



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**EMPREGO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM  
BORO NA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE  
METOPROLOL E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM  
HIDROCLOROTIAZIDA**

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**EMPREGO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM  
BORO NA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE  
METOPROLOL E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM  
HIDROCLOROTIAZIDA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Salamanca Neto, Carlos Alberto Rossi.

Emprego do eletrodo de diamante dopado com boro na determinação voltamétrica de metoprolol e de sua associação com hidroclorotiazida / Carlos Alberto Rossi Salamanca Neto. - Londrina, 2017.

73 f.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Metoprolol - Tese. 2. Hidroclorotiazida - Tese. 3. Eletrodo de diamante dopado com boro - Tese. 4. Voltametria - Tese. I. Sartori Braz, Elen Julciléia Romão. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**EMPREGO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO NA  
DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE METOPROLOL E DE SUA  
ASSOCIAÇÃO COM HIDROCLOROTIAZIDA**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Química da Universidade Estadual de Londrina,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elen Julciléia Romão  
Sartori Braz  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andressa Galli  
Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO

---

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais  
Júlio Cesar e Arlete pelo incentivo e por  
me proporcionar condições para que eu  
seguisse em busca dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida e pelas oportunidades que tem me oferecido e por tudo de bom que tem me proporcionado. Sem Ele, nada sou!

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elen Romão Sartori, não só pela constante orientação, mas sobretudo pela sua amizade, carinho e tempo dedicado ao meu trabalho. E também aos conselhos e apoio para que eu continue sempre crescendo na vida acadêmica.

À Dra. Ieda Spacino Scarmínio, pela amizade e também pelo empréstimo da coluna cromatográfica para a análise das amostras pelo método comparativo e, ao laboratório DIA pela disponibilização do uso do cromatógrafo para a realização destas análises.

A meus pais Júlio César e Arlete, que não mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, pelas conversas, conselhos, companheirismo, e pelo apoio constante. Obrigado pelo amor incondicional, amo muito vocês!

Às minhas companheiras de casa e, em especial, à minha namorada Juliane, por sempre me apoiar, pelo carinho e respeito em todo esse período e, por entender que eu precisava me ausentar para a realização deste trabalho - obrigado pelas ótimas horas passadas ao seu lado, pelos conselhos e pelo amor. Eu amo muito você!

Aos companheiros de laboratório Ana Paula, Camila, Eduardo, Gabriel, Igor Rebech, Igor Ruiz, Jaqueline, Jessica, João e Max, pelo apoio e ajuda constantes. Pelas conversas e discussões que me ajudaram a interpretar os resultados desse trabalho e, sobretudo, pela amizade. Um agradecimento em especial para a Ana e Camila, por me ajudarem na redação da qualificação e desta dissertação.

Aos colegas do LQCN pela convivência durante a realização deste trabalho, conversas, trocas de experiências e amizade.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação do CCE, em especial à Regina, por todas as vezes em que precisei, estavam lá me ajudando prontamente em tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo auxílio financeiro durante este mestrado.

E, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, o meu muitíssimo obrigado!

## **TAKE UP CHEMISTRY**

If you wish to understand the fragrance of the  
    rose, or tenacity of the oak;  
if you are not satisfied until you know the  
secret paths by which the sunshine and the  
    air achieve these wonders;  
if you wish to see the pattern which  
    underlies one large field of human  
experience and human measurement,  
then take up chemistry. (C. A. Coulson)

SALAMANCA-NETO, Carlos Alberto Rossi. **Emprego do eletrodo de diamante dopado com boro na determinação voltamétrica de metoprolol e de sua associação com hidroclorotiazida.** 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A hipertensão é uma doença que atinge aproximadamente três em cada dez pessoas em todo o mundo. Para alguns pacientes a alteração de hábitos alimentares e físicos não é suficiente para uma redução da pressão arterial adequada, sendo necessário a administração de fármacos que reduzem a pressão arterial, os anti-hipertensivos. Como dosagens maiores ou menores estão diretamente relacionadas com perigosos efeitos colaterais e a ineficácia do tratamento, o controle da quantidade de fármacos presentes nos comprimidos é de extrema importância. Neste trabalho, um procedimento voltamétrico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) foi desenvolvido para a determinação de metoprolol (MTP) e de sua associação com hidroclorotiazida (HCTZ) sem a necessidade de uma etapa prévia de separação ou etapa de pré-concentração. Estes procedimentos são uma alternativa simples, sensível, rápida e econômica aos métodos cromatográficos além de serem ambientalmente favoráveis. Foram observados picos de oxidação bem definidos em 1,28 e 1,42 V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>)), para a HCTZ e MTP, respectivamente, em solução tampão Britton-Robinson (pH 2,0). No desenvolvimento dos métodos foram estudados o tipo de pré-tratamento do EDDB, o pH e o eletrólito suporte. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades indicaram que as reações para ambos anti-hipertensivos, na superfície do EDDB são controladas por difusão e os valores de coeficientes de difusão aparente foram obtidos por cronoamperometria. Com a utilização dos melhores parâmetros instrumentais das técnicas de voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial, curvas analíticas foram construídas obtendo um intervalo linear de concentração de 0,38 – 22 µmol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 0,034 µmol L<sup>-1</sup>, para o método de determinação do MTP e de 0,51 – 18,7 e 1,23 – 22,8 µmol L<sup>-1</sup>, com limites de detecção de 0,376 e 0,077 µmol L<sup>-1</sup> para a HCTZ e MTP, respectivamente no método de determinação simultâneo. Os métodos desenvolvidos foram aplicados na determinação individual de MTP e na determinação simultânea de HCTZ e MTP em amostras farmacêuticas sendo que os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes aos resultados obtidos utilizando um método cromatográfico comparativo, com 95 % de confiança.

**Palavras-chave:** Hidroclorotiazida. Metoprolol. Eletrodo de diamante dopado com boro. Voltametria. Comprimidos.

SALAMANCA-NETO, Carlos Alberto Rossi. **The employment of boron-doped diamond electrode in the voltammetric determination of metoprolol and of its association with hydrochlorothiazide.** 2017. 73 p. Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

Hypertension is a disease that affects approximately three in ten people around the world. For some patients, changes in dietary and physical habits are not sufficient to reduce blood pressure, and administration of antihypertensive drugs is necessary. As major or minor dosages are directly related to the dangerous side effects and ineffectiveness of the treatment, controlling the amount of drugs present in the tablets is of extreme importance. In this work, a voltammetric procedure using a boron doped diamond electrode (BDDE) was developed for a determination of metoprolol (MTP) and its association with hydrochlorothiazide (HCTZ) without needing a prior separation or preconcentration steps. These procedures are a simple, sensitive, fast and economical alternative to chromatographic methods besides being environmentally friendly. Well-defined oxidation peaks at 1.28 and 1.42 V (vs Ag/AgCl (3.0 mol L<sup>-1</sup> KCl)) were recorded for HCTZ and MTP, respectively, in Britton-Robinson buffer solution (pH 2.0). To the development of methods, the type of pretreatment of BDDE, pH and electrolyte support were studied. Cyclic voltammograms obtained at different scan rates indicate that the reactions of both antihypertensives, on BDDE surface, are controlled by diffusion and the values of apparent diffusion coefficients were obtained by chronoamperometry. With the use of the instrumental parameters of square wave and differential pulse technique, analytical curves were constructed with a linear concentration range of 0.38 – 22 µmol L<sup>-1</sup>, with a detection limit of 0.034 µmol L<sup>-1</sup>, for the MTP determination method, and of 0.51 – 18.7 and 1.23 – 22.8 µmol L<sup>-1</sup>, with detection limits of 0.376 and 0.077 µmol L<sup>-1</sup> for HCTZ and MTP, respectively in the simultaneous determination method. The methods were applied in the individual determination of MTP and the simultaneous determination of HCTZ and MTP in pharmaceutical samples and the obtained results were not statistically different from those obtained using a chromatographic comparative method at a 95 % confidence level.

**Key words:** Hydrochlorothiazide. Metoprolol. Boron doped diamond electrode. Voltammetry. Tablets.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Fórmula estrutural do MTP .....	18
<b>Figura 2</b>	– Fórmula estrutural da HCTZ.....	19
<b>Figura 3</b>	– Esquema da síntese de diamante pelo método DVQ.....	24
<b>Figura 4</b>	– Onda triangular correspondente à variação do potencial em relação ao tempo empregado na voltametria cíclica .....	28
<b>Figura 5</b>	– Variação das correntes faradaica e capacitiva após a aplicação de um pulso de potencial nas técnicas de pulso .....	31
<b>Figura 6</b>	– Variação do potencial em relação ao tempo na VPD com destaque os instantes nos quais ocorre a medida da corrente .....	32
<b>Figura 7</b>	– Variação do potencial em relação ao tempo na VOQ, onde estão marcados os instantes nos quais ocorre a medida da corrente .....	33
<b>Figura 8</b>	– Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, além do orifício para adição das alíquotas.....	36
<b>Figura 9</b>	– Fotografia do EDDB empregado nas determinações voltamétricas de MTP e HCTZ e MTP em formulações farmacêuticas: (1) filme de DDB, (2) contato elétrico (liga estanho/chumbo), (3) isolamento do eletrodo com resina epóxi Araldite, (4) camada de cobre. ....	37
<b>Figura 10</b>	– Voltamogramas cíclicos ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução tampão BR (pH 2,0), empregando um EBBD-PTC para (A) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ, (B) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP e (C) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, simultaneamente .....	41
<b>Figura 11</b>	– Voltamogramas cíclicos ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução tampão BR (pH 2,0) de $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, usando um EDDB-PTA (—) e um EDDB-PTC (—) .....	43
<b>Figura 12</b>	– Voltamogramas de onda quadrada de $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP usando um EDDB-PTC em solução tampão BR em pH 2,0 (—), 4,0 (—), 7,0 (—) e 9,0 (—). Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	44

<b>Figura 13</b> – Voltamogramas de onda quadrada de 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP usando um EDDB-PTC em diferentes soluções tampão em pH 4,0: (A) citrato, (B) Mc’Ilvaine, (C) acetato, (D) fosfato, (E) lactato e (F) BR. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	45
<b>Figura 14</b> – Voltamogramas de onda quadrada de 99,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP usando um EDDB-PTC em soluções tampão em pH 7,0: (—) fosfato e (—) BR. Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ Hz}$ , $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .....	46
<b>Figura 15</b> – Voltamogramas de onda quadrada para 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP em solução tampão lactato (pH 4,0) usando um EDDB-PTC (—), um EPG (—), um EPNTC (—) e um ECV (—). Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .....	47
<b>Figura 16</b> – Voltamogramas cíclicos (A) obtidos em solução tampão lactato (pH 4,0) de (i) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (ii) 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, e (B) obtidos em solução tampão BR (pH 7,0), de (iii) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, usando um EDDB-PTC em várias velocidades de varredura (a–j: 5–200 $\text{mV s}^{-1}$ ).....	48
<b>Figura 17</b> – Mecanismo proposto para a eletro-oxidação da HCTZ sugerido por Razak (2004) empregando um ECV.....	49
<b>Figura 18</b> – Mecanismo proposto para a eletro-oxidação do MTP sugerido por Zorluoglu e colaboradores (2013) empregando um ECV.....	50
<b>Figura 19</b> – Relação linear entre corrente de pico e raiz quadrada da velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos (A) obtidos em solução tampão lactato (pH 4,0) de (i) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (ii) 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, e (B) obtidos em solução tampão BR (pH 7,0) de (iii) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MTP, usando um EDDB-PTC em várias velocidades de varredura (a–j: 5–200 $\text{mV s}^{-1}$ ).....	51
<b>Figura 20</b> – Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão BR (pH 7,0) obtidos usando o EDDB-PTC para as seguintes concentrações de MTP: (1) 0, (2) 0,38, (3) 1,9, (4) 3,8, (5) 7,6, (6) 11, (7) 15, (8) 18 e (9) 22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD: $a = 125 \text{ mV}$ , $tm = 5 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .....	54

- Figura 21** – Curva analítica obtida por VPD, para o intervalo de concentração de MTP de 0,38 a 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ..... 55
- Figura 22** – Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão lactato (pH 4,0) para as seguintes concentrações de HCTZ: (1) 0, (2) 0,50, (3) 1,0, (4) 1,5, (5) 2,4, (6) 3,9, (7) 5,8, (8) 8,2, (9) 11, (10) 14, (11) 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de MTP: (1) 0, (2) 1,2, (3) 1,6, (4) 2,4, (5) 3,6, (6) 5,1, (7) 6,7, (8) 9,0, (9) 12, (10) 15, (11) 23  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD:  $a = 125 \text{ mV}$ ,  $tm = 3,5 \text{ ms}$  e  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  .....59
- Figura 23** – Curvas analíticas obtidas simultaneamente para a HCTZ e para o MTP, a partir dos voltamogramas de pulso diferencial.....59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de $E_p$ , $E_{p/2}$ , $E_p - E_{p/2}$ e $n$ obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos a $50 \text{ mV s}^{-1}$ , para a HCTZ e para o MTP.....	49
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros instrumentais da VOQ e VPD, avaliados para a determinação de MTP em solução tampão BR (pH 7,0).....	53
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros analíticos obtidos para a determinação individual de MTP por VPD e VOQ em solução tampão BR (pH 7,0) usando um EDDB-PTC.....	53
<b>Tabela 4</b> – Características dos procedimentos analíticos voltamétricos para a determinação de MTP previamente reportados em comparação ao procedimento proposto.....	56
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros instrumentais da VOQ e VPD, avaliados para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em solução tampão lactato(pH 4,0).....	57
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros obtidos para as curvas analíticas de HCTZ e MTP obtidas simultaneamente por VOQ e VPD usando o EDDB-PTC.....	58
<b>Tabela 7</b> – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes métodos para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em formulações farmacêuticas.....	61
<b>Tabela 8</b> – Resultados obtidos na determinação individual de MTP e na determinação simultânea de HCTZ e MTP em comprimidos com diferentes dosagens usando o método proposto e o método cromatográfico.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$a$	Amplitude
$\alpha$	Coeficiente de transferência eletrônica
$D_0$	Coeficiente de difusão
$E_p$	Potencial de pico
$E_{p/2}$	Potencial de meio pico
$\Delta E_s$	Incremento de potencial
BR	Britton-Robinson
CCDAE-UV	Cromatografia de camada delgada de alta eficiência com detecção espectrofotométrica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica
DDB	Diamante dopado com boro
DVQ	Deposição de vapor químico
EC	Eletroforese capilar
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
ECV-NTC	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono
ECV-NTC-NAF	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de nanotubos de carbono e nafion
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
EDDB-PTA	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente
EDDB-PTC	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente
EHgGP	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EPC-AFD	Eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido ferrocenodicarboxílico
EPG	Eletrodo de pasta de grafite
EPNTC	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono

