cromatografia líquida com detecção eletroquímica oxidativa foi usada para a quantificação da amodiaquina em drogas antimaláricas e três dos seus metabólicos no sangue humano. O método foi constituído por uma etapa de extração e apresentou limites de detecção de $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para amodiaquina e $3,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para seus metabólicos.

Ansari e colaboradores, 2008, desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação da amodiaquina e sulfadoxina, em sua forma pura, e em formulações farmacêuticas. Estas espécies apresentaram um máximo de absorção a 505 nm para a amodiaquina e em 470 nm para a sulfadoxina com absortividade molar de $6,83 \times 10^4$ e $3,74 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

A importância da determinação analítica de pequenas quantidades de compostos antimaláricos em meio biológico tem proporcionado o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas. Dentre estas, as técnicas eletroanalíticas têm mostrado excelentes resultados.

Pacheco, 2004, desenvolveu um método eletroanalítico baseado na voltametria adsortiva de redissolução catódica com varredura de potencial de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação do ciclofenil em urina e em formulações farmacêuticas, e na voltametria anódica com varredura de potencial de onda quadrada e de pulso diferencial para a determinação da primaquina em formulações farmacêuticas, utilizando eletrodo de carbono vítreo e a técnica de pulso diferencial. A primaquina foi determinada em formulações farmacêuticas com recuperação média de 101,7 %, e limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Anca et al., (2005) em seu artigo descreveram a determinação voltamétrica de pulso diferencial da 8- aminoquinolina usando eletrodo de carbono, onde foi possível determinar a 8- aminoquinolinica na concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ quando em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_3PO_4 , e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH , foi alcançado o limite de determinação de $2 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ usando voltametria adsortiva.

Zima et al., 2006, realizaram a determinação voltamétrica de aminoquinolínicos usando eletrodo de pasta de carbono. As condições ótimas foram encontradas por voltametria de pulso diferencial e voltametria adsortiva de pulso diferencial. Os menores limites de determinação foram encontrados para voltametria adsortiva de pulso diferencial em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$, $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para 5-aminoquinolina, 6- aminoquinolina e 3-aminoquinolina, respectivamente.

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do método eletroanalítico a ser desenvolvido neste trabalho, optou-se pelo emprego do leite materno como matriz biológica.

1.4 - O uso de antimaláricos durante a lactação

Os fármacos utilizados durante a lactação podem ser classificados como seguros, moderadamente seguros e inseguros. Deste modo, publicações sobre drogas e aleitamento materno são regularmente disponibilizadas pelo Ministério da Saúde (2000), pela Academia Americana de Pediatria (AAP) (2001) e pela OMS (2007), entre outros, com o intuito de orientar os profissionais de saúde, tendo em vista que muitos fármacos podem ser transferidos do plasma para o leite, podendo chegar ao lactante em concentrações tóxicas. (Chaves et al., 2004). Porém, face à dinâmica do conhecimento e do surgimento de novas drogas, as informações necessitam ser atualizadas constantemente para proporcionar maior segurança para o médico clínico, obstetra e pediatra, que, em geral, prestam assistência à mulher lactante. Com o avanço do conhecimento científico e da terapêutica, novos medicamentos surgem a cada dia no mercado. Novos fármacos são, portanto, prescritos também para mulheres em amamentação, aumentando o risco de desmame por desconhecimento do clínico a respeito da segurança do seu emprego. (Ito, 2000).

É imprescindível o conhecimento dos fatores que determinam a segurança para o seu uso nesse período. Tais fatores podem estar relacionados com os aspectos metabólicos e fisiológicos do leite humano, com a mulher, com o lactente ou com o fármaco. A composição do leite materno varia conforme a fase da lactação (colostró *versus* leite maduro) ou até mesmo durante uma mamada (leite anterior *versus* leite posterior). Tais alterações influenciam na extensão da transferência de fármacos do plasma para o leite, causando variações nas concentrações dos mesmos no leite materno (Begg et al., 2002 ; Hale, 2004).

A via pela qual o fármaco é administrado à mãe tem importância devido aos níveis alcançados no plasma materno e, posteriormente, no leite humano. Desta forma, muitos fármacos administrados topicamente ou inalados não atingem níveis plasmáticos significativos, possuindo níveis lácteos não

mensuráveis. Muitos antibióticos, corticosteróides e retinóides, aplicados em áreas restritas, são pouco absorvidos por via transcutânea e praticamente indetectáveis no plasma (Hale, 2004).

A idade do lactente tem sido apontada como uma das mais importantes variáveis a ser considerada no momento de determinar a segurança do fármaco para uso durante a lactação. Estudos de revisão sobre efeitos adversos em lactentes de medicamentos utilizados pelas mães mostraram o risco mais elevado de reações nos lactantes de dois meses (78%). Apenas 4% das reações ocorreram em lactentes maiores de seis meses, período de maior maturidade metabólica hepática e de menor ingestão láctea devido à alimentação complementar (Anderson et al., 2003). Porém, Hale (2004) classifica o risco de efeitos adversos para o lactente segundo a idade como: baixo risco (seis a 18 meses), risco moderado (dois a seis meses) e alto risco (prematuros, recém-nascidos, lactentes clinicamente instáveis ou com função renal debilitada).

Em relação aos antimaláricos, ainda que não existam muitos relatos sobre o seu uso na lactação, a quantidade desta substância excretada no leite materno é pequena, pelo que os autores entendem que, em geral, antimaláricos devem ser mantidos durante a amamentação. (Chalumeau et al., 2005 ; Ito et al., 2000).

Contudo, o uso de algumas drogas antimaláricas como, a amodiaquina na amamentação deve ser criterioso, por ser excretada no leite materno. A quimioprofilaxia da amodiaquina foi associada a uma grave toxicidade como agranulocitose e insuficiência hepática, mas a disponibilidade de informação sobre a segurança e tolerabilidade de amodiaquina durante a lactação é muito limitado. Atualmente, a amodiaquina está classificada como fármaco moderadamente seguro para lactentes.

Segundo Begg et al. 2002, os medicamentos que têm massa molecular baixa são mais facilmente transferidos para o leite materno do que aqueles com elevada massa molecular.

II-FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1-Voltametria

O desenvolvimento de metodologias analíticas sempre teve um papel de destaque nas diferentes áreas do conhecimento, sempre com ênfase nas determinações de espécies químicas em meios “reais”, mais especificamente em amostras ambientais, alimentícias e biológicas.

A eletroquímica moderna tem sido empregada como uma ferramenta poderosa na análise de fluidos biológicos como soro sanguíneo, urina, lágrima, onde podemos destacar exemplos clássicos como a análise voltamétrica de glucose, glutamato e uma infinidade de fármacos. Uma das características importantes das técnicas eletroquímicas é a possibilidade de sua aplicação ao estudo de fármacos que possuam como característica de sua ação biológica o envolvimento de processos de transferência de carga. Nesse sentido, as informações obtidas por meio dessas técnicas podem exercer papel relevante para a compreensão do mecanismo de ação desses fármacos (Abreu et al., 2002).

Além disso, os métodos eletroquímicos têm se destacado nos últimos tempos devido à possibilidade de se conferir um alto grau de seletividade às medidas por meio da utilização de sensores especialmente desenvolvidos (Kenneth, et al., 2006 e Randhir, et al., 2004). Este tipo de dispositivo pode ser utilizado diretamente no produto a ser analisado, eliminando-se etapas de elevado custo e demoradas de tratamento de amostra. Além disso, os métodos eletroquímicos podem ser classificados como tendo baixo custo, curto tempo de análise, e alta sensibilidade, quando comparado a outros métodos analíticos.

Dos métodos eletroquímicos disponíveis, a voltametria, nas suas diversas formas, é talvez a técnica mais versátil e efetiva para estudar sistemas de oxidação/redução, além de ser bastante útil em eletroanálise.

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroquímicos nos quais as informações sobre o analito são obtidas por meio de medidas de

correntes em função do potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo indicador ou de trabalho. (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 (se polariza) enquanto que o de referência mantém seu potencial constante (não polariza). Isso ocorre em decorrência dos eletrodos apresentarem áreas superficiais de tamanhos diferentes.

A voltametria é amplamente utilizada pelos químicos inorgânicos, físico-químicos, bioquímicos entre outros, para realizar estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção em superfícies, 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, o desenvolvimento e aperfeiçoamento das várias técnicas voltamétricas tem possibilitado a sua utilização principalmente em análises ambientais e em fluidos biológicos. Algumas destas características podem-se citar:

- O desenvolvimento de equipamentos mais resistentes, sensores capazes e microeletrodos que monitoram por um longo período de tempo;

- O desenvolvimento de conceitos específicos que permitem a interpretação corretamente dos sinais voltamétricos desses sensores em termos da especiação dos metais;
- O desenvolvimento da eletrônica, com a produção de aparelhos mais compactos, de baixo custo e de fácil automação. (Buffle e Waeber 2005).

2.1.1- Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais empregadas na caracterização de um processo eletródico, nela registra-se a resposta da corrente de um eletrodo estacionário e pequeno em uma solução sem agitação quando este é excitado por uma onda triangular de potencial. O potencial varia linearmente em uma direção até um dado valor, então, a direção da varredura é invertida e o potencial volta ao valor inicial aplicado, como mostra a Figura 3 (a). Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O intervalo de potenciais de inversão escolhido para um dado experimento é aquele no qual ocorre a oxidação ou a redução controlada por difusão de um ou mais analitos. A direção da varredura inicial pode ser tanto negativa como positiva, dependendo da composição da amostra (Skoog et al., 2002).

Dependendo da informação requerida, pode ser utilizado um ciclo único ou múltiplos ciclos. Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado. O voltamograma é a corrente versus o potencial como mostra a Figura 3 (b) (Wang, 2001). Na prática utilizam-se velocidades de varredura (v) que variam desde 10 mV s^{-1} até 10 kV s^{-1} , sendo mais comum trabalhar entre 20 e 200 mV s^{-1} (Ticianelli e Gonzalez, 1998).

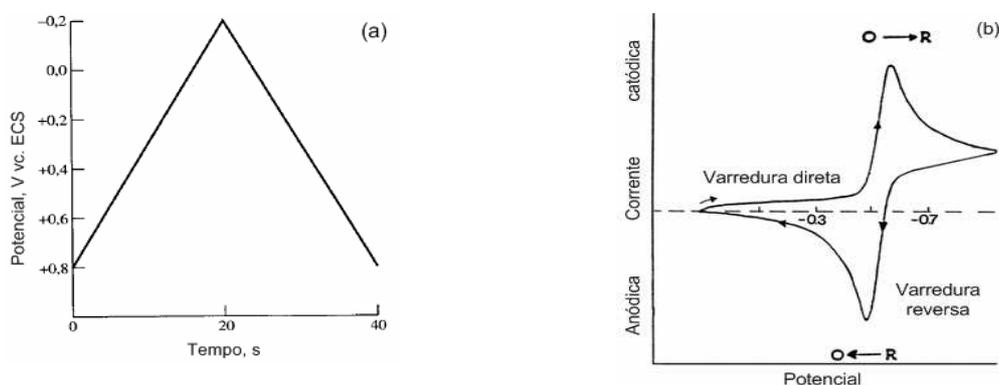


Figura 3. (a) Sinal de excitação para a voltametria cíclica e, (b) Voltamograma cíclico para um processo redox reversível (Skoog et al., 2002, Wang, 2001).

A Figura 3 (b) ilustra a resposta esperada para um par redox reversível durante um único ciclo de potencial. Inicialmente considera-se que somente a espécie oxidada (O) está presente. Uma varredura de potencial na direção negativa é escolhida para o primeiro meio ciclo, começando em um valor onde não ocorre redução. Conforme o potencial aplicado se aproxima do potencial padrão (E^0) característico para o processo redox, a corrente catódica começa a aumentar, até que um pico é alcançado. Após atravessar a região de potencial em que ocorre o processo de redução, a direção da varredura do potencial é invertida. Durante a varredura reversa, as moléculas de espécies reduzidas (R) (geradas no meio ciclo inicial e acumuladas próximo à superfície) são reoxidadas novamente resultando em um pico anódico (Wang, 2001).