EPNTC-BF	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado com benzoil-ferroceno
$f$	Frequência de onda quadrada
HCTZ	Hidroclorotiazida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de detecção
MTP	Tartarato de metoprolol
$n$	Número de elétrons
OMS	Organização Mundial da Saúde
$tm$	Tempo de modulação
$v$	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VRAdOQ	Voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada
VRAdPD	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	METOPROLOL .....	17
1.2	DETERMINAÇÃO DE MTP .....	18
1.3	HIDROCLOROTIAZIDA .....	19
1.4	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E MTP .....	19
1.5	MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS NA DETERMINAÇÃO DE HCTZ E MTP .....	21
1.6	FILMES DE DIAMANTE DOPADO COM BORO .....	23
1.7	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS .....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	PRODUTOS QUÍMICOS E SOLUÇÕES .....	35
3.2	EQUIPAMENTOS .....	36
3.3	PROCEDIMENTOS DE MEDIDAS .....	38
3.4	PREPARO DE AMOSTRAS .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1	COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE HCTZ E MTP SOBRE O EDDB .....	41
4.2	ESTUDOS DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE MTP E SUA ASSOCIAÇÃO COM HCTZ .....	42
4.3	ESTUDOS QUALITATIVOS E MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DE HCTZ E MTP .....	47
4.4	DETERMINAÇÃO DE MTP USANDO O EDDB-PTC .....	52
4.5	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E MTP USANDO O EDDB-PTC .....	56
4.6	APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE MTP E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM HCTZ EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS .....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a última atualização da Organização Mundial da Saúde (OMS) uma pressão arterial considerada normal possui o valor de 120 mmHg, quando o coração contrai (sístole), por 80 mmHg, quando o coração relaxa (diástole). Quando a pressão sistólica atinge um valor igual ou maior que 140 mmHg e/ou a diastólica atinge um valor maior ou igual a 90 mmHg e estes valores permanecem constantes a pressão arterial é considerada alta e o paciente é diagnosticado como hipertenso. Ainda segundo a OMS, mais de um em cinco adultos possuem hipertensão arterial, e esta condição e suas complicações são a causa de morte de mais de 9,4 milhões de pessoas, por ano, no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

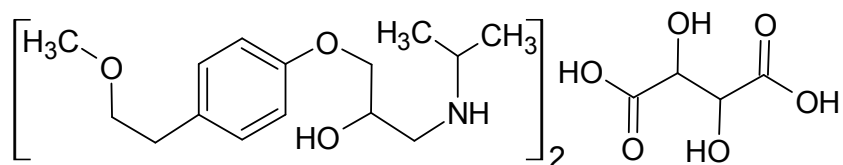
A hipertensão arterial pode ser controlada e/ou tratada por meio da mudança de hábitos alimentares e da prática de exercícios físicos, além de interromper o uso de drogas como álcool e cigarros. Entretanto, alguns pacientes ainda necessitam de um controle medicamentoso prescrito por médicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Anti-hipertensivos são drogas usadas para reduzir a pressão arterial e são administrados por pacientes hipertensos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Há muitas classes de anti-hipertensivos, os quais reduzem a pressão arterial agindo por diferentes mecanismos ou em diferentes locais de ação (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Algumas classes de anti-hipertensivos disponíveis são os diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio,  $\beta$ -bloqueadores, antagonistas dos receptores da angiotensina II e inibidores da enzima conversora da angiotensina.

### 1.1 METOPROLOL

O tartarato de metoprolol (MTP – tartarato de 1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil) fenoxi]propan-2-ol; Figura 1) é uma droga classificada como bloqueadora dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Por ser uma molécula com alta especificidade, o MTP é empregado no tratamento da hipertensão e outras doenças relacionadas ao coração como angina, além da possibilidade de prevenção e tratamento do infarto (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Em 2013, foi a 19ª droga mais comercializada nos Estados Unidos da América (DRUGS.COM, 2014).

**Figura 1.** Fórmula estrutural do MTP.



O MTP também pode melhorar a capacidade de relaxamento do coração, além de apresentar efeitos neurológicos tais como a diminuição da ansiedade e estabilização do desempenho motor. Entretanto, uma sobredosagem de MTP pode levar a broncoespasmo, insuficiência cardíaca, hipoglicemia, hipotensão, fadiga e ainda a possibilidade de levar a morte (SHORE; CEPIN; DAVIDSON, 1981; HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

## 1.2 DETERMINAÇÃO DE MTP

Como mostrado na seção anterior, o uso de uma dosagem diferente da recomendada compromete o tratamento e ainda pode ocasionar sérias complicações. Por isso, o teor de MTP no medicamento administrado deve ser controlado garantindo assim, uma redução ideal da pressão arterial.

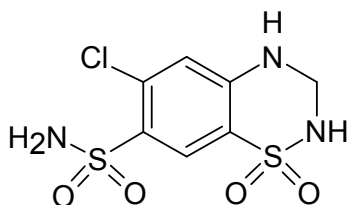
Até agora, a maioria dos métodos analíticos descritos na literatura para a determinação individual de MTP foram cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (CLAE-EM) (JOHNSON; LEWIS, 2006; JENSEN et al., 2008), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diferentes sistemas de detecção (FANG; SEMPLE; SONG, 2004; YILMAZ; ASCI; ARSLAN, 2010; YILMAZ et al., 2011; XU et al., 2013), cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (ZAK; HONC; GILLERAN, 1980; YANG et al., 1990) e por espectrometria de massa (YILMAZ; ARSLAN; AKBA, 2009), espectrofotometria de absorção ultravioleta (UV) (ALPDOĞAN; SUNGUR, 1999; PASSOS et al., 2008; YILMAZ, 2010; JADHAV; TARKASE; DESHPANDE, 2012), eletroforese capilar (EC) (WANG et al., 2011; WANG, 2015) e voltametria de redissolução adsortiva (DESAI; SRIVASTAVA, 2013; ZORLUOĞLU et al., 2013). O método oficial recomendado pela Farmacopeia Britânica para a determinação de MTP envolve o uso de CLAE (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013). A utilização desta técnica é preferida em relação às demais,

devido à possibilidade da determinação simultânea de MTP com outros anti-hipertensivos sem interferência.

### 1.3 HIDROCLOROTIAZIDA

Hidroclorotiazida (HCTZ – 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida; Figura 2) é um diurético tiazídico. A HCTZ atua nos rins aumentando a excreção de sódio, de cloreto e, conseqüentemente, de água (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Devido a isso, é empregado no tratamento da hipertensão e no tratamento de edemas.

**Figura 2.** Fórmula estrutural da HCTZ



A administração de uma sobredosagem de HCTZ pode ocasionar perda de fluidos e eletrólitos e os sintomas observados são tontura, diminuição do nível de consciência, hipotensão e câibras musculares (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

A HCTZ é comercialmente disponível em dosagens individuais ou em dosagens combinadas com, por exemplo, o MTP. Esta associação garante uma redução na pressão arterial mais intensificada do que o uso das drogas individualmente (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996; RANG et al., 2012), além de garantir maior comodidade ao paciente devido ao fato da ingestão de um único comprimido.

### 1.4 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E MTP

Como HCTZ e MTP são disponibilizados em dosagens combinadas, a quantidade de cada droga no comprimido deve ser controlada. Para isso, pode se fazer o uso de métodos individuais, um para determinação de HCTZ e outro para a

determinação de MTP. Entretanto, no desenvolvimento desses métodos individuais, não foram avaliadas a interferência de uma droga na determinação da outra e, por isso, são passíveis a erros. Ademais, gastar-se-ia muito tempo e muitos reagentes para a realização de duas análises individuais em um único comprimido. Segundo a literatura, a determinação simultânea de HCTZ e MTP ainda não está descrita em nenhuma farmacopeia (BRASIL, 2010; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013).

Um dos maiores desafios de uma determinação simultânea para duas drogas é justamente a necessidade da eliminação da interferência de uma droga na determinação da outra, por isso os métodos cromatográficos são os mais indicados, pois os analitos são previamente separados antes da detecção (BRIJESH; PATEL; GHOSH, 2009; GAO et al., 2010; RAWOOL; VENKATCHALAM, 2011; PHANI R S CH et al., 2013; ROTE; SONAVANE, 2013; TSVETKOVA; PEIKOVA, 2013). No entanto, esses métodos possuem uma instrumentação relativamente complexa e de alto custo, fazem uso de solventes de alto grau de pureza, além de possuírem um alto tempo de análise com tempos de retenção variando de 2,8 (GAO et al., 2010) a 11 minutos (RAWOOL; VENKATCHALAM, 2011) para o MTP.

Outros métodos também foram empregados para a determinação simultânea de HCTZ e MTP. A EC se mostrou eficaz na determinação simultânea de HCTZ e MTP sem interferência devido à etapa prévia de separação dos analitos. Porém, o tempo de cada análise é de aproximadamente 9 minutos, pois após a detecção dos analitos se fez necessário uma etapa de limpeza da coluna com duração de 5 minutos (ALNAJJAR et al., 2013).

Métodos espectrofotométricos também foram utilizados para a determinação simultânea de HCTZ e MTP (STOLARCZYK et al., 2006; GUPTA; TAJNE; WADODKAR, 2008). Os comprimentos de onda encontrados para a absorção da HCTZ e do MTP são muito próximos e uma droga acaba por interferir na determinação da outra. Sendo assim, o desenvolvimento desses métodos só foi possível devido ao tratamento matemático dos dados obtidos em cada análise, deixando a determinação simultânea mais complexa e demorada.

Mais recentemente, Vranic e Vendamme (2015) simularam um processo industrial para confeccionar comprimidos com dosagens combinadas de HCTZ e MTP. Foi empregado espectroscopia na região do infravermelho próximo para

a determinação de HCTZ e MTP diretamente no comprimido, sendo que o modelo de calibração foi baseado nos dados gravimétricos e espectrais. Esse método de análise rápida não pode ser utilizado nos comprimidos disponibilizados comercialmente, pois a calibração foi ajustada para massas que variavam de 18,0 a 42,0 mg de HCTZ e de 96,0 a 144 mg de MTP (VRANIC; VANDAMME, 2015).

### 1.5 MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS NA DETERMINAÇÃO DE HCTZ E MTP

Recentemente, métodos voltamétricos vem sendo cada vez mais empregados na determinação de drogas. Isto se deve às inúmeras vantagens destes métodos frente aos tradicionalmente empregados para este tipo de análise (ŠELEŠOVSKÁ; JANÍKOVÁ-BANDŽUCHOVÁ; CHÝLKOVÁ, 2015; BRYCHT et al., 2016; COSTA et al., 2016; WU et al., 2016; MATTOS et al., 2017). O emprego de técnicas eletroanalíticas como a voltametria permite o desenvolvimento de metodologias analíticas simples, rápidas, precisas, sensíveis, de relativo baixo custo e que muitas vezes emprega o mínimo de reagentes tóxicos ao ambiente. Ademais, a técnica voltamétrica possibilita análises de amostras que apresentam partículas suspensas sem a necessidade de etapas prévias de preparo ou tratamento amostral.

Apesar destas características, há poucos relatos na literatura para a determinação voltamétrica de MTP. Desai e Srivastava (2013) empregaram um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com nanocompósito de nanotubos de carbono e nafion (ECV-NTC-NAF) e voltametria de redissolução na determinação de MTP em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos como soro e urina. A relação entre corrente e concentração foi linear no intervalo de concentração de 0,070 a 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e o limite de detecção (LD) obtido foi 0,035  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (DESAI; SRIVASTAVA, 2013). Em outro trabalho, métodos voltamétricos com e sem redissolução adsortiva juntamente com um eletrodo de mercúrio de gota pendente (EHgGP) ou um ECV foram aplicados para a determinação de MTP em formulações farmacêuticas e amostras de urina humana dopada. O menor LD foi obtido utilizando o ECV juntamente com voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada (VRAdOQ) e seu valor foi de 0,020  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (ZORLUOĞLU et al., 2013).

Para a HCTZ, alguns eletrodos, com ou sem modificação, foram utilizados como eletrodo de trabalho para sua determinação voltamétrica em

formulações farmacêuticas e amostras biológicas. O ECV foi empregado para avaliar o comportamento voltamétrico e também para a determinação de HCTZ em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos, obtendo um LD de 17 nmol L<sup>-1</sup> (RAZAK, 2004) e 4,3 nmol L<sup>-1</sup> (ALGHAMDI, 2014). O comportamento da oxidação eletroquímica da HCTZ também foi estudado utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ácido ferrocenodicarboxílico (EPC-AFD) (KARIMI-MALEH; ENSAFI; ENSAFI, 2009) e um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado com benzoil-ferroceno (EPNTC-BF) (BEITOLLAHI; GHORBANI, 2013), e a determinação de HCTZ obteve valores de LD de 37 e 90 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Um método voltamétrico de redissolução adsortiva empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multicamadas (ECV-NTC) foi usado na determinação de HCTZ em amostras farmacêuticas. Este eletrodo apresentou atividade eletrocatalítica para a reação de oxidação da HCTZ e o LD obtido, foi de 0,8 nmol L<sup>-1</sup> (REZAEI; DAMIRI, 2008).

A determinação de HCTZ simultaneamente a alguns outros anti-hipertensivos já vem sendo relatada na literatura. Um método voltamétrico empregando um eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente (EDDB-PTA) foi usado para determinação de HCTZ e losartana em amostras farmacêuticas e os LD obtidos foram 1,2 e 0,95 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (SANTOS et al., 2013). Um eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente (EDDB-PTC) foi utilizado para determinar, simultaneamente, HCTZ, anlodipino e valsartana com valores de LD de 0,75, 0,23 e 6,2 µmol L<sup>-1</sup> (MANSANO; EISELE; SARTORI, 2015). Em outro trabalho, um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (EPNTC) foi empregado para determinar HCTZ e enalapril. O EPNTC apresentou atividade eletrocatalítica quando comparado ao ECV, diminuindo o potencial de oxidação de ambas as drogas e promovendo um aumento da corrente, tanto da HCTZ quanto do enalapril, cujo LD obtidos foram 14 e 41 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (SALAMANCA-NETO et al., 2015).

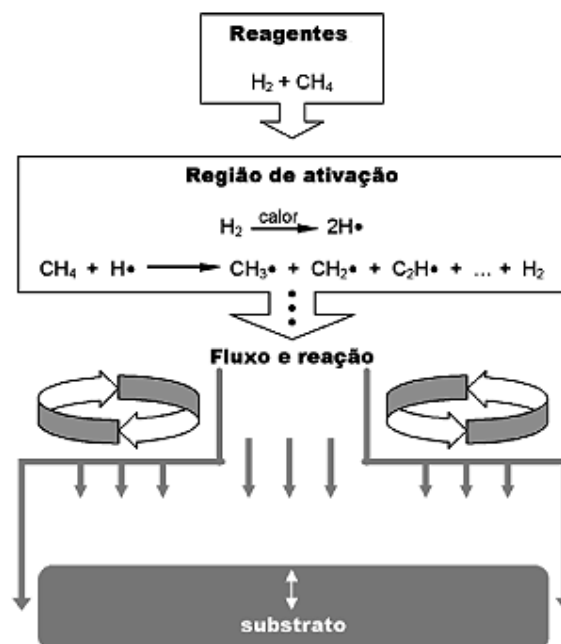
Cabe enfatizar que a determinação voltamétrica simultânea de HCTZ e MTP ainda não havia sido descrita na literatura antes da realização deste trabalho.

## 1.6 FILMES DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

O diamante é um mineral raro e de alta resistência mecânica. Ele é empregado em diversos setores industriais, e devido ao seu alto valor comercial, muitos cientistas buscavam sua síntese em laboratório (BANNISTER; LONSDALE, 1943). No início da década de 50, Willian Eversole, por meio da técnica de deposição de vapor químico (DVQ) conseguiu produzir diamante sintético sobre uma gema de diamante natural (ANGUS, 2014). Na metade da mesma década, a empresa *General Electric* apresentou um novo método de crescimento de diamante sintético, por alta pressão/alta temperatura. Este método é o que mais se assemelha à formação natural de diamante, entretanto, não é o mais utilizado. Ambos os métodos foram sendo aprimorados e atualmente a DVQ é o método mais empregado para crescimento de diamante sintético sobre diversos substratos, sendo que na escolha do substrato se leva em consideração o seu coeficiente de dilatação térmica, pois se os coeficientes de dilatação térmica do substrato e do diamante sintético forem muito distintos, podem ocorrer fissuras no filme produzido quando de sua retirada do reator em temperaturas elevadas (BARROS et al., 2005). A DVQ se baseia no crescimento de diamante sintético a partir de uma mistura de um hidrocarboneto (por exemplo metano) com excesso de hidrogênio (Figura 3). O processo ocorre num reator sob pressões baixas na ordem de 10 a 50 matm, onde a reação é ativada termicamente ou por meio de radiação, sendo que a deposição ocorre sobre um substrato, formando uma rede cristalina de carbono (SILVA et al., 1999; BARROS et al., 2005).

O diamante sintético possui quase que as mesmas propriedades físico-químicas do diamante natural. Algumas delas são alta dureza, alto ponto de fusão, estabilidade química e possuem uma energia de band-gap de aproximadamente 5,45 eV (FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; KRAFT, 2007). Esta última propriedade está relacionada com a capacidade da condutividade eletrônica do material, sendo o diamante um isolante, não atraiu atenção para seu uso na eletroanálise.

**Figura 3.** Esquema da síntese de diamante pelo método DVQ.



**Fonte:** Adaptado de (BARROS et al., 2005).

A adição de impurezas à rede cristalina do diamante causa uma mudança nas suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, a adição de átomos de nitrogênio e fósforo causa uma diminuição da energia de band-gap para valores de 1,6 e 0,6 eV, respectivamente, alterando de isolante para semicondutor do tipo n. Já a adição de átomos de boro, a energia de band-gap, neste caso, é de 0,37 eV e o material é classificado como semicondutor do tipo p (BARROS et al., 2005; KRAFT, 2007). Dependendo do nível de dopagem o diamante dopado com boro (DDB) pode adquirir características metálicas (FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; PLESKOV, 2000; HUPERT et al., 2003).

Diversas fontes de boro já foram empregadas para o crescimento de filmes de DDB tais como hidreto de boro ( $B_2H_6$ ), trióxido de diboro ( $B_2O_3$ ) e trimetilboro ( $B(CH_3)_3$ ) (FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; SILVA et al., 1999; BARROS et al., 2005). O hidreto de boro pode ser empregado sem a necessidade de uma dissolução prévia; entretanto, é altamente tóxico e explosivo. Já o trióxido de diboro e o trimetilboro são compostos mais estáveis e não tóxicos, porém necessitam que sejam dissolvidos em acetona ou metanol para posterior adição ao reator. A introdução de solventes como

acetona e metanol acarretam um fornecimento de oxigênio à mistura reacional, o que pode mudar a estrutura final do filme de DDB (HUPERT et al., 2003).

A quantidade de boro pode ser controlada obtendo assim filmes de DDB com diversas concentrações de boro, as quais estão diretamente relacionadas com a resistividade do filme produzido. Geralmente, as concentrações de boro variam de 500 a 10000 ppm ou  $10^{19}$  a  $10^{21}$  átomos  $\text{cm}^{-3}$  (BAIRU; STEFAN; VAN STADEN, 2003; KRAFT, 2007).

Devido às propriedades físicas e mecânicas, os filmes de diamante sintéticos possuem uma ampla gama de aplicações em diversas áreas da tecnologia. Já, os filmes de DDB, por apresentarem uma baixa energia de band-gap e serem classificados como semicondutores do tipo p, podem ser empregados como eletrodos para diversos fins (SWAIN; RAMESHAM, 1993; BAIRU; STEFAN; VAN STADEN, 2003; BARROS et al., 2005). As primeiras publicações, as quais avaliaram as propriedades eletroquímicas dos filmes de DDB, datam do final da década de 80 e começo da década de 90 (FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; PLESKOV; SAKHAROVA; KROTOVA, 1987; SAKHAROVA; NYIKOST; PLESKOV, 1992; SWAIN; RAMESHAM, 1993; TENNE et al., 1993; SWAIN, 1994). Esses filmes apresentaram propriedades únicas quando comparados aos outros eletrodos carbonáceos já comumente utilizados, como o ECV, eletrodo de grafite pirolítico e eletrodo de pasta de carbono (EPC). Dentre as características do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), destacam-se uma alta estabilidade eletroquímica e resistência à corrosão, uma corrente de fundo baixa e estável, em uma ampla janela de potencial de trabalho, de aproximadamente 3,5 V em meio aquoso (entre as reações de desprendimento de hidrogênio e oxigênio (SALAZAR-BANDA et al., 2006), com a possibilidade de determinar eletroquimicamente analitos que possuem altos potenciais catódicos como atrazina que apresentou um pico de redução em -1,1 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) (ŠVORC; RIEVAJ; BUSTIN, 2013) e etionamida que apresentou pico de redução em -0,95 V vs Ag/AgCl (KCl saturado) (FERRAZ et al., 2016) e também em altos potenciais anódicos como ácido acetilsalicílico (SARTORI et al., 2009), orfenadrina (EISELE et al., 2013), ramipril (MATTOS et al., 2017), e enalapril (LOURENCAO; MEDEIROS; FATIBELLO-FILHO, 2015), que apresentaram potenciais de oxidação de 1,97, 1,67, 1,67 e 1,75 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ), respectivamente.

Uma das características mais interessantes do EDDB é a possibilidade de se trabalhar em superfícies com diferentes terminações, principalmente em hidrogênio e oxigênio. O filme de DDB, ao ser fabricado, possui predominantemente suas terminações em hidrogênio (SILVA et al., 1999; BAIRU; STEFAN; VAN STADEN, 2003; HUPERT et al., 2003) e, para alterar a terminação para oxigênio, o filme era submetido a uma polarização anódica em meio ácido, já para retornar para a terminação em hidrogênio, o filme era submetido a um plasma de hidrogênio (GRANGER; SWAIN, 1999). Suffredini e colaboradores (2004), em um trabalho pioneiro, estudaram a influência das terminações em oxigênio e hidrogênio na reação de oxirredução do par ferrocianeto/ferricianeto de potássio, sendo que estas diferentes terminações foram obtidas a partir de pré-tratamentos eletroquímicos: a terminação em oxigênio foi obtida a partir da, já empregada, polarização anódica seguida de uma inédita polarização catódica para se obter a terminação em hidrogênio (SUFFREDINI et al., 2004). Entretanto, Salazar-Banda e colaboradores (2006) perceberam que quando o filme de DDB terminado em hidrogênio era exposto ao oxigênio atmosférico, a porcentagem de hidrogênio na sua superfície diminuía devido à oxigenação provocada pelo próprio ar. Desta forma, para se garantir a mesma superfície em todas as análises, garantindo assim uma análise reprodutível, o EDDB deve ser submetido ao pré-tratamento anódico, seguido de um pré-tratamento catódico em todo dia de trabalho.

Com o passar dos anos, o tratamento eletroquímico foi aprimorado, e diferentes densidades de corrente foram utilizadas. Katsuki e colaboradores (1998) evidenciaram um desgaste da superfície do EDDB devido a uma severa polarização anódica de  $2 \text{ A cm}^{-2}$  (KATSUKI et al., 1998). O tratamento eletroquímico ainda vem sendo alvo de estudos de pesquisadores onde a recomendação é empregar densidades de corrente cada vez menores, de forma a assegurar uma maior vida útil aos eletrodos (BROCENSCHI et al., 2016).

O EDDB tem sido empregado em conjunto com muitas técnicas eletroanalíticas para o desenvolvimento de metodologias para a determinação de drogas (ŠVORC et al., 2012; EISELE et al., 2013; SANTOS et al., 2013; GUEDES et al., 2015; MANSANO; SARTORI, 2015; NIGOVIĆ; MORNAR; ZAVRŠKI, 2015; BRYCHT et al., 2016).

Por causa da hidrofobicidade, o EDDB-PTC, que possui a superfície terminada em hidrogênio, é resistente a desativação e incrustação causada principalmente por adsorção de moléculas polares, levando a medidas mais repetíveis (HUPERT et al., 2003). Entretanto, a interação entre os diversos analitos e as diferentes superfícies ainda não está bem estabelecida na literatura, portanto, a interação entre as diferentes terminações da superfície do EDDB com o analito, espécie em estudo, devem ser avaliadas eletroquimicamente.

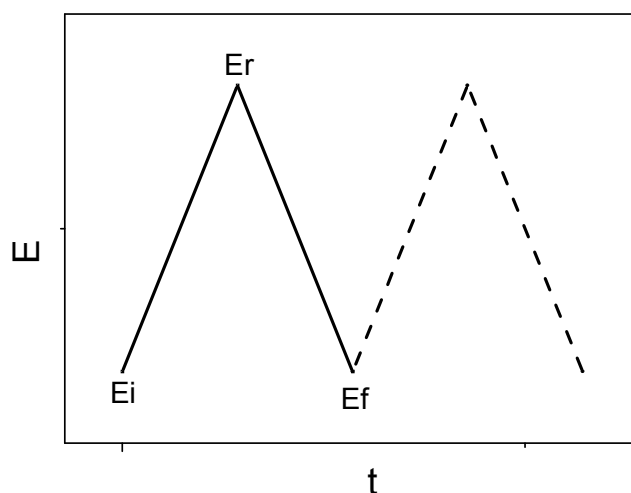
## 1.7 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

A eletroanalítica compreende um conjunto de técnicas que relacionam medidas de propriedades elétricas da solução de um analito, tais como corrente, potencial e carga; com suas propriedades químicas, como concentração. Com o emprego destas técnicas, mais especificamente as voltamétricas, houve a possibilidade de se alcançar valores de LD excepcionalmente baixos para uma série de analitos tais como 14 nmol L<sup>-1</sup> para a HCTZ e 41nmol L<sup>-1</sup> para o enalapril (SALAMANCA-NETO et al., 2015), 49 nmol L<sup>-1</sup> para o anlodipino (VALEZI et al., 2014), 6,3 nmol L<sup>-1</sup> para o imatinibe (BRYCHT et al., 2016), 20 nmol L<sup>-1</sup> para o nifedipino (YANG et al., 2014) e 10 nmol L<sup>-1</sup> para o metotrexato (ŠELEŠOVSKÁ; JANÍKOVÁ-BANDŽUCHOVÁ; CHÝLKOVÁ, 2015). Ademais, o nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Eletroanalítica e Sensores – LAES) vem fazendo uso desta técnica para determinação de moléculas orgânicas, principalmente anti-hipertensivos (EISELE et al., 2013; SANTOS et al., 2013; VALEZI et al., 2014; EISELE; SARTORI, 2015; MANSANO et al., 2015; MANSANO; EISELE; SARTORI, 2015; SALAMANCA-NETO et al., 2015; SCREMIN; KARIMI-MALEH; SARTORI, 2015; MORAES et al., 2016; MATTOS et al., 2017).

O uso de técnicas voltamétricas possibilita a obtenção de uma grande variedade de informações que podem descrever e caracterizar determinados sistemas. A voltametria cíclica (VC), por exemplo, é uma ferramenta muito utilizada para obtenção de dados qualitativos das reações eletroquímicas. Na maioria das vezes, é o primeiro experimento a ser realizado quando se quer investigar o comportamento voltamétrico dos analitos sobre os eletrodos (ARISTOV; HABEKOST, 2015).

Na VC, o potencial aplicado à célula eletroquímica varia linearmente na forma de onda triangular. A varredura de potencial inicia a partir de um potencial inicial ( $E_i$ ) aumentando até alcançar um potencial definido como potencial de retorno ( $E_r$ ), no qual há a inversão do sentido de varredura, onde ocorre uma nova varredura de potencial, no sentido inverso, até um potencial final ( $E_f$ ), que pode ou não ser o mesmo do potencial inicial. Este processo corresponde a um ciclo de varredura (Figura 4).

**Figura 4.** Onda triangular correspondente à variação do potencial em relação ao tempo empregado na voltametria cíclica.



A partir dos voltamogramas cíclicos, pode-se indentificar características das reações eletroquímicas como reversibilidade, quasi-reversibilidade ou irreversibilidade que estão relacionadas com a velocidade de reação e sua constante  $k$ . Se a reação é reversível, ela possui uma alta velocidade e consequentemente um alto valor de  $k$ . Sabendo-se então sobre a reversibilidade do processo, pode-se estimar o número de elétrons a partir de cálculos teóricos específicos para cada condição de reversibilidade (GREEF et al., 1985; GOSSER, 1993; WANG, 2000; BARD; FAULKNER, 2001). Por exemplo, para reações reversíveis, a equação utilizada no cálculo de número de elétrons é:

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (1)$$

onde  $E_{pa}$  é o potencial de pico anódico,  $E_{pc}$  é o potencial de pico catódico e  $n$  é o número de elétrons. Já para sistemas irreversíveis emprega-se a equação a seguir:

$$E_p - E_{p/2} = \frac{47,7 \text{ mV}}{\alpha n} \quad (2)$$

onde  $E_p/V$  é o potencial de pico podendo ser anódico ou catódico,  $E_{p/2}/V$  é o potencial cujo valor da corrente é a metade do valor da corrente para  $E_p$ ,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga.

A velocidade de varredura pode assumir qualquer valor, e está diretamente relacionada com a corrente obtida segundo a equação de Randles-Sevick (NICHOLSON; SHAIN, 1964; GOSSER, 1993; WANG, 2000; BARD; FAULKNER, 2001; ARISTOV; HABEKOST, 2015) para sistemas reversíveis:

$$I_p = 2,69 \times 10^{-5} \times n^{2/3} \times A \times D_0^{1/2} \times v^{1/2} \times C_0 \quad (3)$$

e, para sistemas irreversíveis:

$$I_p = 2,69 \times 10^{-5} \times n^{2/3} \times \alpha^{1/2} \times A \times D_0^{1/2} \times v^{1/2} \times C_0 \quad (4)$$

onde  $I_p$  (A) é a corrente de pico, podendo ser catódica ou anódica,  $n$  é o número de elétrons da reação eletroquímica,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga,  $A$  (cm<sup>2</sup>) é a área eletroativa do eletrodo,  $D_0$  (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) é o coeficiente de difusão da espécie envolvida,  $v$  (V s<sup>-1</sup>) é a velocidade de varredura e  $C_0$  (mol cm<sup>-3</sup>) é a concentração da espécie envolvida.