Os parâmetros importantes em um voltamograma cíclico são: o potencial de pico catódico, o potencial de pico anódico, a corrente de pico catódico e a corrente de pico anódico. Para uma reação reversível de eletrodo, as correntes de pico catódico e anódico são aproximadamente iguais em valor absoluto, mas de sinais opostos e a diferença entre os potenciais de pico é $0,059/n$ para 25°C , onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação (Skoog et al., 2002).

2.1.2 -Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação entre a corrente faradaica e a corrente 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 modalidade de medição voltamétrica foi introduzida por Barker e Jenkin em 1953. Tem como objetivo diminuir o limite de detecção das medidas voltamétricas pelo substancial aumento da discriminação entre a corrente faradaica e não faradaica, permitindo uma quantificação em níveis abaixo de 10^{-8} mol L⁻¹. (Wang; 2000).

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.

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 definida pela varredura de potencial utilizado. O pulso aplicado é de pequena amplitude (10 a 100 mV) e é imposto durante 50 a 60 ms perto do final da vida da gota. 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 próximo ao final do tempo de vida de gota (S_2). O valor final da corrente é a diferença entre esses dois valores medidos. (Aleixo acesso 2009).

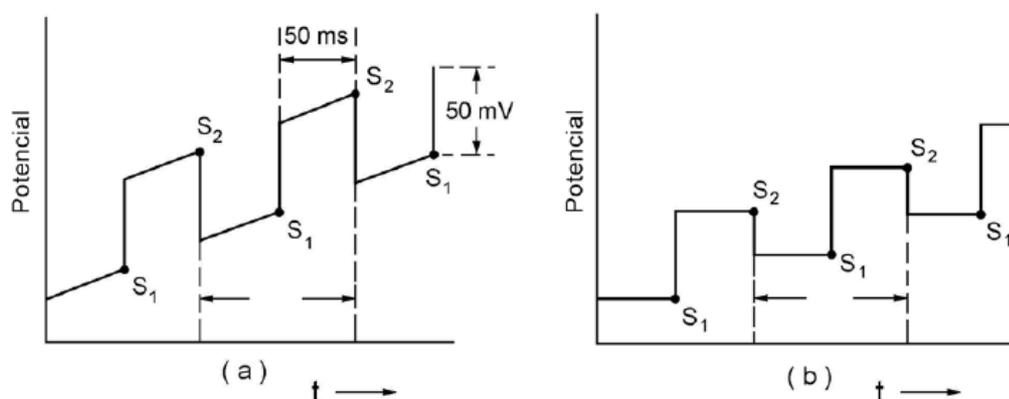


Figura 4. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial. (a) Em instrumentos analógicos; (b) Em instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S1 e S2 e a diferença entre eles é que é registrada: $I = I_{s2} - I_{s1}$. (Aleixo acesso 2009).

Uma vantagem do voltamograma de pulso diferencial é que os 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 da voltametria linear e da voltametria 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 voltametria de pulso diferencial são de duas ou três ordens de magnitude mais baixa do que a voltametria linear e caem no intervalo de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. (Skoog et. al., 2002). Com isso observa-se que esta técnica é extremamente usada para medidas de traços de espécies orgânicas e inorgânicas. (Wang, 2000).

2.1.3- Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

A voltametria de pulso diferencial é a técnica mais usada presentemente para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detectabilidade e a resolução frente as 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 de varredura rápida. (Aleixo acesso 2009).

A voltametria de onda quadrada consiste de uma onda quadrada simétrica, superposta por uma base potencial em forma de escada, quando aplicadas no eletrodo de trabalho. (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 elevada velocidade de varredura de potencial que pode ser empregada satisfatoriamente (Skoog et. al.,2002 e Wang, 2000).

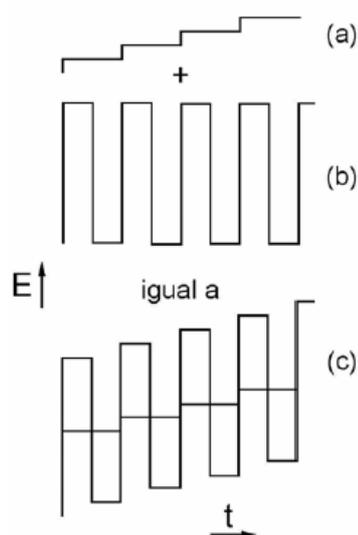


Figura 5. Seqüência potencial vs. Tempo (E vs t) usada em voltametria de onda quadrada. (Aleixo acesso 2009).

2.2- Eletrodos de pasta de carbono modificados

Uma das áreas de maior crescimento na Química Analítica é o de desenvolvimento de sensores eletroquímicos que apresentem melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de diversos interesses, pois tais dispositivos têm sido empregados na análise de um grande

número de substâncias de interesse clínico, biológico, ambiental e industrial (Suzuki, 2000, Svancara et al, 2001). Uma área que oferece grande potencial de aplicação e eficiência dos sensores eletroquímicos é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM). (Pereira et al; 2002).

A modificação química de eletrodos é um campo de interesse crescente na química analítica. Tendo sido demonstrado ao longo dos tempos, que eletrodos modificados possuem vantagens distintas em relação aos eletrodos convencionais em muitas áreas de aplicação.(Luz et al., 2004)

O desenvolvimento de eletrodos modificados é um ramo que envolve todas as áreas da química, desde o estudo físico-químico do material a ser utilizado no eletrodo até o estudo sistemático da resposta frente a um analito escolhido.

O material a ser escolhido para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá modificação, é um aspecto muito importante na preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. (Luz et al., 2004)

Eletrodos modificados são utilizados numa busca constante por maior sensibilidade, estabilidade e seletividade. O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi concebido há muito tempo atrás (Moses et al., 1975) e designa eletrodos com espécies quimicamente ativas adequadamente imobilizadas na superfície de tais dispositivos. Tem esse procedimento o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução. Sendo assim, a reatividade e/ou seletividade do substrato são alteradas, possibilitando o desenvolvimento de sensores para vários fins e aplicações, incluindo eletroanálise, estudos de eletrocatalise, de cinética de transferência de elétrons, de permeação de membranas, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica (Luz et al. 2005). A modificação de eletrodos pode ser conduzida seguindo diversos caminhos (Pereira et al. 2002). Um dos métodos ainda muito utilizados se baseia na modificação de eletrodos à base de carbono (pasta de carbono, grafite-epóxi, pastilhas, etc) mediante mistura do agente modificador com o substrato do eletrodo (grafite, negro de carbono, etc).

Quando possível, a mistura do carbono em pó com a solução do modificador é feita para obter uma distribuição mais homogênea do último, após evaporação do solvente. Também pode ocorrer perda gradual do modificador para o meio, prejudicando a reprodutibilidade. Já os biossensores são usualmente definidos como dispositivos sensíveis que consistem em um elemento biológico que em contato íntimo com uma espécie emitem um sinal, proveniente de um processo biológico ou biocatalítico, sendo este sinal em seguida quantificado (Freire et al., 2003).

Eletrodos de pasta de carbono (EPC) são apropriados para o desenvolvimento de biossensores, possuindo baixa corrente de fundo mesmo em grandes variações de potencial quando comparado com outros eletrodos sólidos. A espécie química imobilizada na pasta de carbono oferece muitas vantagens sobre os outros eletrodos, pois sua preparação é simples, de baixo custo, e, além disso, o uso do eletrodo é extremamente fácil (Kalcher et al., 1995).

No processo eletroquímico o analito de interesse interage com a superfície eletródica, resultando na transferência de elétrons. Entretanto, se a transferência é muito lenta, ou não ocorre, ou ocorre em um valor de potencial fora do intervalo de potencial do eletrodo, é possível realizar uma modificação na superfície eletródica a fim de melhorar a resposta final, onde o analito irá interagir diretamente com o agente modificante (Galli et al., 2006).

O emprego de detectores eletroquímicos em voltametria é crescente. Houve um grande desenvolvimento de sensores baseados em materiais eletródicos para sistemas de fluxo. Tais sistemas oferecem respostas voltamétricas rápidas e possibilidade de monitoramento contínuo resultantes das características hidrodinâmicas (Stulik,1987; Fleet et al.,1989).

A principal vantagem dos EPCM preparados por adição direta com relação a eletrodos sólidos, em estudos voltamétricos, é o procedimento simples de preparação de uma nova superfície, que não é afetada pela “história prévia” do eletrodo. (Pereira et al., 2002).

2.3- Uso da hemina como agente modificador

A hemina, a ser empregada como agente modificador, é um grupo funcional encontrado na proteína do sangue, hemoglobina; a qual confere a cor vermelha ao sangue, tem o importante papel da captação de oxigênio pela molécula de hemoglobina. A hemina apresenta uma parte orgânica e um átomo de ferro. A parte orgânica, denominada protoporfirina IX, é formada por um anel tetrapirrólico e o ferro está ligado no centro deste anel (Ponka,1999).

A hemina (Figura 6) desempenha várias funções biológicas determinadas em parte pelo polipeptídeo associado a ele. A hemina livre induz estresse oxidativo e tem diversas propriedades pró-inflamatórias (Wagener et al., 2003). O mecanismo molecular envolvido nos efeitos inflamatórios da hemina é atribuído à sua natureza anfipática e ao seu efeito pró-oxidante, através da geração de espécies reativas de oxigênio. (Balla et al., 2000 ; Wagener et al., 2003).

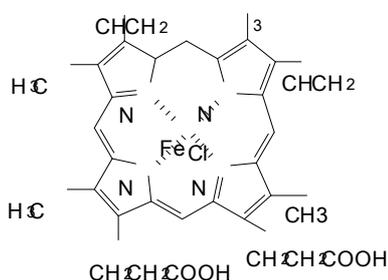


Figura 6. Estrutura química da hemina

Chen e colaboradores, 1997, fizeram um estudo da redução eletrocatalítica da artemisinina com a hemina, utilizando um eletrodo de carbono vítreo. Na presença de concentrações baixas de hemina como 8×10^{-8} mol/L, a redução ocorre em -0,54 V, com uma diminuição do potencial catódico igual a 640 mV.

Chen e colaboradores, 1998 investigaram a interação do artesunato com hemina por métodos eletroquímicos e espectroeletroquímicos ultravioleta. O Artesunato sofreu uma redução totalmente irreversível a -1,27 V (vs Ag/AgCl),

utilizando um eletrodo de carbono vítreo. A hemina pode catalisar a decomposição do artesunato. Na presença de baixas concentrações de hemina como 2×10^{-8} mol/L, o sobrepotencial catódico do artesunato foi reduzido em 680 mV ($E_{pc} = -0,59$ V versus Ag/AgCl). Experimentos de espectrofotometria de ultravioleta confirmaram o processo catalítico. Estes resultados indicaram que o artesunato pode seguir por um caminho metabólico similar ao de outros antimaláricos, mostrando que a hemina desempenha um papel catalisador no processo de ação em diversos tipos de drogas antimaláricas.

Pesquisas realizadas revelam que o eletrodo modificado com hemina foi elaborado e aplicado para a determinação eletroquímica de superóxido. A taxa constante de transferência de elétrons heterogênea de hemina adsorvida foi determinada por voltametria cíclica (CV) a 15 s^{-1} . O eletrodo foi aplicado para detectar radicais superóxido produzido pela xantina oxidase (XOD) catalisada pela oxidação da hipoxantina. (Chen et al., 2000).

Nan e seus colaboradores, 2002 investigaram o comportamento eletroquímico do triptofano e seus derivados, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com hemina. Os resultados desenvolvidos por voltametria de pulso diferencial mostraram que o eletrodo de hemina catalisa a oxidação eletroquímica do triptofano e seus derivados. Entretanto, a reação eletroquímica destes compostos na superfície de um eletrodo modificado com hemina tem sido investigada e os resultados indicaram que o mecanismo eletródico envolve a transferência de um elétron e dois prótons.

Zheng e colaboradores, 2002 investigaram a redução eletrocatalítica do oxigênio utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina. O eletrodo foi construído por um método simples, rápido e eficaz. O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi caracterizado por voltametria cíclica. O eletrodo modificado obtido foi muito estável e apresentou resposta eletrocatalítica para a redução do oxigênio.