Com o emprego da VC, conhecendo a reversibilidade ou irreversibilidade do sistema estudado e fazendo o uso adequado destas equações, é possível conhecer algumas características dos componentes envolvidos na análise, tais como a área eletroativa dos eletrodos e os coeficientes de transferência de carga e de difusão do analito sobre determinado eletrodo.

Além disso, a VC também é usada para avaliar o mecanismo de transporte de massa das espécies em solução. Para isso, a partir de um conjunto de

voltamogramas obtidos em diferentes velocidades, avalia-se a relação entre corrente, potencial e velocidade, de modo que os parâmetros de linearidade entre elas evidenciam o comportamento das espécies quando estão se movimentando do seio da solução para a superfície do eletrodo. Os seguintes testes diagnósticos podem ser feitos para avaliar o mecanismo característico da reação eletroquímica:

- Avaliar a linearidade entre as variáveis  $I_p$  e  $v$ .
- Avaliar a linearidade entre as variáveis  $I_p$  e  $v^{1/2}$ .
- Avaliar o coeficiente angular da reta obtida pela relação entre  $\log I_p$  e  $\log v$ .

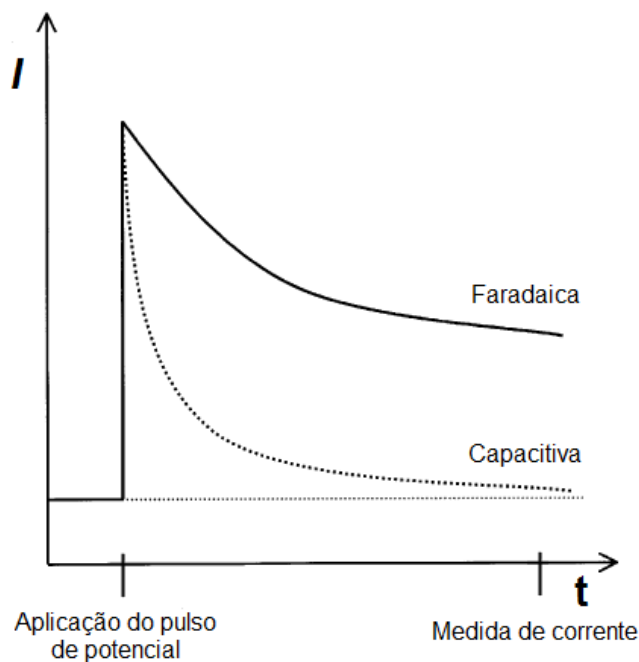
Para sistemas controlados por adsorção, se observa linearidade entre as variáveis  $I_p$  e  $v$  e o valor de  $\frac{d \log I_p}{d \log v}$  se aproxima do valor 1, enquanto que para sistemas controlados por difusão, a linearidade é observada para a relação entre  $I_p$  e  $v^{1/2}$  e  $\frac{d \log I_p}{d \log v}$  assume um valor próximo de 0,5 (GOSSER, 1993; CHRISTENSEN; HAMNETT, 1994).

Além disso, no estudo da velocidade de varredura, um deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos ou o deslocamento do potencial de redução para valores mais negativos, conforme a velocidade de varredura aumenta, é característico de reações irreversíveis, enquanto que para as reações reversíveis, o potencial permanece constante com a variação da velocidade de varredura (NICHOLSON; SHAIN, 1964; BRETT; BRETT, 1993; GOSSER, 1993; CHRISTENSEN; HAMNETT, 1994).

Apesar da VC ser a técnica mais empregada para análises exploratórias de sistemas eletroquímicos, outras técnicas voltamétricas são empregadas para análises quantitativas. As técnicas voltamétricas de pulso, como voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD) possuem uma maior sensibilidade do que a VC, devido à minimização da interferência da corrente capacitiva na medida da corrente faradaica (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). A corrente capacitiva decorre da simples polarização dos eletrodos na célula eletroquímica, já a faradaica é a corrente originada pelo fluxo de elétrons envolvidos na reação eletródica. Nas técnicas de pulso, no momento de aplicação do pulso de potencial, há um aumento no valor de ambas correntes, sendo

que há uma maior contribuição da corrente capacitiva na corrente total medida. Esta corrente possui uma taxa de decaimento com o tempo maior que a corrente faradaica, então a medida de corrente pode ser realizada após um intervalo de tempo, no qual a contribuição da corrente capacitiva pode ser negligenciada, e então somente a corrente faradaica é medida (Figura 5) (BRETT, 1993; SCHOLZ, 2010).

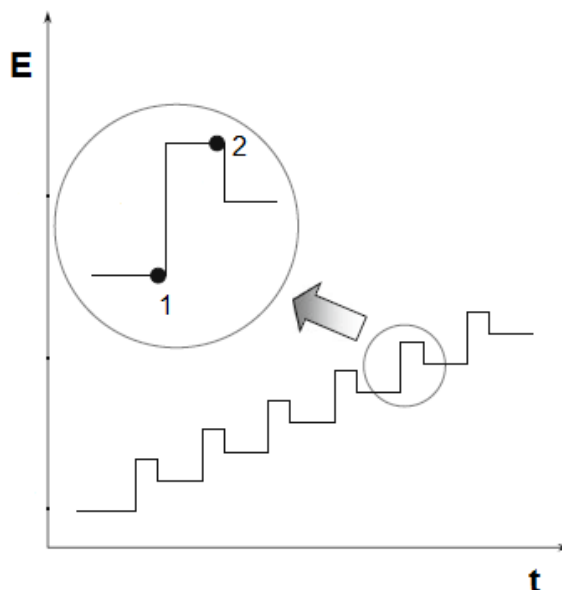
**Figura 5.** Variação das correntes faradaica e capacitiva após a aplicação de um pulso de potencial nas técnicas de pulso.



**Fonte:** Adaptado de (SCHOLZ, 2010)

Na VPD, a aplicação de pulsos de potencial de igual amplitude ( $a$ ) ocorre sobre uma rampa linear ou escada de potencial em intervalos de tempo e velocidade constantes (Figura 6). A corrente é medida imediatamente antes dos pulsos serem aplicados, ocorrendo uma subtração entre as correntes obtidas ( $I_2 - I_1$ ), que são plotadas contra o potencial aplicado para gerar os voltamogramas.

**Figura 6.** Variação do potencial em relação ao tempo na VPD com destaque os instantes nos quais ocorre a medida da corrente.

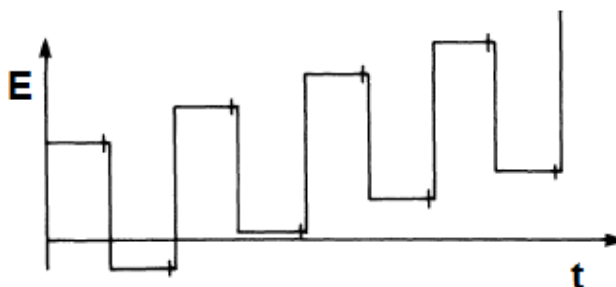


**Fonte:** Adaptado de (SCHOLZ, 2010).

A técnica de VPD, na maioria das vezes, é empregada em velocidades menores que  $20 \text{ mV s}^{-1}$  e já foi empregada principalmente em determinações de espécies que apresentaram uma reação eletroquímica irreversível sob o eletrodo empregado, tais como HCTZ e losartana (SANTOS et al., 2013), oxcarbazepina (ABOLHASANI; HOSSEINI; KHANMIRI, 2014), diclofenaco (YILMAZ et al., 2015), aciclovir (DILGIN; KARAKAYA, 2016) e ticlopidina (REBECH et al., 2016).

Outra técnica de pulso que também é muito empregada para análise quantitativa é a VOQ. Nela os pulsos de potencial de mesma amplitude são aplicados numa frequência ( $f$ ) sobre uma escada de potencial de incremento de potencial ( $\Delta E_S$ ) definido como esquematizado na Figura 7.

**Figura 7.** Variação do potencial em relação ao tempo na VOQ, onde estão marcados os instantes nos quais ocorre a medida da corrente.



**Fonte:** Adaptado de (BRETT; BRETT, 1993)

A principal diferença entre a VOQ e a VPD é devido à aplicação de pulso de potencial no sentido reverso da varredura. Desta forma, na VOQ a corrente é medida no final de cada pulso de potencial, tanto no sentido direto, quanto no sentido reverso, sendo que essas correntes são subtraídas e plotadas contra o potencial aplicado para dar origem ao voltamograma. Ademais a VOQ é mais rápida que a VPD, podendo atingir velocidades de até  $1000 \text{ mV s}^{-1}$ , entretanto altas velocidades podem comprometer o sinal analítico de analitos com cinética de reação lenta (reações irreversíveis). Devido à medida de uma corrente resultante, com a contribuição das correntes de oxidação e de redução, esta técnica é aplicada principalmente na determinação de espécies que apresentam reações eletroquímicas reversíveis (cinética de reação rápida) tais como dopamina (RAJ; TOKUDA; OHSAKA, 2001; TIAN et al., 2012), penicilina V (ŠVORC et al., 2012) e triptamina (COSTA et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Empregar o EDDB para desenvolver uma metodologia voltamétrica para a determinação de MTP e outra para a determinação simultânea de HCTZ e MTP.

Aplicar as metodologias desenvolvidas na análise de produtos farmacêuticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empregar a VC para estudos exploratórios do comportamento voltamétrico da HCTZ e do MTP.

Estudar a influência do tipo de pré-tratamento do EDDB no perfil voltamétrico de HCTZ e MTP.

Avaliar o EDDB como eletrodo de trabalho para a determinação de MTP e de sua associação com HCTZ, comparando-o com outros eletrodos à base de carbono.

Investigar o melhor valor de pH e o melhor eletrólito suporte para a determinação de MTP e de HCTZ e MTP.

Empregar VC para calcular o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica da HCTZ e do MTP, além de caracterizar o tipo de transporte de massa durante a reação eletroquímica e propor os mecanismos de reação.

Avaliar as técnicas voltamétricas de pulso VPD e VOQ para a construção de curvas analíticas para a determinação de MTP e de sua associação com HCTZ.

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras analisadas e determinar os anti-hipertensivos empregando voltametria e EDDB.

Empregar testes estatísticos como  $F$  e  $t$  para comparar os resultados obtidos a partir da técnica voltamétrica com os resultados obtidos a partir de uma técnica cromatográfica reportada na literatura.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PRODUTOS QUÍMICOS E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade = 18,2 M $\Omega$  cm, proveniente de um sistema Milli-Q (Millipore®). HCTZ e MTP foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os ácidos acético, bórico, cítrico, láctico e fosfórico, hidróxido de sódio e metanol foram obtidos da Synth.

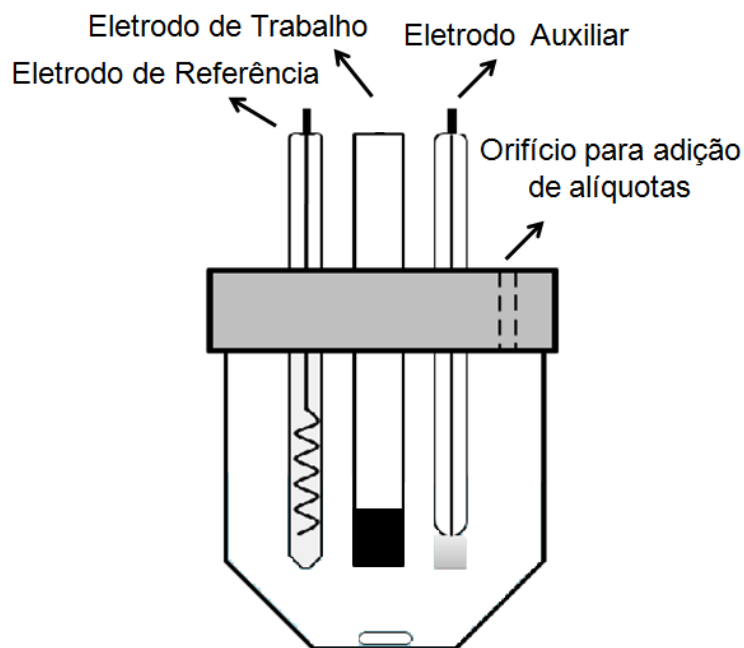
Para os estudos iniciais e estudo do melhor pH do eletrólito suporte, foi utilizada a solução tampão Britton-Robinson (BR). Esta solução tampão foi preparada adicionando 2,3 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v), 2,7 mL de ácido acético 99,9 % (v/v) e aproximadamente 2,5 g de ácido bórico 99,9 % (m/m) a um balão volumétrico de 1,0 L, com volume completado com adição de água ultrapura. O pH da solução tampão BR foi ajustado com a adição de uma solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup>. A solução tampão BR foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação de MTP, sendo o pH ajustado para 7,0, e a solução tampão lactato foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação simultânea de HCTZ e MTP. A solução tampão lactato foi preparada adicionando 4,1 mL de ácido láctico 90 % (v/v) em um balão volumétrico de 500,0 mL com o volume completado com água ultrapura, e o pH ajustado para 4,0 com a adição de uma solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup>.

As soluções estoque de HCTZ e MTP foram preparadas na concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup> utilizando metanol. As soluções de trabalho nas concentrações de 1000 e 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> foram preparadas pela diluição das soluções estoque de HCTZ e MTP com as respectivas soluções escolhidas como eletrólito suporte, solução tampão BR (pH 7,0) para a determinação de MTP e solução tampão lactato (pH 4,0) para a determinação simultânea de HCTZ e MTP. As soluções estoque, bem como, as soluções de trabalho foram preparadas nos dias dos experimentos.

### 3.2 EQUIPAMENTOS

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica de compartimento único com três eletrodos, incluindo uma placa de platina ( $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ ) como eletrodo auxiliar, um Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) como eletrodo de referência, o qual se referem todos os potenciais apresentados na sequência, e um EDDB como eletrodo de trabalho (Figura 8). O filme de diamante dopado com 8000 ppm de boro foi obtido da Adamant (Suíça). O EDDB foi preparado soldando a base de silício do filme de DDB (que contém uma fina camada de ouro) na extremidade de uma haste contendo cobre (placa de circuito eletrônico) de 10 cm de comprimento, 0,5 cm de largura e 0,1 cm de espessura, sendo isolado com resina epóxi (Araldite®), para que somente a superfície do filme de DDB ficasse exposta para as medidas eletroquímicas, apresentando dessa forma, uma área de  $0,28 \text{ cm}^2$  (Figura 9).

**Figura 8.** Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, além do orifício para adição das alíquotas.



**Fonte:** o próprio autor.

**Figura 9.** Fotografia do EDDB empregado nas determinações voltamétricas de MTP e HCTZ e MTP em formulações farmacêuticas: (1) filme de DDB, (2) contato elétrico (liga estanho/chumbo), (3) isolamento do eletrodo com resina epóxi Araldite, (4) camada de cobre.