III- OBJETIVO

3.1- Geral

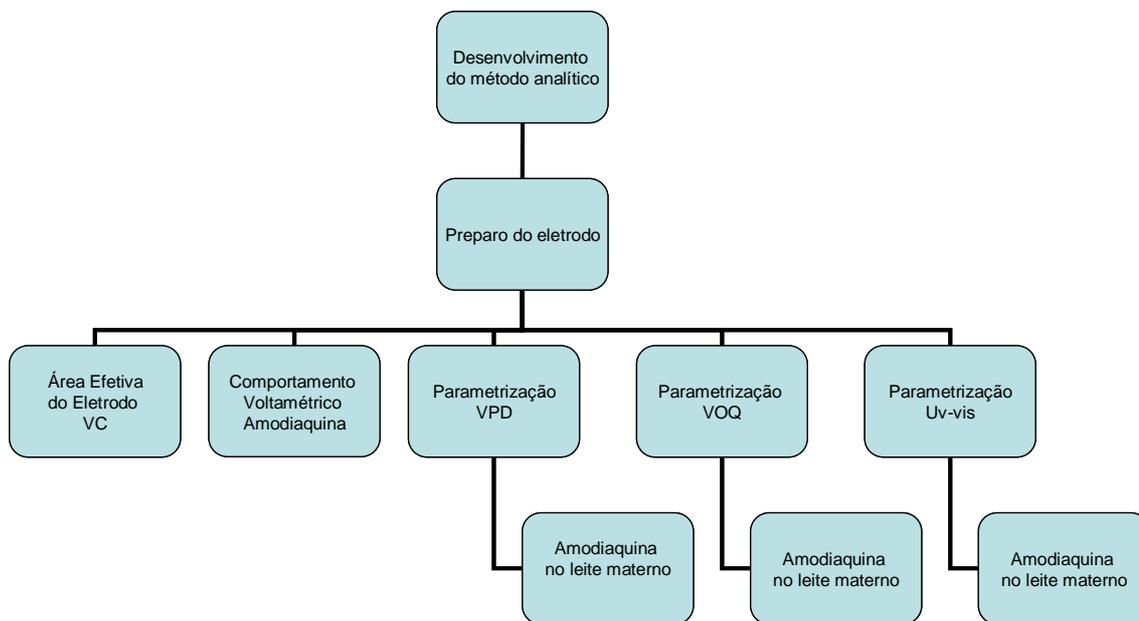
- O objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação de amodiaquina utilizando um biossensor a base de hemina, empregando as técnicas de voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

3.2- Específicos

- Preparar eletrodos de pasta de carbono modificados com hemina;
- Caracterizar eletroquimicamente o eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina;
- Desenvolver metodologias voltamétricas para análise de amodiaquina empregando estes eletrodos.
- Verificar a aplicação do biossensor na determinação de amodiaquina em leite materno.
- Validar o método desenvolvido.

IV- METODOLOGIA

A metodologia eletroanalítica empregada segue genericamente o organograma abaixo.



4.1 - Reagentes e soluções

Para desenvolvimento da metodologia eletroanalítica foram preparadas soluções estoque de amodiaquina na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa, as quais foram preparadas diariamente antes de cada análise.

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando como eletrólito suporte 5,0 mL de soluções-tampão BR (Britton-Robinson) com pHs variando entre 2 e 12 e partindo de uma solução-estoque preparada da seguinte forma:

- 1) Solução ácida: solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido bórico, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico;
- 2) Solução básica: solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio.

Os valores de pH foram obtidos a partir da mudança na proporção entre a solução ácida (solução 1) e a solução básica (solução 2), podendo variar entre 2 e 12.

As soluções foram preparadas utilizando água purificada com o sistema Milli-Q (Millipore Inc.). As soluções de trabalho foram desoxigenadas borbulhando nitrogênio durante 10 min antes de cada análise na célula eletrolítica, para remoção do oxigênio molecular eletroativo dissolvido na solução antes das medidas serem realizadas.

4.2 - Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 30 da Ecochemie, acoplado a um microcomputador que registra e armazena os dados obtidos, usando o programa de controle GPES. Os dispositivos instrumentais seguem o arranjo esquematizado conforme abaixo.

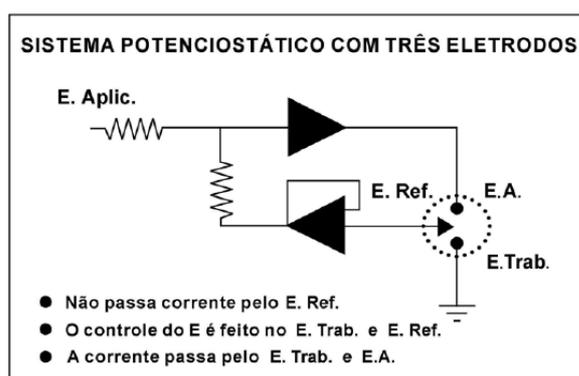


Figura 7. Célula voltamétrica de três eletrodos. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático. (Aleixo acesso 2009).

As medidas foram realizadas por técnicas voltamétricas. A figura 8 mostra o sistema utilizado que consiste de uma cela eletroquímica com capacidade para 5 mL, modelo: VA Stand 663 da Metrohm utilizando o biossensor de hemina como eletrodo de trabalho, um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl, como referência.

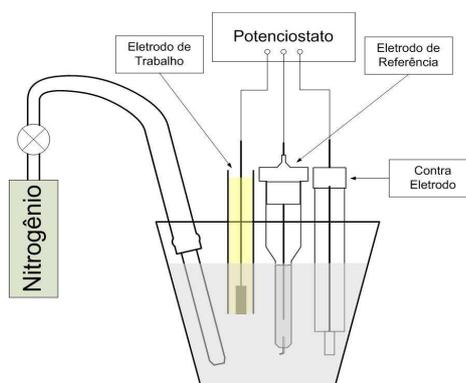


Figura 8 – Célula eletroquímica utilizada nos ensaios de voltametria, com o eletrodo de trabalho, de referência e o auxiliar, imersos no eletrólito suporte.

Soluções contendo amodiaquina foram preparadas com tampão Britton-Robinson. Além disso, a solução foi purgada com nitrogênio durante alguns minutos antes de cada análise, para remoção do oxigênio dissolvido.

4.3 – Otimização da proporção hemina/grafite

As pastas de carbono modificadas foram preparadas em diferentes proporções em massa de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de hemina. A pasta de carbono foi preparada, pesando-se o carbono e misturando-se com óleo mineral. Em seguida, a porcentagem de hemina foi acrescentada como modificador e cada pasta foi homogeneizada em almofariz por cerca de 20 minutos. Estas pastas foram armazenadas em recipientes ao abrigo da luz.

4.4-Montagem dos eletrodos

Os eletrodos foram confeccionados em laboratório pelo preenchimento de um tubo plástico com as pastas de carbono modificadas e introduzindo uma haste de platina para o contato elétrico externo. A figura 9 mostra o esquema de construção do eletrodo.



Figura 9. Esquema de construção do biossensor a base de hemina.

4.5- Medidas de pH

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro da marca Analion, modelo PM 608.

4.6- Medidas Espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas na região do ultravioleta/visível foram realizadas com o auxílio de um aparelho da Biochrom modelo Libra S12, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

4.7- Preparação do biossensor

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, a pasta foi homogeneizada com óleo mineral e compactada em uma ponteira, sendo o contato elétrico mantido por um fio de platina. A renovação da superfície foi obtida por substituição da pasta após cada voltamograma. A altura do depósito foi de 0,3 cm e a área geométrica foi de 0,1 cm².

Para a determinação eletroanalítica, as técnicas de voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada foram empregadas. Para tanto, foram avaliados os parâmetros relativos à estas técnicas, tais como: amplitude

e velocidade de varredura de potencial, o efeito do pH do meio e da concentração do analito.

Os eletrodos de pasta de carbono foram preparados pela mistura mecânica do aglutinante com grafite em pó e a hemina em um almofariz por 30 min (Kissinger, 1996). A pasta de carbono modificada com hemina foi inserida em uma das extremidades de um tubo plástico ($\varnothing = 0,1$ cm) e então compactada com uma haste de platina formando o contato elétrico. A superfície do eletrodo foi uniformizada pelo polimento com papel de filtro.

4.8- Otimização das condições voltamétricas de análise

Nas determinações voltamétricas, alíquotas de 5,0 mL de solução tampão B-R 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. Vários voltamogramas foram realizados para a otimização dos parâmetros de análise: velocidade de varredura, frequência, amplitude de pulso e pH.

Posteriormente foram realizados estudos da dependência da corrente de pico catódico em função da concentração de amodiaquina no intervalo de 10^{-5} até 10^{-4} mol L⁻¹. Uma curva de calibração foi construída e a linearidade da faixa foi avaliada através do coeficiente de correlação linear obtido.

4.9- Coleta e preparo da amostra de leite materno

As amostras de leite materno utilizadas na aplicação do método desenvolvido foram coletadas diariamente antes de cada análise no período matutino e armazenadas sob resfriamento a 10°C. Para a coleta do leite materno foi utilizada uma bomba de sucção, previamente descontaminada. Para a determinação voltamétrica da amodiaquina, as amostras foram enriquecidas com amodiaquina na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

V-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma ferramenta analítica importante para o estudo de mecanismos de velocidades de processos de oxidação/redução. Trata-se da primeira técnica selecionada para investigação de um sistema que pode ser tratado eletroquimicamente e normalmente revela a presença de intermediários em reações de oxidação/redução.

A figura 10 apresenta o efeito da velocidade de varredura de potenciais de 20, 40, 60, 80 e 100 mV s^{-1} sobre a resposta voltamétrica do biossensor contendo 10 % da hemina como agente modificador em solução tampão BR- pH 7,0 para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de amodiaquina.

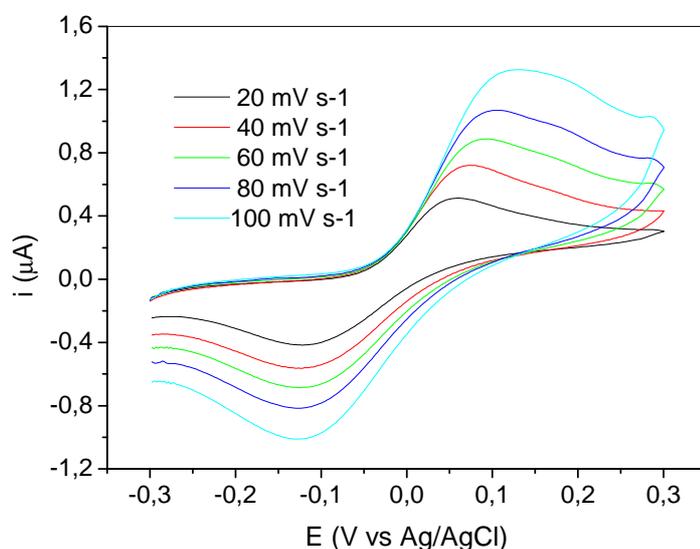


Figura 10. Voltamogramas cíclicos de uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de amodiaquina em solução BR pH 7,0 com velocidade de varredura variando de 20 a 100 mV s^{-1} .

Após sucessivas varreduras de potencial no intervalo de $-0,3$ a $0,3$ V. Os voltamogramas registrados na figura 10 mostram um aumento e um pequeno deslocamento dos picos anódicos e catódicos, à medida que a velocidade de varredura também aumenta.

Usando o eletrodo de hemina, a amodiaquina apresentou um processo de oxidação e outro de redução em uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em pH 7,0. O pico de oxidação é verificado aproximadamente em $0,054$ V e pico de redução em $-0,11$ V vs. Ag/AgCl na velocidade de 20 mV s⁻¹ e tende ao distanciamento, a separação dos picos é muito maior do que 60 mV que é o valor esperado para sistemas reversíveis e sem reações homogêneas acopladas a transferência eletrônica.

O aumento da velocidade de varredura, nos permitie observar que as correntes de pico anódica e catódica tem uma correspondência linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), indicando que até a velocidade de 80 mV s⁻¹ há transferência de massa é controlada por difusão.