**Fonte:** (SARTORI, 2009).

As medidas voltamétricas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato FRAII  $\mu$ AUTOLAB tipo III (Metrohm Autolab B.V., Holanda) controlado pelo software General Purpose Electrochemical System - GPES.

Um potenciostato/galvanostato MPEG 2 (Microquímica, Brasil), operando no modo galvanostático, foi utilizado para a realização do pré-tratamento do EDDB. Primeiramente, o EDDB foi pré-tratado anodicamente em uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com a aplicação de uma densidade de corrente de  $+0,5 \text{ A cm}^{-2}$  durante 30 s, seguido da aplicação de  $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$  durante 120 s deixando a superfície do EDDB terminada predominantemente em hidrogênio (SUFFREDINI et al., 2004; KRAFT, 2007). Devido à perda de hidrogênio da superfície do EDDB, pelo contato com o oxigênio do ar (SALAZAR-BANDA et al., 2006), o pré-tratamento catódico foi realizado no início de cada dia de experimentos, precedido do anódico.

Um ECV (Tokay Carbon Co., Japão), um EPNTC e um eletrodo de pasta de grafite (EPG), todos com área superficial de  $0,0707 \text{ cm}^2$ , foram utilizados para fins de comparação. Antes do uso, o ECV foi mecanicamente polido com alumina em pó ( $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ ) e depois foi lavado com água ultrapura. O EPNTC e EPG foram preparados utilizando óleo mineral como já descrito por Salamanca-Neto (2015), obtendo uma pasta com 30 % (m/m) de nanotubos de carbono multicamadas no EPNTC e uma pasta com 70 % (m/m) de grafite no EPG.

O pH foi medido a  $25,0 \pm 1,0^\circ \text{C}$  usando um pHmetro HI-221 (Hanna Instruments, Estados Unidos da América), empregando um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de  $\text{Ag/AgCl}$  ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) como referência externa.

As determinações de MTP e de HCTZ e MTP por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido LC (Shimadzu, Japão) acoplado a um sistema com uma bomba de duplo pistão LC-20AT, um injetor automático SIL-20AC e um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20. As condições de separação cromatográfica foram realizadas de acordo com um trabalho prévio (BRIJESH; PATEL; GHOSH, 2009). A separação de HCTZ e MTP foi realizada em uma coluna C18 (ACE, Escócia) com 250 por 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partícula mantida a 24,0 (± 0,1) °C. A fase móvel consistiu em uma mistura de uma solução tampão fosfato na concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), acetonitrila e metanol (52,5:25:22,5, v/v/v), e foi mantida num fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> com volume de injeção de amostra de 20 µL que foram detectadas num comprimento de onda de 222 nm.

### 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

VC e VOQ foram empregadas para estudos preliminares do comportamento eletroquímico de HCTZ e MTP sobre o EDDB. VOQ e VPD foram usadas para desenvolver a metodologia eletroanalítica para a determinação de MTP e para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em amostras farmacêuticas.

Com a utilização dos parâmetros experimentais e instrumentais previamente selecionados, as curvas analíticas foram construídas pela adição sucessiva das soluções de trabalho de cada anti-hipertensivo. Para a determinação individual foram feitas adições sucessivas da solução de trabalho de MTP na célula eletroquímica, contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 7,0), já para a determinação simultânea foram feitas adições sucessivas das soluções de trabalho de HCTZ e MTP, simultaneamente, na célula eletroquímica, contendo 10 mL da solução tampão lactato (pH 4,0). Voltamogramas de onda quadrada e de pulso diferencial foram obtidos após cada adição das soluções de trabalho dos anti-hipertensivos.

O valor do LD foi obtido por meio da seguinte equação:

$$LD = \frac{3 \times S_d}{m} \quad (5)$$

sendo  $S_d$  o valor do desvio padrão da corrente obtida a partir de dez medidas da solução do branco, e  $m$ , o valor do coeficiente angular da curva analítica, de acordo com a recomendação da IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983).

### 3.4 PREPARO DE AMOSTRAS

As amostras farmacêuticas utilizadas neste estudo foram adquiridas em uma drogaria local na cidade de Londrina, Brasil. Os comprimidos adquiridos eram rotulados com as quantidades de 25, 50 e 100 mg de MTP e 12,5 e 100 mg de HCTZ e MTP, respectivamente.

O método proposto foi aplicado na determinação de MTP e na determinação simultânea de HCTZ e MTP em comprimidos. Para o preparo das amostras, 10 comprimidos de cada formulação analisada foram pesados e macerados em um graal com auxílio de um pistilo até a formação de um pó fino e homogêneo. A massa correspondente a 1 comprimido foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL contendo 10 mL de metanol. Após 5 minutos de sonicação, o balão volumétrico foi completado com metanol. Feito isso, uma alíquota adequada foi diluída para 2 mL usando o eletrólito suporte correspondente. Para cada amostra, uma alíquota desta solução diluída foi transferida diretamente para a célula eletroquímica, contendo 10 mL do eletrólito suporte apropriado, após a qual, os voltamogramas foram obtidos. A concentração de MTP e de HCTZ e MTP nas soluções das amostras foram determinadas diretamente pela interpolação nas curvas analíticas previamente construídas.

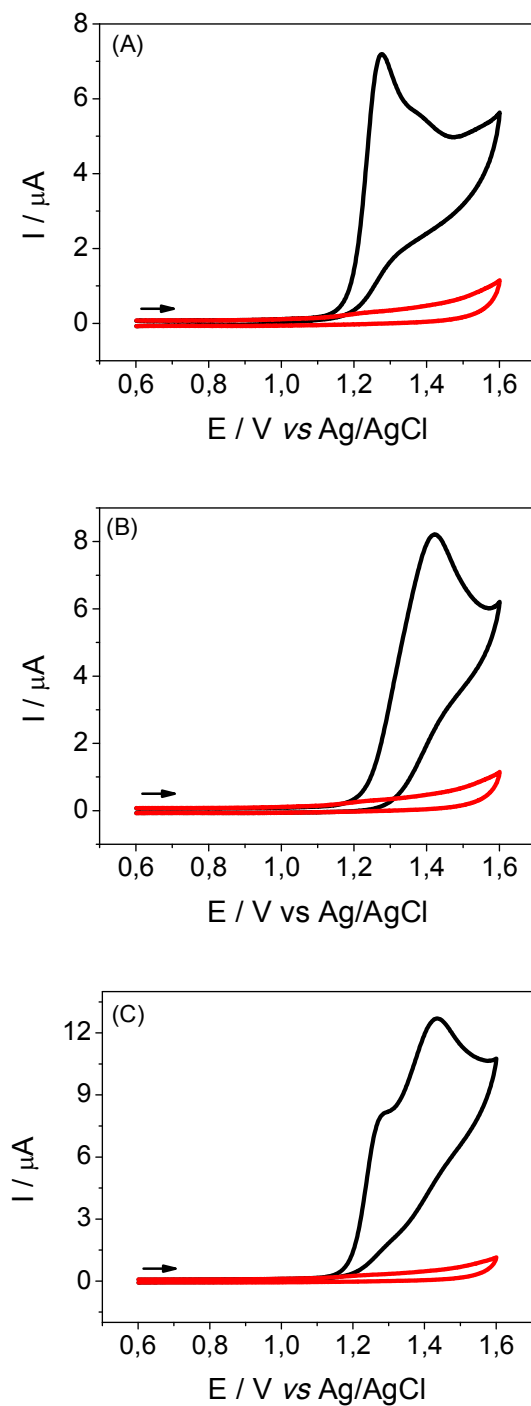
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE HCTZ E MTP SOBRE O EDDB

O comportamento voltamétrico de HCTZ e MTP foi estudado por VC a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . A varredura de potencial direta foi aplicada de 0,6 a 1,6 V e de 1,6 a 0,6 na varredura reversa. O eletrólito suporte utilizado foi a solução tampão BR (pH 2,0) e foram obtidos voltamogramas para  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ (Figura 10A), para  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP (Figura 10B) e para a mistura desses anti-hipertensivos nas concentrações já empregadas (Figura 10C) no EDDB-PTC. Como pode ser visto, HCTZ e MTP apresentaram um pico de oxidação nos potenciais de 1,28 e 1,42 V, respectivamente. Nenhum pico de redução foi observado na varredura reversa; sendo assim, as reações eletroquímicas de HCTZ e MTP sobre o EDDB-PTC são caracterizadas pela irreversibilidade do processo redox.

Por meio do voltamograma apresentado na Figura 10C, pode-se observar que os picos de oxidação dos anti-hipertensivos estão separados por uma pequena diferença de potencial de 0,147 V, o que pode comprometer a análise simultânea dessas duas drogas no EDDB-PTC.

**Figura 10.** Voltamogramas cíclicos ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução tampão BR (pH 2,0), empregando um EBBD-PTC para (A)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ, (B)  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP e (C)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, simultaneamente.



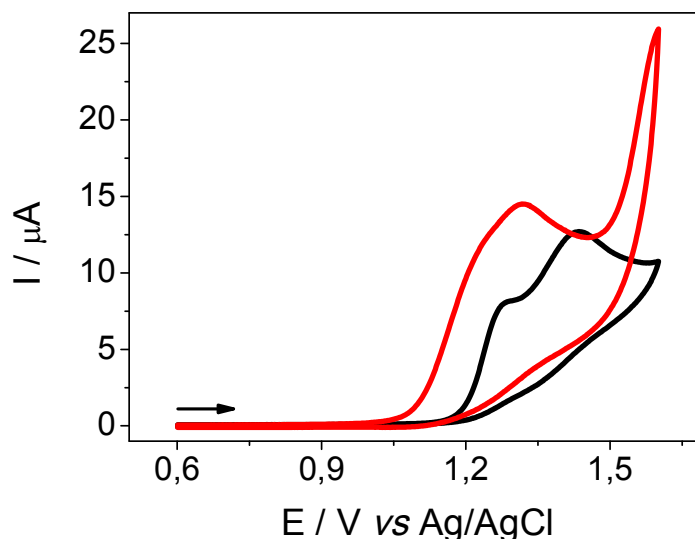
#### 4.2 ESTUDO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE MTP E SUA ASSOCIAÇÃO COM HCTZ

Com apenas 0,147 V de potencial de separação dos picos anódicos, a determinação simultânea estaria suscetível à interferência de um analito na oxidação do outro e, com o intuito de viabilizar a determinação simultânea de HCTZ e MTP, vários parâmetros experimentais foram investigados. Primeiramente, investigou-se o efeito das terminações superficiais do EDDB, obtidas por meio do pré-tratamento eletroquímico. O EDDB-PTA possui sua terminação, predominantemente, em oxigênio enquanto que o EDDB-PTC possui predominantemente hidrogênio em sua terminação (PASTOR-MORENO; RILEY, 2002; SUFFREDINI et al., 2004; BROCCENSCHI et al., 2016).

O estudo do pré-tratamento foi realizado da seguinte maneira: primeiramente, o EDDB foi pré-tratado anodicamente, então, investigou-se o comportamento voltamétrico da HCTZ e do MTP, simultaneamente, no EDDB-PTA por meio de VC. Após, o EDDB foi pré-tratado catodicamente e investigou-se o comportamento voltamétrico da HCTZ e do MTP, simultaneamente. As concentrações empregadas de HCTZ e MTP foram 99 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Os voltamogramas cíclicos da HCTZ e do MTP em mistura binária em solução tampão BR (pH 2,0) utilizando o EDDB-PTA e EDDB-PTC estão apresentados na Figura 11. Como pode ser visto, quando se empregou o EDDB-PTC, dois picos de oxidação individuais foram identificados, um à esquerda para HCTZ e outro, à direita, para MTP. Quando o EDDB-PTA foi empregado, ambos picos de oxidação tiveram o seu potencial deslocado para valores menos positivos. Para a HCTZ houve a redução de 47,8 mV, e para o MTP, 102 mV, entretanto, os picos de oxidação apresentam-se sobrepostos. Sendo assim, devido à separação de picos obtida empregando o EDDB-PTC, este pré-tratamento foi empregado nas análises posteriores.

Ainda, para a determinação individual de MTP, o pré-tratamento catódico também foi escolhido, devido principalmente à melhor repetibilidade da corrente de pico anódico obtida com este pré-tratamento.

**Figura 11.** Voltamogramas cíclicos ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução tampão BR (pH 2,0) de  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, usando um EDDB-PTA (—) e um EDDB-PTC (—).



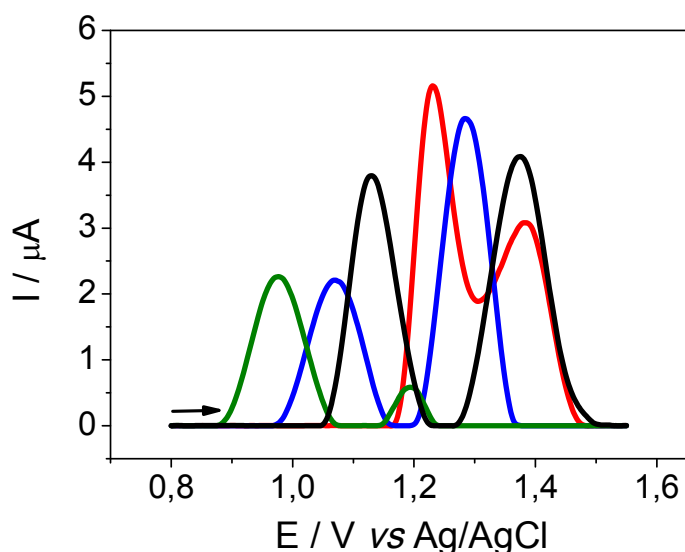
Com o tipo de pré-tratamento escolhido, outro parâmetro foi avaliado, o pH do eletrólito suporte. Para este estudo foi empregada VOQ e as correntes de oxidação para  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTP simultaneamente em solução tampão BR, foram avaliadas em diferentes valores de pH (2,0 – 9,0). Como pode ser visto na Figura 12, tanto para a HCTZ quanto para o MTP, o potencial de oxidação sofreu um deslocamento no sentido de valores menos positivos conforme o incremento de valor de pH. Esse deslocamento é um indicativo que prótons estão envolvidos na oxidação de ambos analitos e que esta reação acontece irreversivelmente na superfície do eletrodo (SMITH, 2006). A fim de se estimar a relação entre prótons e elétrons envolvidos nas reações eletroquímicas de HCTZ e MTP, plotou-se o valor de potencial em função do valor de pH. Onde o valor do coeficiente angular foi empregado na equação

$$\frac{dE_p}{dpH} = -0,059 \frac{p}{n} \quad (6)$$

onde,  $\frac{dE_p}{dpH}$  é o coeficiente angular da reta obtida e  $p$  é o valor de número de prótons (SHAH et al., 2015).

Para ambos anti-hipertensivos, houve uma correlação linear entre os potenciais de oxidação e os valores de pH com valores de  $\frac{dE_p}{dpH}$   $-0,047 \text{ V pH}^{-1}$  para a HCTZ e de  $-0,046 \text{ V pH}^{-1}$  para o MTP. Sendo assim, estima-se que as reações de oxidação de HCTZ e de MTP ocorrem com a perda de quantidades iguais de prótons e elétrons (ZUMAN, 1969).