Em termos moleculares podemos inferir que o Fe (II) da estrutura da hemina incorporado a superfície do eletrodo pode ligar-se com a amodiaquina através do oxigênio do grupo fenolato, o grupo funcional eletroativo da estrutura química da amodiaquina. Está hipótese é corroborada por resultados da literatura em que a técnica de espectroscopia de Mössbauer (Adams et. al., 1996) foi utilizada para investigar a complexação de amodiaquina e hemina em solução.

5.2-Desenvolvimento dos Métodos Eletroanalíticos

5.2.1 – Estudo da porcentagem de hemina na pasta de carbono

No desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica é de grande importância a otimização de parâmetros que influenciam na resposta voltamétrica. Desta forma, o presente estudo foi desenvolvido analisando a influência de alguns parâmetros nestas respostas, tais como: porcentagem de hemina na pasta, pH, velocidade de varredura, amplitude, tempo de deposição e concentração objetivando a obtenção do melhor sinal analítico.

Para a escolha da composição da pasta, e porcentagem do modificante, uma alíquota de 1,0 mL da solução estoque de amodiaquina de concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em 5 mL da solução-tampão BR de pH 2. Para tanto, diferentes porcentagens (5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%) de hemina foram testadas na composição do biossensor, no intuito de verificarmos qual a porcentagem de hemina que produz maior corrente de pico do analito. Considerando os resultados obtidos por voltametria de pulso diferencial, nós obtivemos um sinal analítico e correntes de picos maiores para 10% de hemina na pasta de carbono (Figura 11), sendo, portanto, a porcentagem selecionada para composição do eletrodo de pasta de carbono modificado.

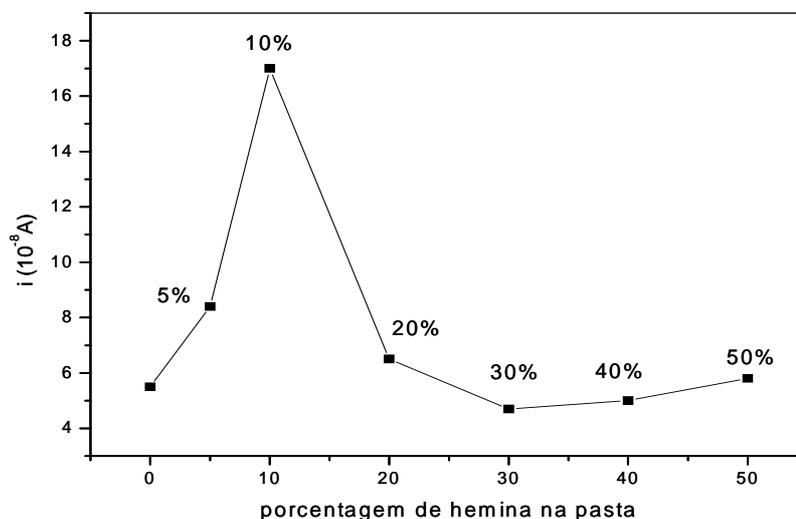


Figura 11. Variação da resolução de pico da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes porcentagens de hemina no eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado. $\Delta E = 40 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

5.2.2 -Influência do pH do meio

Para estudar a influência do pH nas determinações analíticas, uma alíquota de 1,0 mL da solução estoque de amodiaquina de concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada em cada 5 mL das soluções-tampão BR com valor de pH variando entre 2 e 12, para verificar a eletroatividade da molécula e o pH ótimo, ou seja, o valor de pH em que o analito apresenta uma maior corrente de pico e, conseqüentemente, uma melhor sensibilidade da técnica. Considerando que as leituras foram realizadas com o eletrodo com 10% de hemina. Foram então submetidas à análise por voltametria de pulso diferencial para a identificação de picos anódicos e/ou catódicos. Os resultados revelaram uma definição de sinal analítico e corrente de picos maiores para o pH 7,0 (Figuras 12 e 13). Portanto, o valor de pH selecionado para o estudo foi 7,0.

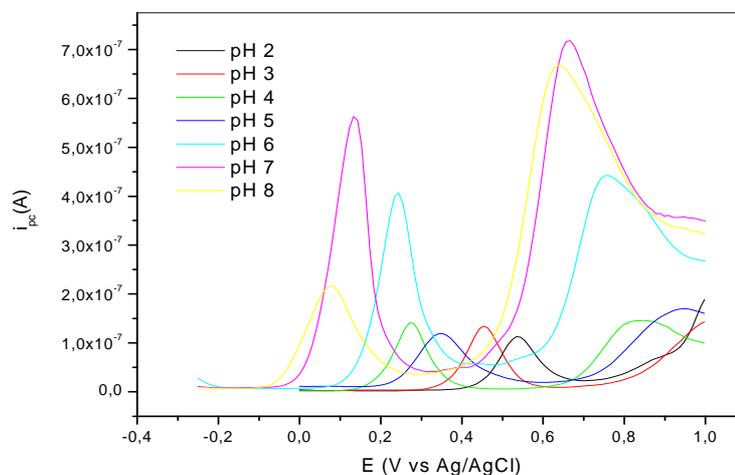


Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs em eletrodo modificado com 10 % de hemina. $\Delta E=40 \text{ mV}$, $\nu=20 \text{ mV s}^{-1}$.

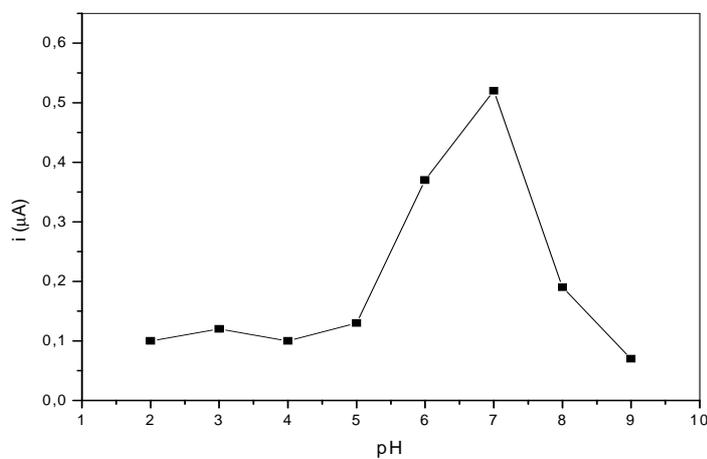


Figura 13. Intensidade de corrente da amodiaquina em função do pH na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções BR em eletrodo modificado com 10 % de hemina. $\Delta E=40 \text{ mV}$, $\nu=20 \text{ mV s}^{-1}$.

5.2.3-Influência da amplitude

No estudo da influência da amplitude, a velocidade foi ajustada em 20 mV s^{-1} e foi realizada uma varredura de amplitude entre 20 e 200 mV.

A Figura 14 mostra o efeito da variação da amplitude na corrente de pico para a amodiaquina. Observou-se que para valores de amplitude menores do que 100 mV, o aumento da intensidade de corrente foi linear. Amplitudes maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para fins analíticos. Em função disto, optou-se por trabalhar com uma amplitude de 100 mV.

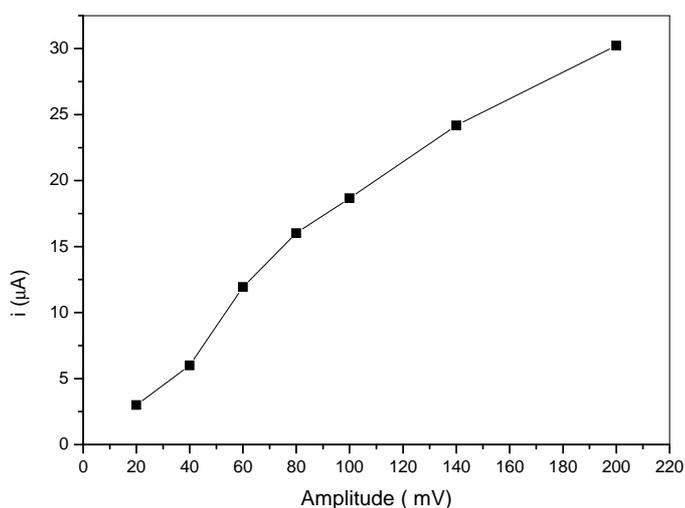


Figura 14. Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10 % de hemina em função da amplitude $v= 20 \text{ mV s}^{-1}$.

5.2.4-Influência da velocidade de varredura

No estudo da influência da velocidade de varredura a amplitude foi ajustada em 100 mV e a velocidade foi avaliada em intervalos de 0,01 a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. A Figura 15 mostra o efeito da variação da velocidade na corrente de

pico para a amodiaquina. Observou-se um aumento seguido de um decréscimo da corrente de pico com um valor máximo para a velocidade de 80 mV s^{-1} . Velocidades maiores diminuem a resolução, e, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica. Em função disto, optou-se por trabalhar na velocidade de 80 mV s^{-1} .

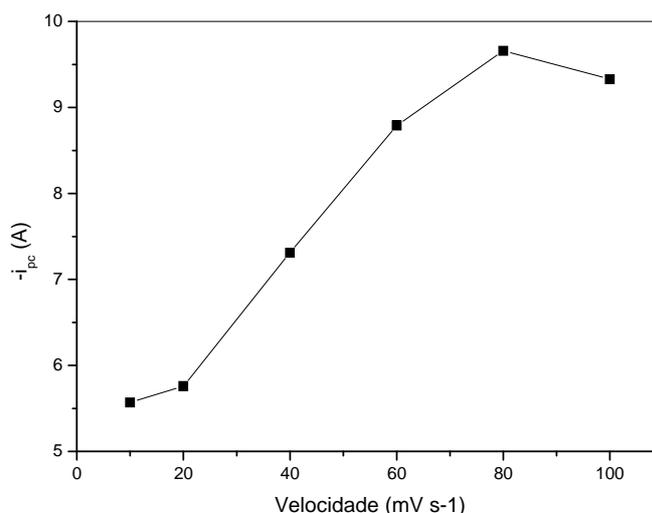


Figura 15. Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em função da velocidade de varredura em eletrodo modificado com 10 % de hemina. $\Delta E=100 \text{ mV}$

5.2.5-Influência da concentração do analito

Para o estudo do efeito da concentração, inicialmente foram ajustadas as condições ótimas de análise em pH 7,0; amplitude em 100 mV e velocidade de varredura em 80 mV s^{-1} . Uma série de experimentos em triplicata foi conduzida para construir as curvas de calibração. A linearidade entre os sinais de corrente e a concentração do analito foi verificada no intervalo de $4,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,9996, indicando que há uma correlação forte entre os dados testados e representado pela equação da reta:

$$i = 1,4 \times 10^{-2} + 4,3 \times 10^{-7}[\text{AMQ}] \quad (N = 7, r = 0,9996)$$

A curva analítica foi construída pelo método da adição de padrão, partindo-se de uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo registradas as curvas voltamétricas por pulso diferencial (Figura 16). Observou-se que a corrente de pico aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração e que praticamente não ocorreram deslocamentos nos potenciais de pico.

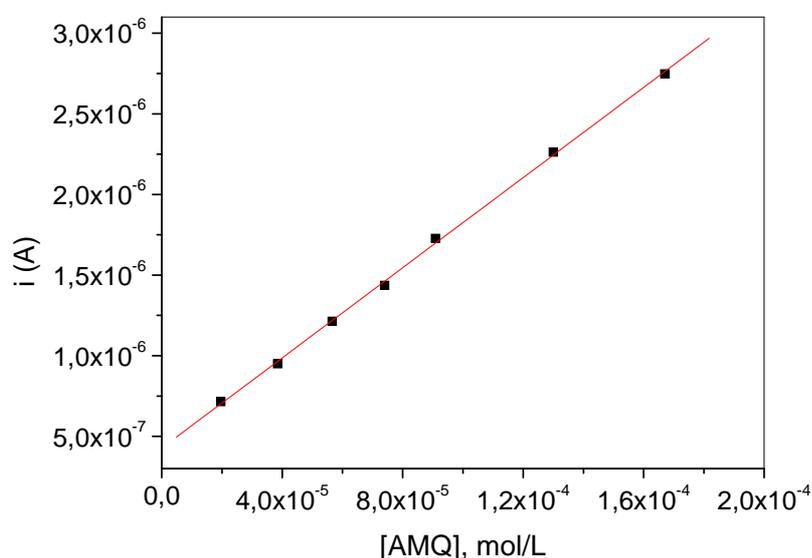


Figura 16. Curva analítica da amodiaquina em solução B-R pH 7,0 por voltametria de pulso diferencial. $\Delta E = 100 \text{ mV}$, $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são característicos do desempenho de cada procedimento de análise e dependem do processo em estudo. Segundo INMETRO (2007), estes parâmetros podem ser calculados utilizando-se as equações abaixo:

$$LD = 3S_b / b \text{ e } LQ = 10 S_b / b$$

Onde S_b é o desvio padrão da média aritmética e b o valor do coeficiente angular da reta de calibração. Já o coeficiente de variação pode ser obtido pela razão entre o desvio padrão da reta e o valor médio de concentração dentro da faixa linear, sendo uma das formas mais usuais de expressar a precisão de um determinado método.

$$c.v. = S_b / X_m \times 100$$

O limite de detecção obtido foi de $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de quantificação obtido foi de $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A tabela 2 mostra os parâmetros que foram analisados e definidos a partir da melhor resolução dos picos.

Tabela 2. Otimização dos parâmetros da análise de amodiaquina em biossensor de hemina pela técnica de voltametria de pulso diferencial

| Parâmetros | Analisados | Otimizados |
|--|------------|------------|
| Composição da pasta (% do modificante) | 5 a 50 | 10 |
| pH | 2 a 12 | 7 |
| Velocidade de varredura (mV.s^{-1}) | 10 a 100 | 80 |
| Amplitude (mV) | 20 a 200 | 100 |

Na Tabela 3 encontram-se os valores de LD e LQ da curva analítica da amodiaquina obtida por voltametria de pulso diferencial (VPD) usando o eletrodo modificado com hemina como eletrodo de trabalho.

Tabela 3. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para a amodiaquina utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD)

| Técnica | b (A/mol L ⁻¹) | r | c.v. | LD (mol L ⁻¹) | LQ (mol L ⁻¹) |
|---------|----------------------------|--------|------|---------------------------|---------------------------|
| VPD | 1,4 x 10 ⁻² | 0,9996 | 0,02 | 4,8 x 10 ⁻⁶ | 1,6 x 10 ⁻⁵ |

5.3-Voltametria de onda quadrada em biossensor de hemina

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas. Além disso, a análise de parâmetros característicos desta técnica, como frequência e a amplitude da onda quadrada e a velocidade de varredura, permite a aquisição de informações quanto á cinética e ao mecanismo do processo eletroquímico em questão. A técnica de voltametria de onda quadrada é mais rápida e há um consumo menor de espécies eletroativas quando comparada com a voltametria de pulso diferencial.(Skoog et al., 1992).

5.3.1- Influência da frequência

Para o estudo da amodiaquina por voltametria de onda quadrada, foi utilizado uma solução constituída por 5,0 mL de solução tampão B-R pH 7,0 e por 1,0 mL da solução do analito de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Foram inicialmente estudadas as condições ideais para a influência de parâmetros operacionais de frequência, velocidade de varredura, amplitude, tempo de deposição e concentração objetivando com isso o melhor sinal analítico.

No estudo da influência da frequência, a velocidade foi ajustada em 80 mV s⁻¹, a amplitude em 100 mV e foi realizada uma varredura de frequência entre 20 e 200 Hz.

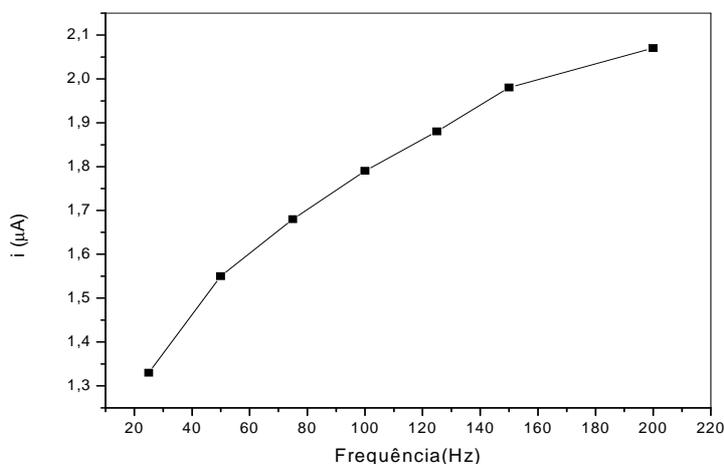


Figura 17. Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10 % de hemina em função da frequência $\Delta E = 100 \text{ mV}$ $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 17 mostra o efeito da variação da frequência na corrente de pico para a amodiaquina. Observou-se por meio da variação da frequência da onda quadrada para a amodiaquina sobre o eletrodo de pasta de carbono modificado com 10% de hemina, que um aumento no valor da frequência causa um aumento proporcional na intensidade de corrente de pico. Na faixa linear o valor de frequência que teve o melhor sinal analítico foi de 150 Hz, uma vez que, frequências acima de 150 Hz não influenciaram de maneira significativa na intensidade do sinal, e, por este motivo, a frequência de trabalho escolhida foi a de 150 Hz.

5.3.2- Influência da amplitude

No estudo da influência da amplitude, a velocidade foi ajustada em 80 mV s^{-1} e a frequência em 150 Hz e foi realizada uma varredura de amplitude entre 20 e 300 mV.

A figura 18 mostra o efeito da variação da amplitude na corrente de pico para a amodiaquina, fazendo uso da técnica de voltametria de onda quadrada.

Verificou-se que para valores de amplitudes até 200 mV, o potencial de pico permaneceu constante e a corrente de pico foi linearmente dependente da amplitude. Para valores de amplitudes acima de 200 mV o sinal tornou-se irregular. Adicionalmente, amplitudes maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos. Em função disto, optou-se por trabalhar com amplitude da onda quadrada de 200 mV.

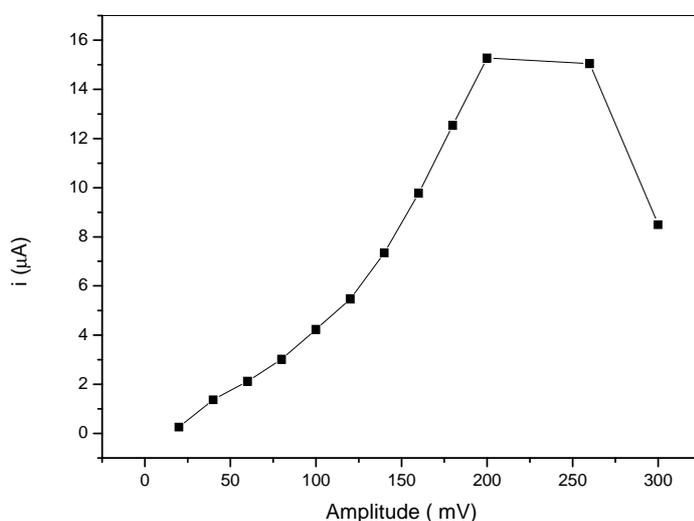


Figura 18. Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em eletrodo modificado com 10 % de hemina em função da amplitude $v = 80 \text{ mV s}^{-1}$.

5.3.3-Influência do incremento de varredura

No estudo da influência do incremento de varredura, a amplitude foi ajustada em 200 mV e a frequência em 150 Hz, foi realizada uma varredura de velocidade entre 20 e 1000 mV s^{-1} .

A Figura 19 mostra o efeito da variação da velocidade na corrente de pico para a amodiaquina. Observou-se por meio da variação da velocidade utilizando a técnica de onda quadrada, que de 20 até 40 mV s^{-1} houve um

aumento no potencial de pico, e, após a velocidade de 40 mV s^{-1} , a corrente permanece constante, não apresentando mudança significativa no comportamento. Em função disto, optou-se por trabalhar com a velocidade da onda quadrada de 40 mV s^{-1} .

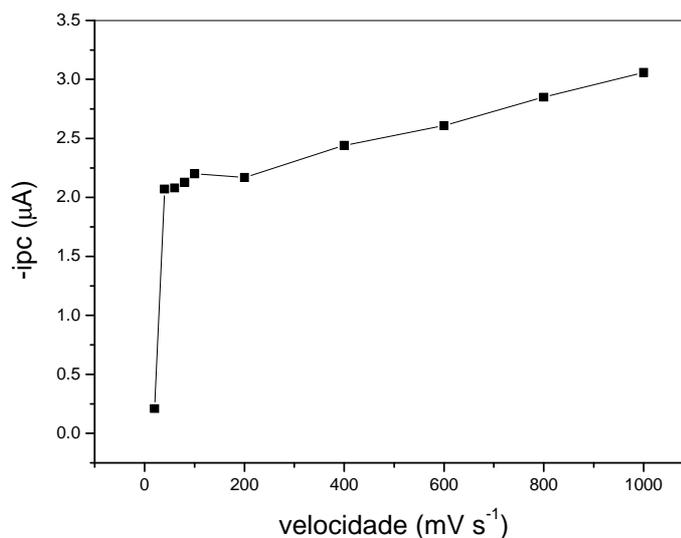


Figura 19. Comportamento da corrente anódica da amodiaquina de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução BR pH 7,0 em função da velocidade de varredura em eletrodo modificado com 10 % de hemina. $\Delta E=200 \text{ mV}$ e $F = 150 \text{ Hz}$.

5.3.4-Influência da concentração do analito

Para estudo do efeito da concentração, inicialmente foram ajustadas as condições ótimas de análise em pH 7,0; frequência de 150 Hz, amplitude em 200 mV e velocidade de varredura em 40 mV s^{-1} . Uma série de experimentos em triplicata foi conduzida para construir as curvas de calibração. A linearidade entre os sinais de corrente obtidos e a concentração do analito foi estabelecida dentro do intervalo de 1×10^{-6} a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se a seguinte equação da reta:

$$i = 7,0 \times 10^{-8} + 1,13 [\text{AMQ}] \quad (r = 0,9992, N=8)$$

A curva analítica foi construída pelo método da adição de padrão, partindo-se de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo registradas as curvas voltamétricas por onda quadrada (Figura 20). Observou-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração e que praticamente não ocorrem deslocamentos nos potenciais de pico no intervalo de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

O limite de detecção obtido foi de $8,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de quantificação obtido foi de $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Na Tabela 4 encontram-se os valores de LD e LQ da curva analítica da amodiaquina obtida por voltametria de onda quadrada (VOQ) usando o eletrodo modificado com hemina como eletrodo de trabalho.

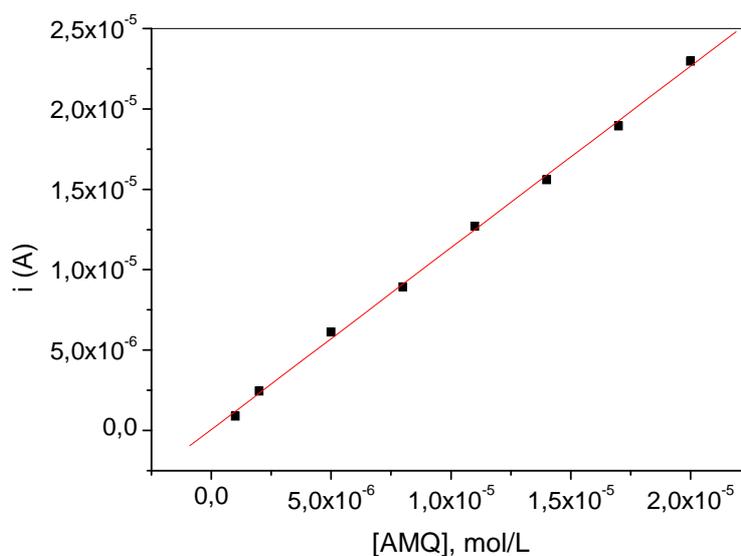


Figura 20. Curva de calibração obtida para amodiaquina em solução BR pH 7,0 por voltametria de onda quadrada. $F = 150 \text{ Hz}$ $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 4. Otimização dos parâmetros da análise de amodiaquina em biossensor de hemina pela técnica de voltametria de onda quadrada

| Parâmetros | Analizados | Otimizados |
|--|------------|------------|
| composição da pasta (% do modificante) | 5 a 50 | 10 |
| pH | 2 a 12 | 7 |
| velocidade de varredura (mV.s ⁻¹) | 20 a 1000 | 40 |
| amplitude (mV) | 20 a 300 | 200 |
| freqüência (Hz) | 20 a 200 | 150 |

A tabela 4 mostra os parâmetros que foram analisados e definidos a partir da melhor resolução dos picos.