**Figura 12.** Voltamogramas de onda quadrada de  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP usando um EDDB-PTC em solução tampão BR em pH 2,0 (—), 4,0 (—), 7,0 (—) e 9,0 (—). Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$

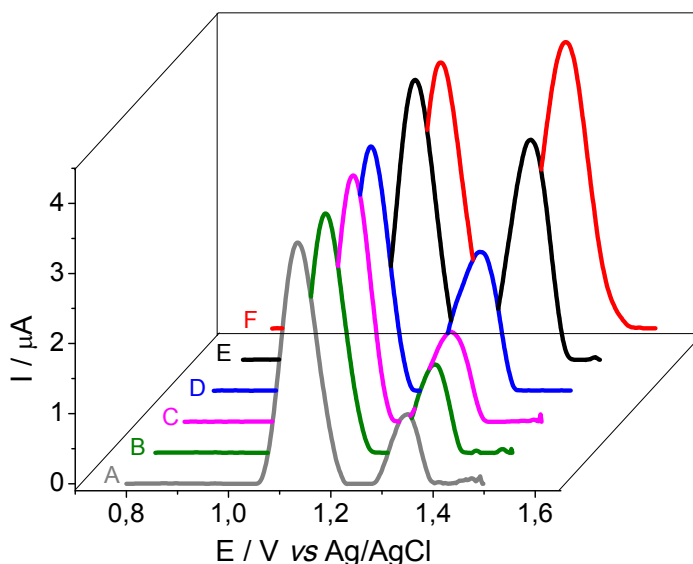


Para a escolha do pH do eletrólito suporte a ser empregado para a determinação de MTP e de HCTZ e MTP algumas características puderam ser avaliadas. A maior magnitude de corrente para a HCTZ e para o MTP foi observado em valores de pH 2,0 e 7,0, respectivamente. Como já visto, no pH 2,0, os picos de oxidação dos anti-hipertensivos estão sobrepostos podendo ocorrer interferência de um composto na oxidação do outro, já em pH 7,0, a magnitude de corrente para a HCTZ é mais reduzida. Como a dosagem de HCTZ e MTP nos comprimidos comercializados é 12,5 e 100 mg, respectivamente, a quantidade molar de HCTZ é inferior à quantidade molar de MTP, assim, uma corrente de MTP muito maior que de HCTZ não seria adequada para a determinação simultânea desses compostos. Dessa forma, o valor de pH 4,0 foi escolhido para as futuras análises por apresentar magnitudes de corrente mais semelhantes, aliadas a uma diferença de potencial de

oxidação de 0,245 V, que permite a determinação simultânea, sem interferência de um composto na presença do outro. Já para a determinação de MTP, individualmente, o valor de pH 7,0 foi escolhido, pois neste valor de pH, foi obtida a maior magnitude de corrente para o MTP.

Com os valores de pH dos eletrólitos suporte definidos, várias soluções tampão nos valores de pH escolhidos foram avaliados utilizando VOQ para a determinação simultânea de HCTZ e MTP. Foram avaliadas as soluções tampão acetato, BR, citrato, fosfato, lactato e Mc'Illvaine, em pH 4,0 (Figura 13). Com solução tampão BR e lactato foram obtidas as maiores magnitudes de corrente para a HCTZ e para o MTP. Contudo, usando-se a solução tampão lactato, houve uma maior magnitude para a HCTZ, além de uma melhor repetibilidade dos sinais analíticos tanto para a HCTZ quanto para o MTP, sendo então a solução tampão lactato (pH 4,0) escolhida como eletrólito suporte para determinar simultaneamente HCTZ e MTP.

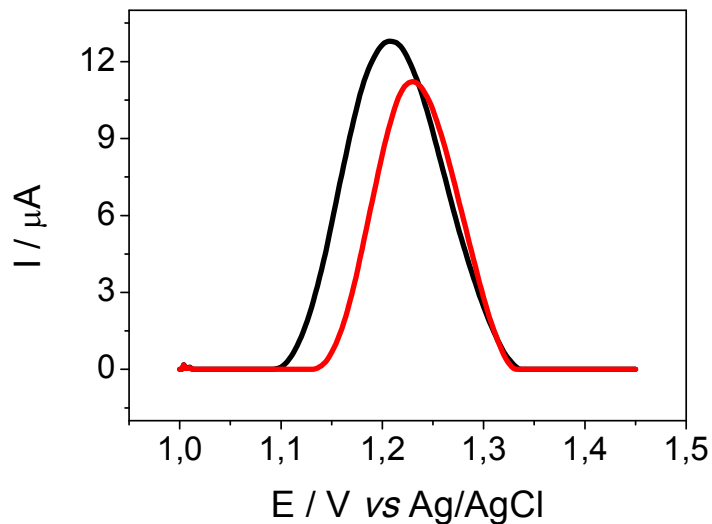
**Figura 13.** Voltamogramas de onda quadrada de  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP usando um EDDB-PTC em diferentes soluções tampão em pH 4,0: (A) citrato, (B) Mc'Illvaine, (C) acetato, (D) fosfato, (E) lactato e (F) BR. Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .



Já para a determinação MTP, as soluções tampão BR e fosfato, em pH 7,0, foram avaliadas (Figura 14). Para ambas as soluções tampão, o MTP apresentou uma magnitude de corrente semelhante. Porém, uma melhor

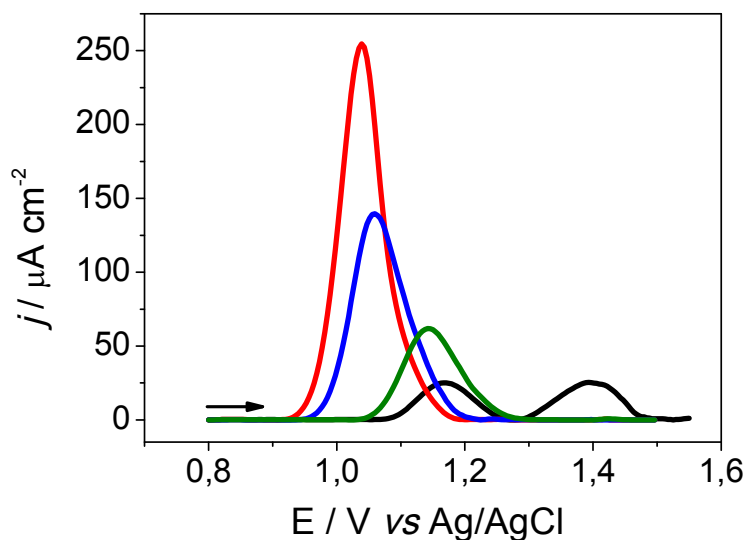
repetibilidade dos sinais analíticos foi obtida utilizando-se a solução tampão BR; sendo assim, a solução tampão BR (pH 7,0) foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação de MTP, individualmente.

**Figura 14.** Voltamogramas de onda quadrada de 99,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP usando um EDDB-PTC em soluções tampão em pH 7,0: (—) fosfato e (—) BR. Parâmetros da VOQ:  $f = 60 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$



A resposta voltamétrica simultânea de 99  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e de 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  MTP obtida com o EDDB-PTC em solução tampão lactato (pH 4,0), foi comparada com a resposta obtida por outros eletrodos de carbono nas mesmas condições de análise. Os eletrodos utilizados foram ECV, EPNTC e EPG, e os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão mostrados na Figura 15.

**Figura 15.** Voltamogramas de onda quadrada para  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP em solução tampão lactato (pH 4,0) usando um EDDB-PTC (—), um EPG (—), um EPNTC (—) e um ECV (—). Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

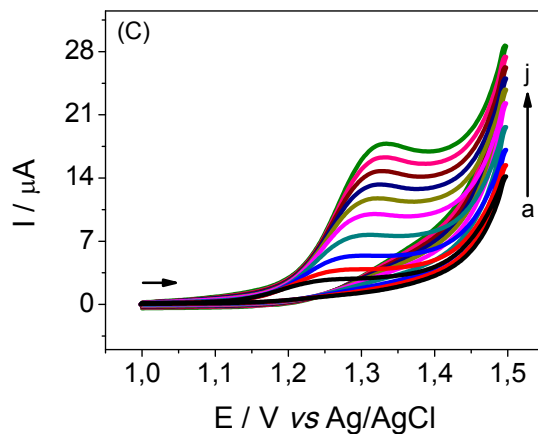
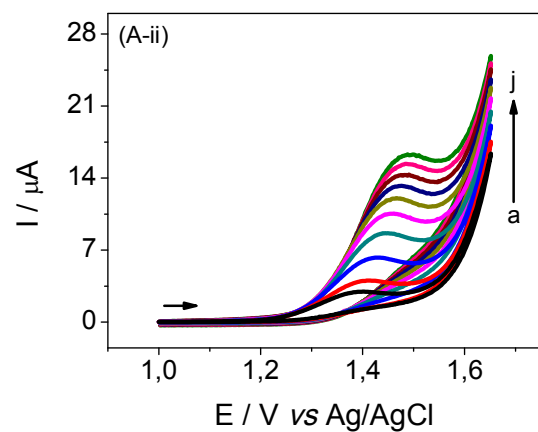
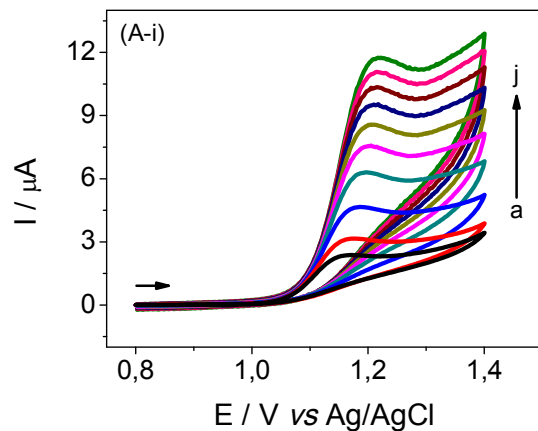


Como pode ser observado, maiores magnitudes de densidade de corrente para a HCTZ foram obtidas utilizando o EPG, o EPNTC e o ECV, entretanto, nenhum sinal analítico foi observado para o MTP nestes eletrodos, nestas condições. Devido a isso, o EDDB-PTC foi o único eletrodo utilizado para a determinação individual de MTP e determinação simultânea de HCTZ e MTP.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DE HCTZ E MTP

Foi utilizado a VC em diferentes velocidades de varredura para  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e para  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, separadamente, em solução tampão lactato (pH 4,0) e para  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP em solução tampão BR (pH 7,0). Utilizando o EDDB-PTC, os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura ( $5 - 200 \text{ mV s}^{-1}$ ) e estão mostrados na Figura 16.

**Figura 16.** Voltamogramas cíclicos (A) obtidos em solução tampão lactato (pH 4,0) de (i)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e (ii)  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, e (B) obtidos em solução tampão BR (pH 7,0) de (iii)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, usando um EDDB-PTC em várias velocidades de varredura (a – j:  $5 - 200 \text{ mV s}^{-1}$ ).



Como pode ser observado, com o aumento da velocidade de varredura, houve um deslocamento para maiores valores de potencial para ambos os fármacos. Este deslocamento é típico de sistemas totalmente irreversíveis (NICHOLSON; SHAIN, 1964; GOSSER, 1993; ARISTOV; HABEKOST, 2015).

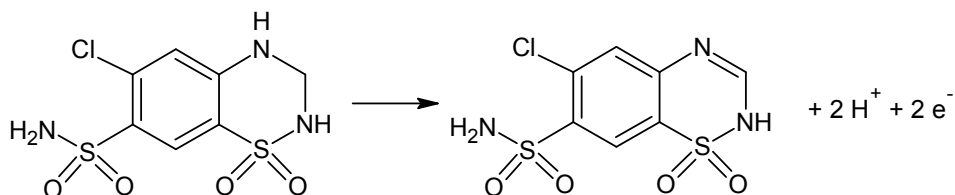
O número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na eletro-oxidação de HCTZ e MTP no EDDB-PTC foi estimado através da Equação 2, para sistemas irreversíveis (GOSSER, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). Os voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  foram empregados para a realização dos cálculos e os valores de  $E_p$  e  $E_{p/2}$ , bem como o valor de número de elétrons estimados estão relacionados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de  $E_p$ ,  $E_{p/2}$ ,  $E_p - E_{p/2}$  e  $n$  obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , para a HCTZ e para o MTP.

	HCTZ	MTP (pH 4,0)	MTP (pH 7,0)
$E_p$	1,195	1,445	1,294
$E_{p/2}$	1,148	1,394	1,243
$E_p - E_{p/2}$	0,047	0,051	0,051
$n$	2,03	1,87	1,87

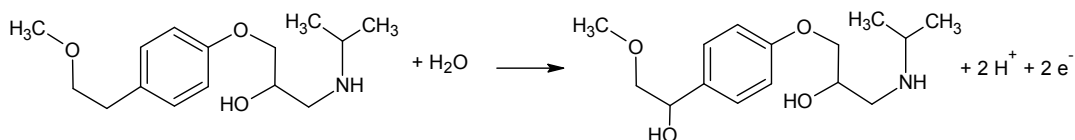
O número de elétrons calculados para a oxidação da HCTZ e do MTP, sobre o EDDB-PTC, foi igual a 2, para ambos os fármacos. Com a relação de prótons e elétrons obtida no estudo do pH, a partir da Equação 6, temos que o número de prótons é igual ao número de elétrons, portanto dois elétrons e dois prótons estão envolvidos na oxidação da HCTZ para clorotiazida, como proposto por Razak (2004) usando um ECV e estudos espectrofotométricos (Figura 17).

**Figura 17.** Mecanismo proposto para a eletro-oxidação da HCTZ sugerido por Razak (2004) empregando um ECV



E para o MTP, dois elétrons e dois prótons estão envolvidos em sua oxidação que, provavelmente, acontece no anel aromático, como proposto por Zorluoglu e colaboradores (2013) usando um ECV e baseado em investigações computacionais (Figura 18).

**Figura 18.** Mecanismo proposto para a eletro-oxidação do MTP sugerido por Zorluoglu e colaboradores (2013) empregando um ECV.