Tabela 5. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para a amodiaquina, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada

| Técnica | b (A/mol L ⁻¹) | r | c.v. | LD (mol L ⁻¹) | LQ (mol L ⁻¹) |
|---------|----------------------------|--------|------|---------------------------|---------------------------|
| VOQ | 1,13 | 0,9992 | 3,14 | 8,7 x 10 ⁻⁷ | 2,9 x 10 ⁻⁶ |

Portanto, no desenvolvimento de um método eletroanalítico há necessidade de realizar-se a escolha de determinados parâmetros para otimização do mesmo. O coeficiente de variação, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), dependem do processo em estudo, e possuem uma característica peculiar para cada procedimento analítico e denotam confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para condição de análise.

Tabela 6. Resumo dos resultados analíticos obtidos para cada método desenvolvido para a determinação de amodiaquina em biossensor de hemina

| Técnica | b (A/mol L ⁻¹) | r | c.v. | LD (mol L ⁻¹) | LQ (mol L ⁻¹) |
|---------|----------------------------|--------|------|---------------------------|---------------------------|
| VPD | 1,4 x 10 ⁻² | 0,9996 | 0,02 | 4,8 x 10 ⁻⁶ | 1,6 x 10 ⁻⁵ |
| VOQ | 1,13 | 0,9992 | 3,14 | 8,7 x 10 ⁻⁷ | 2,9 x 10 ⁻⁶ |

A tabela 6 mostra de forma concisa os resultados eletroanalíticos dos dados tratados estatisticamente a partir dos métodos descritos anteriormente e que servem de parâmetros para a definição da melhor condição analítica.

Portanto, diante do estudo comparativo entre os dois métodos avaliados, a voltametria de onda quadrada, além de uma técnica mais rápida, quando do que a voltametria de pulso diferencial, tamb[em apresentou melhor desempenho para a determinação da amodiaquina principalmente em baixas concentrações. Sendo, portanto, a técnica escolhida para a determinação da amodiaquina em amostra real.

5.4- Aplicação da metodologia para determinação de amodiaquina em leite materno

Em termos de composição química, o leite materno é uma matriz complexa, pois está sujeito a mudanças significativas nas concentrações de lipídeos e proteínas, dependentes da fase da lactação (colostro *versus* leite maduro) ou até mesmo da fase de mamada (leite anterior *versus* leite posterior) ver tabela 7 (Levy, 1994; Woolfolk et al., 1989).

Tabela 7. Tipos de leite durante a fase de lactação

| | |
|--------------------|---|
| Colostro | 1º a 7º dia, produção de 100mL/dia |
| Leite de transição | 8º a 15º dia, produção de 500ml/dia. |
| Leite maduro | 16º dia em diante. |
| Leite prematuro | Maior teor de gordura, lipídeos e calorias, menor teor de lactose |

Fonte: OMS/CDR/93.6

A composição do leite maduro varia não apenas entre lactantes, mas também, considerando a mesma lactante entre as mamas, em mamadas diferentes e até no decurso da mesma amamentação (Gulati et al., 1993). Vários são os fatores que podem determinar variações na composição do leite

materno, como: estágio de lactação, parto prematuro, tempo de gestação, esvaziamento da mama, hora e intervalo entre as mamadas, grau de pressão utilizado para extrair o leite, método e horário de coleta das amostras, técnicas de análise laboratorial, intervalo entre as gestações e a ingestão de álcool ou drogas. Tais alterações influenciam na extensão da transferência de drogas do plasma para o leite, causando variações nas concentrações destes compostos no leite materno (Clark, 1994).

Tabela 8. Composição do leite materno (100mL).

| | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Energia - 70 kcal • Proteína - 1,1 g • Caseína:albumina - 40:60 • Lipídios - 4,2g • Carboidrato - 7g • Vitamina A - 190 mcg • Vitamina D - 2,2 mcg • Vitamina E - 0,18 mg • Vitamina K - 1,5 mcg • Vitamina C - 4,3 mg • Tiamina - 16 mcg • Riboflavina - 36 mcg | <ul style="list-style-type: none"> • Niacina - 147 mcg • Piridoxina - 10 mcg • Folato - 5,2 mcg • Vitamina B12 - 0,03 mcg • Cálcio - 34 mg • Fósforo - 14 mg • Ferro - 0,05 mg • Zinco - 0,3 mg • Água - 87,1 mL • Sódio - 0,7 mEq • Cloro - 1,1 mEq • Potássio - 1,3 mEq |
|---|---|

Fonte: OMS/CDR/93.6

Com o objetivo de testar a metodologia desenvolvida para determinação da amodiaquina em amostras de leite materno, a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) foi selecionada, utilizando o eletrodo de hemina como eletrodo de trabalho, uma vez que esta técnica apresentou uma melhor sensibilidade para baixas concentrações de amodiaquina.

O estudo do efeito matriz indicou que a maior quantidade da matriz que pode ser utilizada sem alteração do sinal analítico equivale a 100 µL em 5 mL. Para determinar a amodiaquina em amostras de leite materno, o método de adição de padrão foi utilizado por apresentar melhores resultados em análises com matrizes complexas.

Inicialmente foi adicionado 5,0 mL da solução tampão B-R pH 7 na célula eletroquímica. Em seguida, 100 μL do leite materno enriquecido com amodiaquina na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado para a obtenção do voltamograma de onda quadrada. Foram adicionados volumes sucessivos da solução padrão de amodiaquina, para os quais foram obtidos valores crescentes de corrente em cada voltamograma de onda quadrada. Com estes valores de correntes de pico construíram-se gráficos que, por extrapolação, permitiram determinar a concentração da amodiaquina na amostra. A figura 21 apresenta resultados típicos obtidos neste tipo de procedimento.

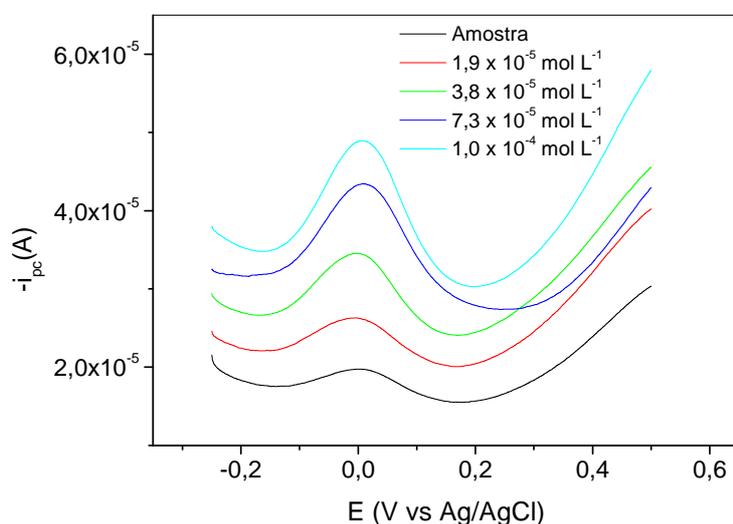


Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada da determinação de amodiaquina em leite materno em solução BR pH 7,0 com biossensor de hemina. Condições: $F = 150 \text{ Hz}$, $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$.

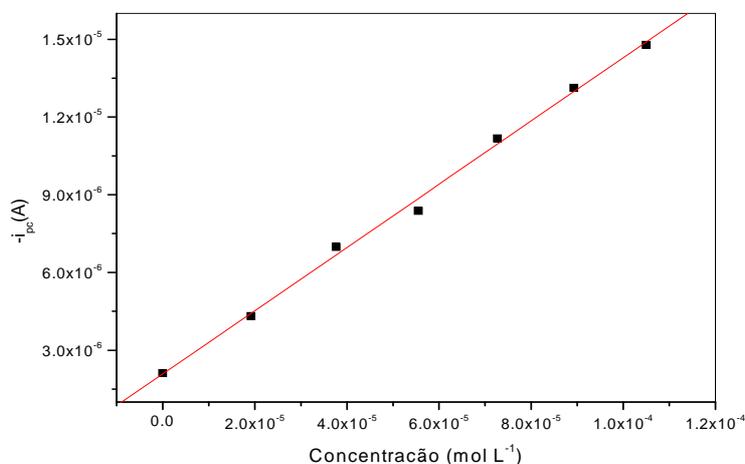


Figura 22. Curva analítica da amodiaquina em amostra de leite materno em solução BR pH 7,0 com biossensor de hemina. Condições: $F = 150 \text{ Hz}$, $\Delta E = 200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 22 corresponde à curva analítica para a amodiaquina em leite materno apresentando linearidade no intervalo descrito na Figura 21 e representado pela equação:

$$Y = 2,08 \times 10^{-6} + 0,122 X \quad (r = 0,9984, \text{ dp} = 2,9 \times 10^{-7}, N=7)$$

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $7,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

Na Tabela 9 encontram-se os valores de LD e LQ e o resultado da regressão linear da curva analítica da amodiaquina obtidas por voltametria de onda quadrada (VOQ).

Tabela 9. Resultado dos valores de limite de detecção e quantificação para a determinação de amodiaquina em leite materno, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.

| Técnica | b (A/mol L ⁻¹) | r | Desvio padrão | LD (mol L ⁻¹) | LQ (mol L ⁻¹) |
|---------|----------------------------|--------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| VOQ | 0,12 | 0,9984 | 2,9 x 10 ⁻⁷ | 7,1 x 10 ⁻⁶ | 2,4 x 10 ⁻⁵ |

De acordo com a curva analítica da figura 22, a extrapolação do valor de x é a concentração da amostra desconhecida. Essa concentração foi de 1,7 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de amodiaquina, o que corresponde há uma recuperação de 85%.

5.5 - Estudo de interferentes

A fim de investigar a seletividade do método proposto, alguns possíveis interferentes foram analisados. Visando verificar o grau de interferência de outros fármacos na resposta voltamétrica da amodiaquina com o eletrodo de pasta de carbono modificado com hemina, alguns compostos, tais como ácido ascórbico, primaquina, clonidina, dipirona, minociclina e penicilina G foram avaliados em diferentes níveis de concentração na solução de pré-concentração. Estes testes foram feitos pela adição destes possíveis interferentes à solução de amodiaquina 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de amodiaquina.

A influência dos interferentes na determinação da amodiaquina foi avaliada com base na diminuição ou aumento da corrente de pico do sinal voltamétrico da amodiaquina nas condições de determinação otimizadas.

Tabela 10. Resultados analíticos obtidos para o estudo de interferentes de cada composto analisado em biossensor de hemina

| composto | interferente |
|-----------------|---|
| ácido ascórbico | sim conc. > $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ |
| primaquina | sim conc. > $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ |
| clonidina | não |
| dipirona | não |
| minociclina | sim conc. > $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ |
| penicilina G | não |

A tabela 10 nos mostra os resultados obtidos nessa avaliação. Os compostos interferentes foram escolhidos baseados em sua solubilidade em água. Para dipirona, clonidina e peniciclina G não foram observadas variações significativas na resposta voltamétrica do biossensor de hemina. Porém, a minociclina e o ácido ascórbico interferem nas análises diminuindo as correntes dos picos nos voltamogramas e conseqüentemente a sensibilidade da técnica, mas não houve surgimento de outro pico, enquanto que a primaquina teve uma diminuição no valor da corrente devido ao surgimento de outro pico.

5.6- Método comparativo: UV-Vis

Para a comparação do método eletroquímico utilizou-se a Espectrofotometria na região UV-Vis.

As análises realizadas para determinação de amodiaquina em leite materno em UV-Vis foram feitas com a solução estoque contendo

$1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de amodiaquina, para comparação dos resultados obtidos com o método proposto.

Utilizando o método de adição de padrão, foram obtidos valores crescentes de absorbâncias em função da concentração do padrão de amodiaquina. Deste comportamento da absorbância foi possível determinar a concentração de amodiaquina nas amostras.

Os espectros no UV foram obtidos no comprimento de onda de 341,5 nm para a quantificação. Este valor representa o máximo de absorção do analítico. Os resultados obtidos são apresentados na figura 23.

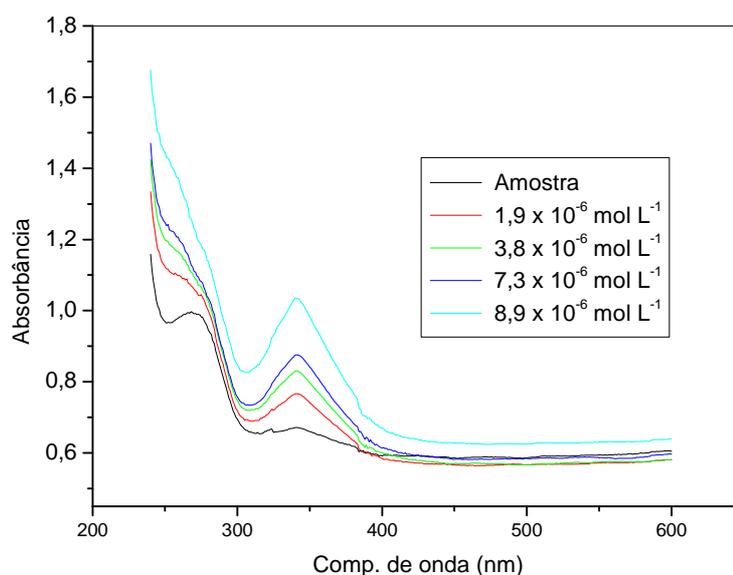


Figura 23: Espectros de absorção para a determinação de amodiaquina em leite materno.

O comprimento de onda foi ajustado em 341,5 nm, e uma curva analítica foi construída, com soluções padrão, obtendo-se uma relação linear que pode ser apresentada pela equação:

$$\text{Abs.} = 0,67 + 2,86 \times 10^4 [\text{AMQ}] \quad (r = 0,9991; N=7)$$

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $6,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

De acordo com a curva de adição de padrão obtida, a extrapolação da reta no eixo x corresponde a concentração da amostra desconhecida. Na Figura 24, essa concentração foi de $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de amodiaquina.

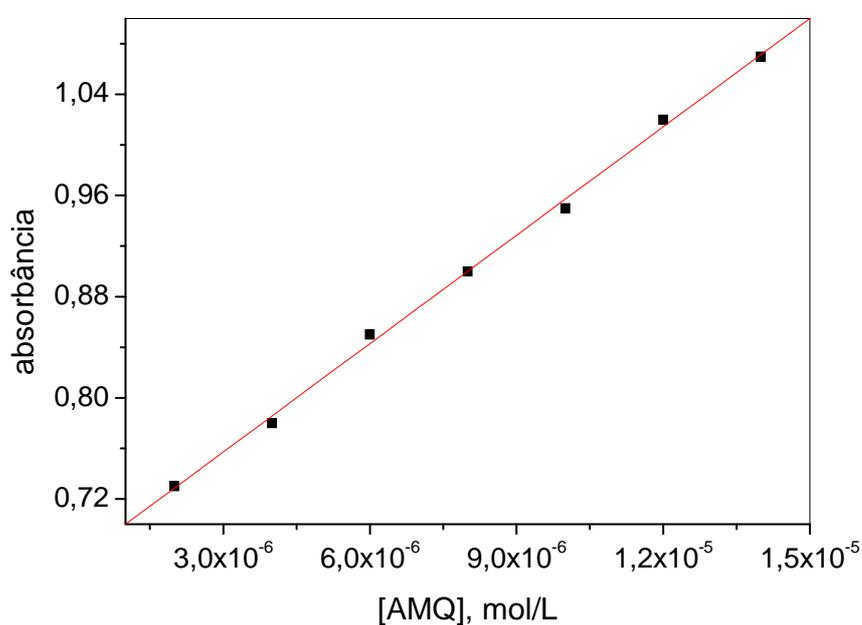


Figura 24: Curva analítica para determinação da amodiaquina em leite materno em solução BR pH 6,0 em UV-Vis.

A comparação entre a precisão dos dois métodos foi realizada pela aplicação do teste de Snedecor (Teste F), o qual considera a razão entre as variâncias amostrais dos dois métodos analíticos desenvolvidos. Os resultados são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Resultados para o estudo de comparação da precisão de métodos usados para a análise de amodiaquina em leite materno

| Método analítico | Grau de liberdade | Sb | F |
|--------------------|-------------------|----------------------|---|
| Voltametria | 7 | $2,9 \times 10^{-7}$ | $*F_{\text{calculadp}} = 4,2 \times 10^8$ |
| Espectrofotometria | 6 | $5,9 \times 10^{-3}$ | $F_{\text{crítico}} = 3,866$ |

$$*F_{\text{calculado}} = \sigma^2 (\text{espectrofotometria}) / \sigma^2 (\text{voltametria})$$

Aplicando-se o teste F para comparação entre os dois métodos, observou-se que, o valor de F calculado é muito maior do que o valor crítico de F, neste caso pode-se afirmar que há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos a 95% de confiança. Esta diferença é evidente quando comparamos as faixas lineares de cada uma das técnicas, bem como seus valores de desvio padrão. É possível concluir que o método espectrofotométrico apresenta menor sensibilidade para amodiaquina. Este efeito é acentuado na amostra real devido às características coloidais do leite materno, havendo neste caso a necessidade de um pré-tratamento para diminuição do efeito matriz.

VI-CONCLUSÃO

- O presente trabalho demonstrou a potencialidade do uso de hemina como agente modificador de eletrodos, apresentando uma resposta voltamétrica simples de ser avaliada quando ao seu comportamento eletroquímico. A hemina estudada foi fortemente adsorvida sobre a superfície do eletrodo de pasta de carbono.
- A facilidade de preparo do biossensor e a simplicidade de renovação de sua superfície são aspectos vantajosos do eletrodo desenvolvido.
- Os estudos da eletroatividade da amodiaquina em eletrodo de hemina indicam de um único processo oxidativo com transporte de massa difusional.
- Diante do estudo comparativo dos dados encontrados para cada método, os parâmetros indicaram que a voltametria de onda quadrada, em relação a voltametria de pulso diferencial, tem como vantagens a rapidez na varredura, maior sensibilidade para baixas concentrações e menor limite de detecção.
- O biossensor contendo 10 % de hemina associado à voltametria de onda quadrada mostrou bom desempenho para a determinação de amodiaquina em leite materno em baixas concentrações. Nesse estudo as condições otimizadas encontradas foram: pH = 7; velocidade de varredura = 40 mV s⁻¹; amplitude = 200 mV e frequência = 150 Hz. A dependência da corrente de pico com a concentração apresentou linearidade entre 5,0 x 10⁻⁶ a 2,0 x 10⁻⁵ mol/L, limite de detecção de 8,7 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, limite de quantificação de 2,9 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e coeficiente de variação de 3,14%.
- É importante ressaltar que o método desenvolvido mostrou-se eficiente na determinação de amodiaquina presente no leite materno, sendo simples, sensível, reprodutível e sem a necessidade de tratamento prévio da amostra.

VII-REFERÊNCIAS

ABREU, F.C.; FERRAZ, P.A.L.; GOULART, M.O.F. Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **Journal of the brazilian chemical society**, São Paulo, v. 13, p. 19-35, 2002.

ADAMS, P. A.; BERMAN, P. A. M.; EGAN, T. J.; MARSH, P. J.; SILVER, J.; Molecular modeling study of complexes between ferriprotoporphyrin IX and antimalarial 4-quinolinecarbinolamines: a proposal of pharmacophore, **J. Inorganic Chemistry**, p. 63,69,1996.

ALEIXO, L. M.. .Voltametria: Conceitos e Técnicas. Disponível em: www.chemkeys.com, o seu site de química, 2009.

Amamentação e uso de drogas / Secretaria de Políticas de Saúde Área Técnica de Saúde da Criança - Brasília Ministério da Saúde. 72p. ISBN: 85-334-0241-4, 2000.

American Academy of Pediatrics. Committee on drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**;108:776-89, 2001.

ANCA, I. S., ZIMA J., BAREK J., Differential Pulse Voltammetric Determination of 8-Aminoquinoline Using Carbon Paste Electrode , **Analytical Letters**, 1532-236X, Volume 38, Issue 1, Pages 149-156, 2005.

ANDERSON, P.O., POCHOP L.S., MANOQUERRA A.S. Adverse drug reactions in breastfed infants: less than imagined. **Clinical Pediatrics**;42:325-40, 2003.

ANSARI , M. T. ; TARIQ M, A.I ; RAZA, A. ; ASHRAF, M. ; YAR, M. ; Spectrophotometric Determination of Amodiaquine and Sulfadoxine in

Pharmaceutical Preparations. **Chemia analityczna**, vol. 53, n^o2, pp. 305-313, 2008.

BALLA, J.; BALLA, G.; JENEY, V.; KAKUK, G.; JACOB H. e VERCELLOTTI, G.,Fs and endothelium: a – 2. edged. Sword- promotion of oxidation and induction of cytoprotectantes- *Blood* v.95, p.3442-3450.2000.

BEGG, E. J.; DUFFULI, S. B.; HACKETT, L. P., ILETT, K. F. Studying drugs in human milk: Time to unify the approach. **Journal of Human Lactation**, 18, p. 323-332, 2002.

BRASSEUR P. ET AL. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 93(6):645-650, 1999.

BRETT, A. M. O.; BRETT C. M. A. **Eletroquímica**: princípios, métodos e aplicações.Coimbra: Livraria Almeida, 444 p., 1993.

BUFFLE J., WAEBER TERCIER M.-L., Análise voltamétrica de metais traço e especiação ambiental: do laboratório para medidas in situ. **(Revisão)**. *Tendências em Química Analítica*, 24, 172-191, 2005.

CHAVES R.G., LAMOUNIER J.A., Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**; 80(5) : 89-98, 2004.

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

CHEN, Y.; HE, C.-X.; ZHU, S.-M.; CHEN, H.-Y.; LI, Y. Electrocatalytic reduction of artemether by hemin. **Journal of The Electrochemical Society, Pennington**, v. 144, p. 1891-1894, 1997.

CHEN, Y.; ZHU, S.-M.; CHEN, H.-Y.; LI, Y. Artesunate interaction with hemin. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics** , v. 44, p. 295-300, 1998.

CLARK, D. C. Trends in the prevalence of dental fluorosis in North America. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 22, p. 148-152, 1994.

COSTEDOAT-CHALUMEAU N.; AMOURA, Z.; HUONG, D. L.T.; LECHAT, P.; PIETTE, J.C.: Safety of hydroxychloroquine in pregnant patients with connective tissue diseases. **Review of the literature** (Segurança de hidroxiclороquina em pacientes gestantes com doenças do tecido conjuntivo) *Autoimmunity Reviews* 4: 111-5. Instituição: Service de Medecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire Pitie-Salpetriere, Paris, França, 2005.

COX, J. A.; TESS, M. E.; CUMMINGS, T. E.; **Analytical Chemistry**, 15, 173, 1996.

DORN, A.; STOFFEL, R.; MATILE, H.; BUBENDORF, A.; RIDLEY, R. G.; Malarial haemozoin b-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature** ,374, 269, 1995.

DUA V.K., GUPTA N.C., SHARMA V.P., SUBBARAO S.K., Liquid chromatographic determination of amodiaquine in human plasma.**Journal of Chromatography B**, 803, 371, 2004.

EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A.; Quinoline anti-malarial drugs inhibit. **FEBS Lett.** Sep 19;352(1):54–57 , 1994.

EGAN, T. J.; MARQUES, H. M.; Доступ к полному тексту закрыт. **Coordination Chemistry Reviews**, 190-192, 493, 1999.

FLEET, B. GUNASINGHAM, H E. “**Electroanalytical Chemistry**”, ed. A.J. Bard, Dekker, New York, Vol. 16, 1989.

FREIRE, S. R; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química Nova**, 26: 381-389, 2003.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 105–112, 2006.