Ainda, a partir dos voltamogramas obtidos em diferentes velocidades, foi observado que a magnitude da corrente de pico variou linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura para a HCTZ ( $R^2 = 0,999$ ) e MTP ( $R^2 = 0,999$ ) em solução tampão lactato (pH 4,0) e para o MTP ( $R^2 = 0,997$ ) em solução tampão BR (pH 7,0), o que indica que a etapa lenta da reação eletródica é caracterizada por difusão dos compostos do seio da solução para a superfície do EDDB-PTC (NICHOLSON; SHAIN, 1964; BRETT; BRETT, 1993; GOSSER, 1993; ARISTOV; HABEKOST, 2015). A Figura 19 mostra a relação entre a magnitude da corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Além disso, foi observada uma relação linear entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para HCTZ e MTP em solução tampão lactato (pH 4,0) e para MTP em solução tampão BR (pH 7,0), cujas equações obtidas foram:

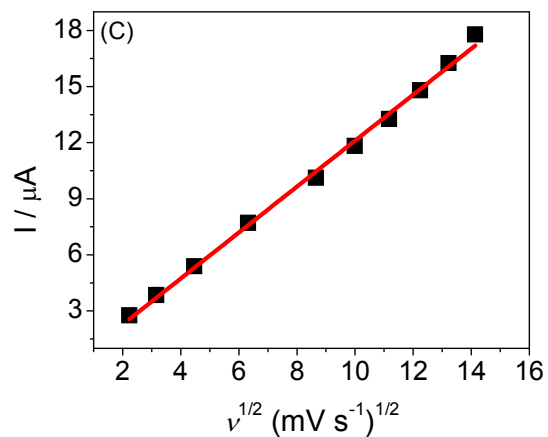
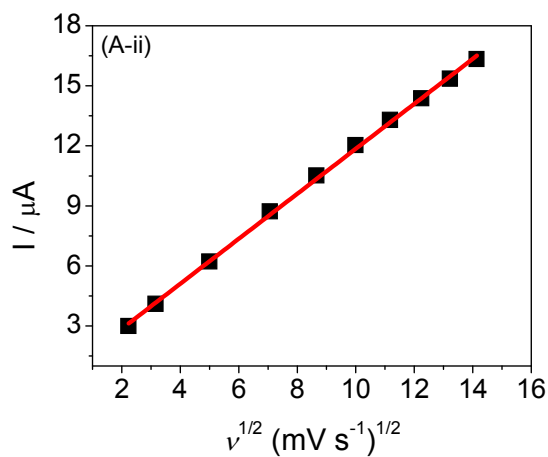
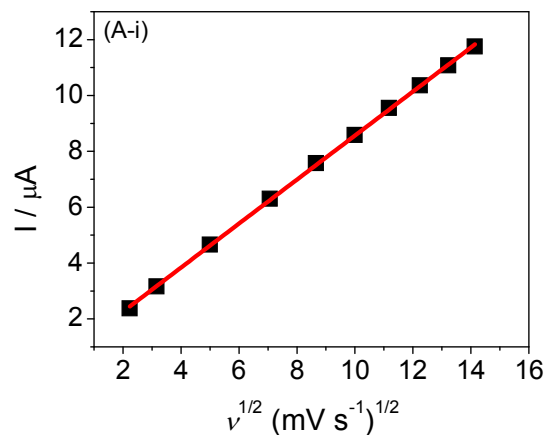
$$\log I_{HCTZ-pH\ 4,0} = 0,44 \times \log v + 0,064 \quad R^2 = 0,999 \quad (7)$$

$$\log I_{MTP-pH\ 4,0} = 0,46 \times \log v + 0,15 \quad R^2 = 0,999 \quad (8)$$

$$\log I_{MTP-pH\ 7,0} = 0,52 \times \log v + 0,041 \quad R^2 = 0,999 \quad (9)$$

Os valores de coeficientes angulares das retas obtidas confirmam o controle difusional das reações desses anti-hipertensivos sobre o EDDB-PTC (NICHOLSON; SHAIN, 1964; GOSSER, 1993; ARISTOV; HABEKOST, 2015).

**Figura 19.** Relação linear entre corrente de pico e raiz quadrada da velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos (A) obtidos em solução tampão lactato (pH 4,0) de (i)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e (ii)  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, e (B) obtidos em solução tampão BR (pH 7,0) de (iii)  $99 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP, usando um EDDB-PTC em várias velocidades de varredura (a – j: 5 – 200  $\text{mV s}^{-1}$ ).



Como ambos os fármacos possuem uma reação caracterizada por difusão, o coeficiente difusional aparente ( $D_0$ ) de cada um foi obtido usando cronoamperometria. Os valores de  $D_0$  foram calculados a partir de cronoamperogramas obtidos para os intervalos de concentração de 3,1 a 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e de 6,5 a 7,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP com valores de potenciais fixados em 1,27 e 1,48 V, respectivamente, em solução tampão lactato (pH 4,0). Para o MTP, em solução tampão BR, as concentrações empregadas variaram de 3,8 a 7,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e o potencial foi fixado em 1,25 V. A partir dos gráficos de corrente versus o inverso da raiz quadrada do tempo e da equação de Cottrell (BARD; FAULKNER, 2001), os valores de  $D_0$  foram calculados, sendo de  $6,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para HCTZ, concordante com o valor de  $1,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  encontrado por Mansano e colaboradores (2015) empregando um EDDB-PTC em solução tampão BR (pH 5,0) e, para o MTP os valores de  $D_0$  encontrados foram de 7,8 e  $1,87 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  em pH 4,0 e 7,0, respectivamente.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DE MTP USANDO O EDDB-PTC

VOQ e VPD foram aplicadas para a determinação individual de MTP. Deste modo, a influência dos valores dos parâmetros operacionais associados a cada uma das técnicas voltamétricas foi investigada usando o EDDB-PTC e MTP na concentração de 11  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão BR (pH 7,0). Os valores foram avaliados tendo em conta uma maior intensidade de corrente de pico e os menores valores de largura de meio-pico, ou seja, a máxima sensibilidade e seletividade, respectivamente.

Para a VOQ, as variáveis estudadas foram frequência ( $f$ ), amplitude ( $a$ ) e incremento de potencial ( $\Delta E_S$ ), enquanto que para a VPD, estudou-se  $a$ , velocidade de varredura ( $v$ ) e tempo de modulação ( $tm$ ). A Tabela 2 apresenta o intervalo estudado para cada parâmetro, bem como o valor escolhido. Cabe ressaltar que cada parâmetro foi avaliado individualmente, mantendo os outros dois constantes.

**Tabela 2.** Parâmetros instrumentais da VOQ e VPD, avaliados para a determinação de MTP em solução tampão BR (pH 7,0)

Técnica	Parâmetros	Intervalo estudado	Valor escolhido
	$f$ (s <sup>-1</sup> )	10 – 70	60
VOQ	$a$ (mV)	10 – 50	40
	$\Delta E_s$ (mV)	1 – 5	3
	$a$ (mV)	10 – 200	125
VPD	$\nu$ (mV s <sup>-1</sup> )	3 – 7	5
	$tm$ (ms)	3 – 7	5

Usando os parâmetros selecionados, as curvas analíticas para o MTP foram construídas pela adição sucessiva de alíquotas da solução padrão de MTP utilizando VOQ e VPD, empregando o EDDB-PTC. Os parâmetros analíticos como potencial de oxidação, intervalo linear de concentração, coeficientes angular e linear da curva, LD e repetibilidades inter- e intra-dia das medidas, obtidas por VOQ e VPD estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros analíticos obtidos para a determinação individual de MTP por VPD e VOQ em solução tampão BR (pH 7,0) usando um EDDB-PTC

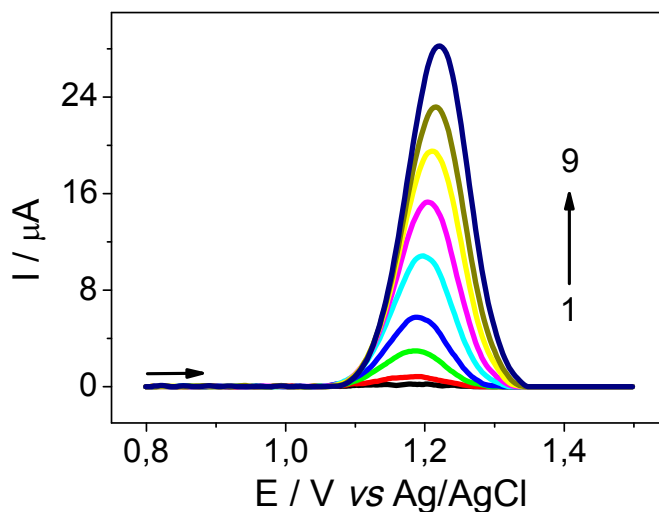
Parâmetros obtidos	VPD	VOQ
Potencial de pico (V)	1,22	1,24
Intervalo linear de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,38 – 22	0,38 – 22
Coeficiente de determinação, $R^2$	0,998	0,999
Coeficiente angular ( $\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$ )	$1,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$
Coeficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,94	0,059
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,034	0,076
Repetibilidade Intra-dia (DPR %)	3,0	2,9
Repetibilidade Inter-dia (DPR %)	3,2	3,5

A repetibilidade intra-dia da magnitude de corrente de pico foi determinada por sucessivas medidas (N = 10) de  $11 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP utilizando as técnicas VOQ e VPD. A repetibilidade inter-dia da magnitude de corrente de pico foi avaliada por meio da medida da corrente de pico para  $11 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP

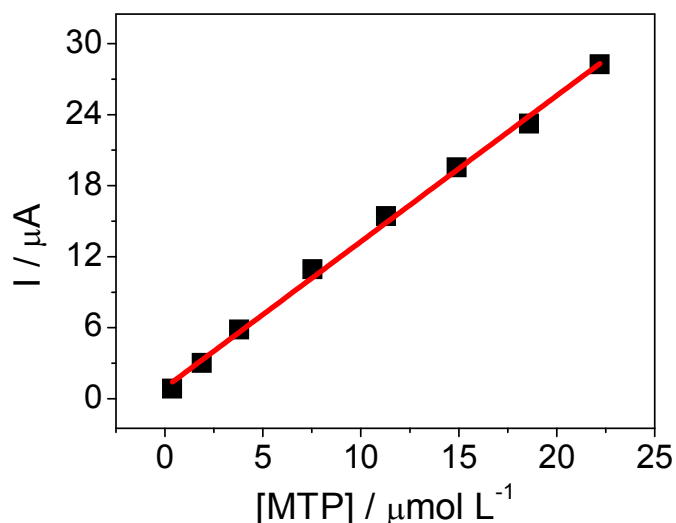
provenientes de soluções preparadas diariamente durante 5 dias. Como pode ser visto na Tabela 3, foram obtidos valores toleráveis de desvio padrão relativo (DPR), em ambas as técnicas, sendo o valor máximo permitido 5% (PEREZ, 2010).

Devido a uma maior sensibilidade apresentada pela VPD, esta técnica foi escolhida para a determinação de MTP. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o intervalo de concentração de  $0,38 - 22 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP estão apresentados na Figura 20, e a curva analítica obtida, com esta técnica, é mostrada na Figura 21, sendo que, devido à repetibilidade dos sinais analíticos, as barras de erros para as correntes obtidas não são perceptíveis.

**Figura 20.** Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão BR (pH 7,0) obtidos usando o EDDB-PTC para as seguintes concentrações de MTP: (1) 0, (2) 0,38, (3) 1,9, (4) 3,8, (5) 7,6, (6) 11, (7) 15, (8) 18 e (9)  $22 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD:  $a = 125 \text{ mV}$ ,  $t_m = 5 \text{ ms}$  e  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 21.** Curva analítica obtida por VPD, para o intervalo de concentração de MTP de 0,38 a 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



Na Tabela 4 são mostrados os parâmetros analíticos obtidos para a determinação individual de MTP já relatados na literatura em comparação com o método desenvolvido. São apresentadas as técnicas utilizadas, os intervalos lineares de concentração, bem como os valores de LD obtidos para a determinação de MTP. A partir destes dados, nota-se que o valor de LD, para o MTP, obtido usando o método aqui proposto é menor do que os valores obtidos usando o ECV e o EH<sub>g</sub>GP, exceto quando o ECV foi utilizado em conjunto com voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada (VRAdOQ) (ZORLUOĞLU et al., 2013) e é similar ao LD obtido utilizando um ECV-NAF-NTC (DESAI; SRIVASTAVA, 2013). No entanto, nesses métodos foi necessária uma etapa prévia de acumulação do fármaco na superfície do eletrodo antes de cada determinação (DESAI; SRIVASTAVA, 2013; ZORLUOĞLU et al., 2013), ou ainda foi utilizado um eletrodo modificado (DESAI; SRIVASTAVA, 2013), aumentando o tempo das análises. Tendo em vista estes resultados, e que o EDDB-PTC garantiu bons resultados, simplicidade de utilização sem a necessidade de modificação da sua superfície, uma estabilidade elevada e uma considerável vida útil, este eletrodo pode ser utilizado como método alternativo para a determinação de MTP em comprimidos.

**Tabela 4.** Características dos procedimentos analíticos voltamétricos para a determinação de MTP previamente reportados em comparação ao procedimento proposto

<b>Eletrodo</b>	<b>Técnica</b>	<b>Intervalo linear de concentração (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referências</b>
ECV-NAF-NTC	VRAdPD	0,07 – 9,0	0,035	(DESAI; SRIVASTAVA, 2013)
ECV	VPD	1,6 – 101	0,51	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
ECV	VOQ	3,23 – 101	0,97	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
ECV	VRAdPD	0,62 – 3,25	0,19	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
ECV	VRAdOQ	0,06 – 1,08	0,02	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
EHgGP	VPD	3,18 – 28,5	0,93	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
EHgGP	VOQ	3,18 – 16,9	0,96	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
EHgGP	VRAdPD	0,95 – 9,45	0,28	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
EHgGP	VRAdOQ	0,95 – 9,45	0,29	(ZORLUOĞLU et al., 2013)
EDDB-PTC	VPD	0,38 – 22	0,034	Este trabalho

*Abreviações:* VRAdPD – voltametria de redissolução adsorptiva de pulso diferencial.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E MTP USANDO O EDDB-PTC

A determinação voltamétrica simultânea de HCTZ e MTP foi realizada por VOQ e VPD. Previamente, os parâmetros experimentais de ambas técnicas

também foram estudados a fim de se obter uma maior magnitude de corrente para 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de HCTZ e 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de MTP em solução tampão lactato (pH 4,0) e, conseqüentemente uma maior sensibilidade analítica. Para a VOQ, as variáveis estudadas foram  $f$ ,  $a$  e  $\Delta E_s$ , enquanto que para a VPD, estudou-se  $a$ ,  $v$  e  $tm$ . A Tabela 5 apresenta o intervalo estudado para cada parâmetro, bem como o valor escolhido. Assim como na determinação individual, cada parâmetro foi avaliado individualmente, mantendo os outros dois constantes.

**Tabela 5.** Parâmetros instrumentais da VOQ e VPD, avaliados para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em solução tampão lactato (pH 4,0)

Técnica	Parâmetros	Intervalo estudado	Valor escolhido
VOQ	$f$ ( $\text{s}^{-1}$ )	8 – 100	30
	$a$ (mV)	10 – 60	40
	$\Delta E_s$ (mV)	0,5 – 7	3
VPD	$a$ (mV)	10 – 175	125
	$v$ ( $\text{mV s}^{-1}$ )	3 – 50	20
	$tm$ (ms)	2 – 5	3,5

Com a utilização dos parâmetros previamente selecionados, as curvas analíticas simultâneas foram construídas a partir da adição de alíquotas das soluções de trabalho de HCTZ e MTP simultaneamente. Após cada adição de alíquota de ambos os fármacos os voltamogramas foram obtidos.