GIAO P.T., VRIES P.J. Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. **Clinical Pharmacokinetics**, 40, 343, 2001.

GULATI, P.; SINGH, V.; GUPTA, M. K.; VAIDYA, V.; DASS, S.; PRAKASH, S. Studies on theaching of fluoride in tea infusions. **The Science of the total environment**, 138, p. 213-222, 1993.

GUPTA S., THAPAR M.M., MARIGA S.T., WERSNSDORFER W.H., BJÖRKMAN A., Quimioterapia da Malária. Um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Exp. Parasit.** 100, 28, 2002.

HALE TW. Drug therapy and breastfeeding: pharmacokinetics, risk factors, and effects on milk production. **Neoreviews** 2004;5:e164-72. Disponível em: <http://neoreviews.aappublications.org/cgi/reprint/neoreviews;5/4/e164>

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos -DOQ-CGCRE-008. Rev.02. 2007. 24p.

ITO S. Drug therapy for breastfeeding women. **New England Journal of Medicine**;343:118-26, 2000.

KALCHER, K., KAUFFMANN, J.M., WANG, J., SAVANCARA, I., VYTRAS, K., NEUHOLD, C., YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electrochemical

analysis: a review with particular emphasis on the period 1990 -1993. **Electroanalysis**, 7(1):5-22, 1995.

KASTURE, A. V.; S. G. WADODKAR; K. M. GOKHALE; **Pharmaceutical chemistry** parte II; Nirali prakasha editora; págs. 287,292-301; 1993.

KENNETH, I., O. Anodic Oxidation and Amperometric Sensing of Hydrazine at a Glassy Carbon Electrode Modified with Cobalt (II) Phthalocyanine-cobalt (II) Tetraphenylporphyrin (CoPc-(Cotpp)₄) Supramolecular Complex. **Revista Sensor**, n.6, p.874-891, 2006.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R.; Laboratories Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2a ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 1996, pp. 96.

KHALIL, SHABAN M.; et al.; Spectrophotometric determination of Chloroquina and Pyrimethamine through ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate; **Microchemical Journal** 64 ,181-186; Egypt, 2000.

LEVY, S. M. Review of fluoride exposures and ingestion. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 22, p. 173-180, 1994.

LINDEGANDH, N.; FORSLUND, M.; GREEN,M.D.; KANEKO, A.; BERGQUIST, Y.;Automated solid-phase extraction for determination of amodiaquine, chloroquine and metabolites in capillary blood on sampling paper by liquid chromatography, **Chromatographia**, 55, 5, 2002.

LUZ, R.C.S.; DAMOS,F.S.; OLIVEIRA,A.B.;BECK, J.;KUBOTA, L.T.; Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocynine immobilized with poly-l-lysine film. **Talanta**, v.64, p.935, 2004.

LUZ, R.C.S.; DAMOS,F.S.; OLIVEIRA,A.B.;BECK, J.;KUBOTA, L.T.; Development of a sensor based on tetracyanoethylenide (LiTCNE) / poly-l-

lysine (PLL) for dopamine determination. **Electrochim Acta**, v.50, p.2675, 2005.

MARIGA S.T., GIL J.P., WERNSDORFER W.H., BJÖRKMAN A., **Acta Tropica** 93,221, 2005.

MARQUES A.C.; PINHEIRO, E. A.; Fluxos de casos de malária no Brasil em 1980. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 34, 1, 1982.

MARQUES, A.C. Human imigration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today** v. 3, p. 166, 1987

MARQUES A.C. Dados epidemiológicos de malária em todo Brasil, referentes a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, v. 28, n. 2, p. 141-155, abr/jun., 1995.

MENDIS, K.; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R.: The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, (64): 97-106, 2001.

MIHALY, G.W.; NICHOLL, D.D.; EDWARDS, G.; WARD, S.A.; ORME, M.L.; WARREL, D.A.; BRECKENRIDGE, A.M.; High-performance-liquid chromatographic analysis of amodiaquine in human plasma, **Journal of Chromatography**, 337, 166, 1985.

Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área técnica de Saúde da Criança. Amamentação e uso de drogas. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

Ministério da Saúde. Vigilância em saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2005. <http://www.saude.gov.br/svs> (acessado em 06/04/2010).

MINZI, O.M.S., MAIS, M., SVENSSON, J.O., GUSTAFSSON, L.L., ERICSSON, O., High performance liquid chromatographic method for determination of amodiaquine, chloroquine and their monodesethyl metabolites in biological samples, **Journal of Chromatography B**, 783, 473, 2003.

MOSES, P.R., P. WIER E R.W. MURRAY, A Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical Chemistry**, 47, 1882, 1975.

MOUNT, D.L.; PATCHEN, L.C.; DINH, P.N.; BARBER, A.M.; SCHWARTZ, I.K.; CHURCHILL, F.C.; Sensitive analysis of blood for amodiaquine and three metabolites by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, **Journal of Chromatography**, 383, 375, 1986.

NAISBITT D.J., RUSCOE J.E., WILLIAMS D., O' NEILL P.M., PIRMOHAMED M., PARK B.K., Disposition of amodiaquine and related antimalarial agents in human neutrophils. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 280, 884, 1997

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

OLLIARO P., NEVILL C., LEBRAS J., RINGWALD P., MUSSANO P., GARNER P., BRASSEUR P., Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria, **Lancet** 348, 1196, 1996.

PACHECO, W., Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina. Rio de Janeiro, 111 pgs. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2004.

PAGE, CLIVE P. ET AL. Infecções Parasitárias. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manoele, p.461 - 66. cap. 25, 1999.

PETERS, W.; Drug resistance in malaria parasites of animals and man. **Advances in Parasitology** 41,pp 1-62, 1998.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p.1012-1021, 2002.

PONKA, P. Cell biology of heme. **American Journal of the Medical Sciences**, V.318, p.241-256.1999.

PUSSARD, E.; VERDIER, F.; BLAYO, M.C.; BERNARD, H.C.; Simultaneous determination of chloroquine, amodiaquine and their metabolites in human plasma, red blood cells, whole blood and urine by column liquid chromatography, **Journal of Chromatography**. 374,111, 1986.

RANDHIR, P., D.; NATHAN, S., L.; JOSEPH,W. Electrochemical detection of amino at carbon nanotube and nickel-carbon nanotube modified electrodes. **The Analyst**, n.129, p. 1076-1081, 2004.

RIECKMANN KH, WILLERSON JR., WD, CARSON PE, AND FRISCHER H. Effects of tetracycline against drugresistant falciparum malaria. **Proceedings of The Helminthological Society of Washington**, v. 39, p. 339 -347, Nov, 1972.

RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; KUNZ, C. Nutritional and biochemical properties of human milk, part II: lipids, micronutrients and bioactive factors. **Clinics in Perinatology**, 26, p. 335-359, 1999.

Roll Back Malaria; W. H. O., UNICEF. World Malaria Report 2005. Capturado em 07 Out. 2006. Online. Disponível na Internet <http://www.globalpolicy.org/socecon/develop/africa/2005/05malariareport.pdf>
Roll , B., <http://www.rbm.who.int>, OMS, 1998 (Geneva).

SANTOS FILHO, O. A.; Modelagem de proteínas por homologia. Tese de Doutorado, Instituto Militar de Engenharia, Brasil, 2000.

SILVA, T.H.A; OLIVEIRA, M.T.; DOS SANTOS, H.F.; DE OLIVEIRA, A B.; DE ALMEIDA, W.B.,SOUZA,M.F.B.; **Química Nova**, 20, 191, 1997.

SKOOG, D. A. E LEARY, J.J., "Principles of Instrumental Analysis", 4th ed., **Saunders College Publishing**, Philadelphia, 1992.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise Instrumental**.5. ed. Porto Alegre: Bookman, 836 p, 2002.

SLATER, A.; CERAMI, A.; Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature** , 355, 167, 1992.

SOARES, I. S. ; RODRIGUES, M. M. . Malaria Vaccine: Roadblocks And Possible Solutions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, BRASIL, v. 31, p. 317-332, 1998.

STULIK, K. E PACAKOVA, V. "Electroanalytical measurements in Flowing liquids", Ellis Horwood, **Chichester**, 1987.

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

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise:uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191–195, 1997.

SULLIVAN, D. J.; MATILE, H.; RIDLEY, R. G.; GOLDBERG, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolinas. **Journal of Biological Chemistry**, (273): 31103-7, 1998.

SUZUKI, H.; Advances in the microfabrication of electrochemical sensors and systems.**Electroanalysis**, 12, 703, 2000.

SVANCARA, I.; VYTRAS, K. I.; BAREK, J.; ZIMA, J.; Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**,31, 311-345, 2001.

The comprehensive resource for physicians, drug and illness information; Fansidar; antimalarial;Baixado do web site: [http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs%20F\)/FANSIDAR.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs%20F)/FANSIDAR.html) em 23/07/07.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: princípios e aplicações**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 225 p, 1998.

VERMA, A.; VERMA,K.K.; Determination of amodiaquine in pharmaceuticals by reaction with periodate and spectrophotometry or by high-performance liquid chromatography, *Analyst* 115, 333, 1990.

WAGENER, F,H-D VOLK, D WILLIS, N ABRAHAM, M SOARES, G ADEMA E C FIGDOR. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation, **Pharmacological Reviews**, V.55, P.551-571.2003.

WANG, J., *Stripping Analysis - Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers, 1985, Deerfield Beach, 1985.

WANG, J.; LU, J.; HOCEVAR, S. B.; FARIAS, P. A. M. Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 3218–3222, 2000.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2. ed. New York: Wiley-VCH, 222 p, 2001.

WANG, J.; LU, D.; THONGNGAMDEE, S.; LIN, Y.; SADIK, O. A. Catalytic adsorptive stripping voltammetric measurements of trace vanadium at bismuth film electrodes. **Talanta**, v. 69, p. 914–917, 2006.

WARHURST, D. C.; The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity. **Biochemical Pharmacology**, 30, 3323, 1981.

WHITE, N. J.; OLLIARO, P. L.; Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: Rationale for combination chemotherapy for malaria. **Parasitology Today**, 12, 399-401, 1996.

WHO (World Health Organization). Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acessado em: 15/12/2003.

WILSON CUNICO; SAMIR A. CARVALHO; CLAUDIA R. B. GOMES & GABRIELA H. MARQUES. Antimalarials drugs. History and new approaches. **Revista Brasileira de Farmácia**, 89(1): 49-55, 2008

WINSTANLEY P.A., SIMOOYA O., KOFI-EKUE J.M., WALKER O., SALAKO L.A., EDWARDS G., ORME M.L., BRECKENRIDGE A.M., Br. The disposition of amodiaquine in Zambians and Nigerians with malaria. **Journal of Clinical Pharmacology**, 29, 695-701, 1990.

WOLF, M. E.; Burger's Medicinal Chemistry: The Basis of Medicinal Chemistry, Wiley: New York, 1980; Greenwood, D.; **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36, 857, 1995.

WOOLFOLK, M. W. Relations of sources of systemic fluoride to prevalence of dental fluorosis. **Journal of Public Health Dentistry**, 49, p. 78-81, 1989.

World Health Organization, 2005; Brazil: Overview of malaria control activities and programme progress; <<http://rbm.who.int/wmr2005/profiles/brazil.pdf>> acessado em 01/09/2009.

World Health Organization/Unicef. Breastfeeding and maternal medication. Recommendations for drugs in the eleventh WHO model list of essential drugs. [documento na Internet]. Genebra: WHO/Unicef; 2002 [citado em 2 de fevereiro de 2007]. Disponível em: http://www.who.int/child-adolescent-ealth/NewPublications/NUTRITION/BF_Maternal_Medication.pdf

ZHENG N. ; ZENG Y. ; OSBORNE P. G. ; LI Y. ; CHANG W. ; WANG Z. ;
Electrocatalytic reduction of dioxygen on hemin based carbon paste electrode,
Journal of applied electrochemistry, vol. 32, n^o2, pp. 129-133 (30 ref.), 2002

ZIMA J., C., STOICA AL, ZITOVA A., BAREK J. Voltammetric determination of
selected aminoquinolines using carbon paste electrode. **Electroanalysis**, 18 (2):
158-162, 2006.