Usando tanto a VOQ quanto a VPD, a magnitude de corrente da HCTZ e do MTP foi linearmente relacionada com a concentração destas espécies. Porém, usando a VPD, foi obtida uma melhor sensibilidade, além de uma maior precisão e linearidade, (Tabela 6). Portanto, a VPD foi utilizada para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em solução tampão lactato (pH 4,0) usando o EDDB-PTC em amostras farmacêuticas. Como pode-se observar na Tabela 6, os valores de desvio padrão relativos obtidos para as repetibilidades intra- e inter-dia foram menores que o valor máximo permitido, 5 % (PEREZ, 2010). No caso da determinação simultânea de HCTZ e MTP, para o cálculo dos valores de repetibilidade inter- e intra-dia foram realizadas as seguintes medidas: para a repetibilidade intra-dia, 6 sucessivas medidas de HCTZ e MTP na concentração de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e, para a repetibilidade inter-dia, as

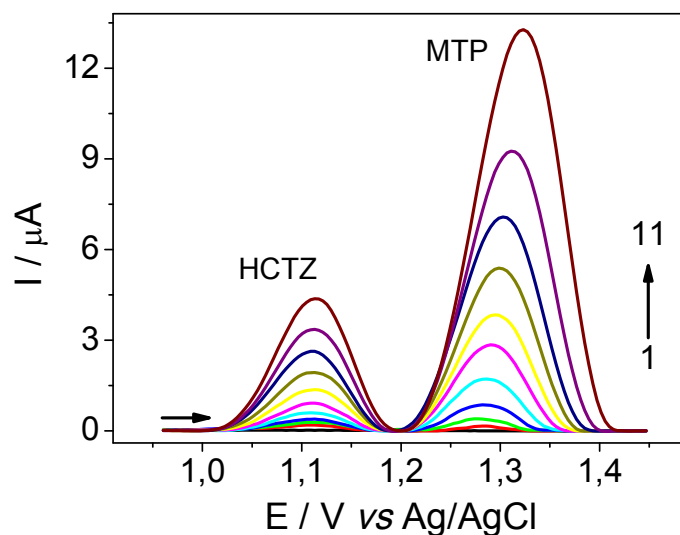
medidas de HCTZ e MTP na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram realizadas em cinco dias diferentes utilizando soluções de trabalho recém-preparadas.

**Tabela 6.** Parâmetros obtidos para as curvas analíticas de HCTZ e MTP obtidas simultaneamente por VOQ e VPD usando o EDDB-PTC

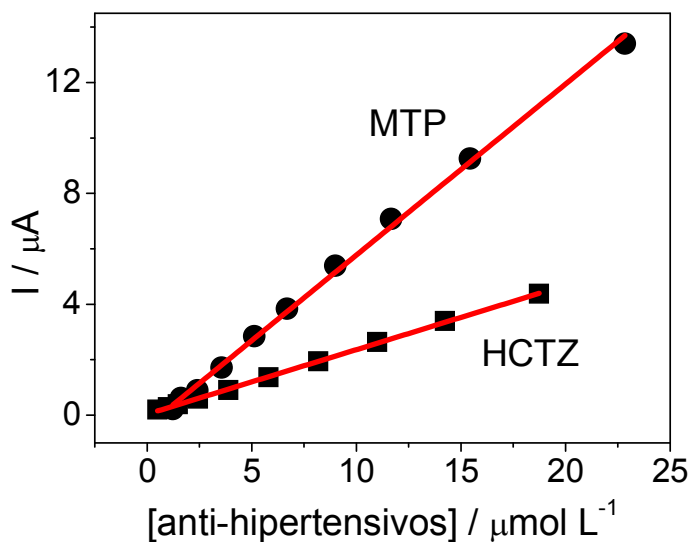
Parâmetros obtidos	HCTZ		MTP	
	VPD	VOQ	VPD	VOQ
Potencial de pico (V)	1,11	1,12	1,32	1,38
Intervalo linear de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,50 – 19	1,5 – 71	1,2 – 23	2,1 – 85
Coefficiente de determinação, $R^2$	0,999	0,999	0,998	0,999
Coefficiente angular ( $\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$ )	$2,3 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$6,2 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$
Coefficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,037	-0,0060	-0,45	-0,31
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,38	0,46	0,077	0,22
Repetibilidade Intra-dia (DPR %)	1,1	0,95	2,1	1,9
Repetibilidade Inter-dia (DPR %)	3,7	3,5	3,7	3,9

A Figura 22 mostra os voltamogramas de pulso diferencial e, a Figura 23, as respectivas curvas analíticas obtidas simultaneamente para a HCTZ e para o MTP, sendo que, as barras de erro também não são perceptíveis para essa análise.

**Figura 22.** Voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão lactato (pH 4,0) para as seguintes concentrações de HCTZ: (1) 0, (2) 0,50, (3) 1,0, (4) 1,5, (5) 2,4, (6) 3,9, (7) 5,8, (8) 8,2, (9) 11, (10) 14, (11) 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de MTP: (1) 0, (2) 1,2, (3) 1,6, (4) 2,4, (5) 3,6, (6) 5,1, (7) 6,7, (8) 9,0, (9) 12, (10) 15, (11) 23  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD:  $a = 125 \text{ mV}$ ,  $t_m = 3,5 \text{ ms}$  e  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 23.** Curvas analíticas obtidas simultaneamente para a HCTZ e para o MTP, a partir dos voltamogramas de pulso diferencial



A interferência da presença de um analito na determinação simultânea do outro foi avaliada. Para isso, usando VPD, uma curva analítica

individual foi construída mantendo a concentração da outra droga constante utilizando o EDDB-PTC em solução tampão lactato (pH 4,0). A concentração de HCTZ foi variada de 1,0 a 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  enquanto a concentração de MTP foi fixada em 6,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A curva analítica para a HCTZ pode ser representada pela equação

$$I_{HCTZ}/\mu A = -0,14 + 2,6 \times 10^6 [c/(mol L^{-1})] (R^2 = 0,999), \quad (10)$$

enquanto que os valores de corrente de pico para o MTP permaneceram constantes com DPR de 1,7 %. Por outro lado, a concentração de MTP foi variada de 1,3 – 24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  enquanto a concentração de HCTZ foi fixada em 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A curva analítica para o MTP pode ser representada pela equação

$$I_{MTP}/\mu A = -0,68 + 5,9 \times 10^6 [c/(mol L^{-1})] (R^2 = 0,999), \quad (11)$$

enquanto que os valores de corrente de pico para a HCTZ permaneceram constantes com DPR de 8,2 %. Os valores dos coeficientes angulares para as curvas analíticas de HCTZ, na presença de concentração fixa de MTP, e de MTP, na presença de concentração fixa de HCTZ, são muito próximos dos coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas simultaneamente. As correntes de pico para os anti-hipertensivos cujas concentrações foram mantidas constantes também permaneceram constantes, de modo que demonstram que um analito não interfere significativamente na determinação do outro e que as oxidações eletroquímicas de ambos os compostos são independentes.

Os parâmetros analíticos obtidos com o método proposto utilizando a VPD foram comparados aos parâmetros obtidos com outros métodos já descritos na literatura e os dados são mostrados na Tabela 7. A partir desses dados pode-se observar que o LD obtido para a HCTZ e para o MTP utilizando o método proposto foi menor que os obtidos previamente, exceto para o trabalho desenvolvido por Gao e colaboradores (2010) utilizando CLAE com detecção por espectrometria de massa e por Alnajjar e colaboradores (2013), que utilizaram eletroforese capilar. Entretanto, esses métodos são demorados, pois exigem uma etapa prévia para a separação dos analitos, além de serem caros. Assim, para análise de drogas, os métodos voltamétricos podem ser convenientemente empregados, pois são rápidos, possuem

**Tabela 7.** Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes métodos para a determinação simultânea de HCTZ e MTP em formulações farmacêuticas

Técnica	Intervalo linear de concentração		LD		Referência
	( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		
	HCTZ	MTP	HCTZ	MTP	
CLAE-UV	6,72 – 162	6,13 – 98,0	–	–	(BRIJESH; PATEL; GHOSH, 2009)
CLAE-EM	$1,00 \times 10^{-2}$ – 3,36	$8,76 \times 10^{-3}$ – 2,92	$1,0 \times 10^{-2}$	$8,8 \times 10^{-3}$	(GAO et al., 2010)
CLAE-UV	43,7 – 252	292 – 1752,3	–	–	(RAWOOL; VENKATCHALAM, 2011)
CLAE-UV	33,6 – 202	29,2 – 175	–	–	(PHANI R S CH et al., 2013)
CLAE-UV	21,0 – 168	73,0 – 584	1,34	5,84	(TSVETKOVA; PEIKOVA, 2013)
CCDAE-UV	0,672 – 4,03	5,84 – 35,05	0,672	5,84	(ROTE; SONAVANE, 2013)
UV	42,0 – 126	292 – 876	5,04	14,6	(STOLARCZYK et al., 2006)
UV	16,8 – 84,0	117 – 584	–	–	(GUPTA; TAJNE; WADODKAR, 2008)
EC	8,4 – 840	7,3 – 730	0,0336	0,0584	(ALNAJJAR et al., 2013)
VPD	0,50 – 19	1,2 – 23	0,37	0,077	Este trabalho

*Abreviatura:* CCDAE – cromatografia de camada delgada de alta eficiência.

um baixo custo e são ambientalmente favoráveis, além de ser um método analítico mais simples.

#### 4.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO DE MTP E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM HCTZ EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS

Os métodos voltamétricos desenvolvidos empregando o EDDB-PTC foram aplicados na determinação individual de MTP e na determinação simultânea de HCTZ e MTP em comprimidos com diferentes dosagens. Porém, antes das análises das amostras, a seletividade do método proposto foi avaliada verificando possíveis efeitos na corrente de pico de HCTZ ( $19,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de MTP ( $16,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de interferentes. Os interferentes que foram avaliados são excipientes presentes nas formulações farmacêuticas contendo MTP ou nas formulações farmacêuticas combinadas de HCTZ e MTP, são eles: amido, povidona, celulose microcristalina, dióxido de titânio, óxido de ferro (III), carbonato de magnésio e estearato de magnésio. As soluções estoque dos interferentes foram preparadas em metanol e as de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução tampão lactato (pH 4,0) e/ou em solução tampão BR (pH 7,0). A variação das correntes de oxidação de HCTZ e MTP foram avaliadas na presença de cada interferente individualmente na proporção molar de (maior concentração de anti-hipertensivo:concentração do excipiente) 1:1, 1:10, e 10:1. Com a presença dos excipientes, a magnitude de corrente tanto para a HCTZ, quanto para o MTP, não variou significativamente e apresentou DPR menores que 4,1%, onde o limite máximo é de 5% (PEREZ, 2010).

Uma vez que os métodos propostos possuem boa sensibilidade e seletividade para a determinação individual de MTP e para a determinação simultânea de HCTZ e MTP, foram aplicados na análise do teor destes analitos em amostras farmacêuticas comerciais. Os resultados da análise de todas as amostras estão resumidos na Tabela 8, onde o conteúdo nominal dos analitos, os dados obtidos com o método proposto, os dados obtidos por meio do método comparativo CLAE (BRIJESH; PATEL; GHOSH, 2009) e os valores de erro relativo da VPD em comparação à CLAE são apresentados.

**Tabela 8.** Resultados obtidos na determinação individual de MTP e na determinação simultânea de HCTZ e MTP em comprimidos com diferentes dosagens usando o método proposto e o método cromatográfico

Amostras	Droga	Quantidade (mg comprimido <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>			E (%) <sup>b</sup>	F <sub>calc</sub> <sup>c</sup>
		Rotulado	CLAE	VPD		
A	MTP	25,0	24,6 ± 1	24,9 ± 2	1,49	3,2
B	MTP	50,0	51,9 ± 3	53,7 ± 2	3,47	3,3
C	MTP	100	105 ± 7	102 ± 5	-2,54	2,1
D	MTP	100	103 ± 4	101 ± 5	-1,94	1,3
	HCTZ	12,5	12,3 ± 0,6	12,6 ± 0,3	2,44	2,9
E	MTP	100	98,4 ± 4	102 ± 4	3,35	1,4
	HCTZ	12,5	12,0 ± 0,3	12,4 ± 0,4	3,62	2,3

<sup>a</sup>Média de 3 replicatas.

<sup>b</sup> $100 \times (\text{Método VPD} - \text{método CLAE}) / \text{método CLAE}$ .

<sup>c</sup>Valor crítico de  $F = 19$  (nível de confiança de 95 %).

O teste  $t$  pareado foi aplicado nos resultados para verificar a semelhança entre os métodos. O valor de  $t$  calculado na determinação individual para o MTP foi de 0,109, enquanto que na determinação simultânea os valores de  $t$  calculados para a HCTZ e para o MTP foram de 1,22 e 0,223, respectivamente. Sendo o valor crítico de  $t$  tabelado 2,31 para a determinação individual e 2,57, para a determinação simultânea, considera-se que os métodos propostos não são diferentes ao nível de confiança de 95% do método cromatográfico (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009; MILLER; MILLER, 2010). A análise das variâncias foi verificada com a aplicação do teste  $F$ . Como pode ser visto na Tabela 8, todos os valores calculados de  $F$  foram menores que o valor crítico de  $F$  tabelado (19), sendo assim os métodos possuem o mesmo nível de precisão a 95% de confiança (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009; MILLER; MILLER, 2010).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados, demonstraram que o EDDB possui melhor desempenho para a determinação de MTP que outros eletrodos à base de carbono. A determinação simultânea de HCTZ e MTP só foi viabilizada por meio da aplicação do pré-tratamento catódico da superfície do EDDB, mostrando sua aplicabilidade e estabilidade para análises destes anti-hipertensivos. A VC foi útil na caracterização das reações eletroquímicas dos anti-hipertensivos na superfície do EDDB. Foram observadas características similares a outros trabalhos da literatura, tais como irreversibilidade das reações de HCTZ e MTP e número de prótons e elétrons envolvidos. A VPD se mostrou mais sensível para a determinação de MTP e de sua associação com HCTZ onde foram obtidos limites de detecção mais baixos que os já obtidos por outros autores. Os resultados obtidos para determinação de MTP e de sua associação com HCTZ em amostras farmacêuticas pelo método proposto (VPD) são equivalentes aos obtidos utilizando um método cromatográfico, a um nível de confiança de 95%. Sendo assim, o método proposto é preciso, robusto, sensível, favorável ao meio ambiente e pode ser usado em análises de rotina na determinação individual de MTP e de sua associação com HCTZ em amostras farmacêuticas.

## 6 REFERÊNCIAS

ABOLHASANI, J.; HOSSEINI, H.; KHANMIRI, R. H. Electrochemical Study and Differential Pulse Voltammetric Determination of Oxcarbazepine and Its Main Metabolite at a Glassy Carbon Electrode. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 850–856, 2014.

ALGHAMDI, A. F. Electrochemical Oxidation Behavior of Hydrochlorothiazide on a Glassy Carbon Electrode and Its Voltammetric Determination in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 363–369, 2014.

ALNAJJAR, A. O.; IDRIS, A. M.; ATTIMARAD, M. V.; ALDUGHAISH, A. M.; ELGORASHE, R. E. Capillary Electrophoresis Assay Method for Metoprolol and Hydrochlorothiazide in Their Combined Dosage Form with Multivariate Optimization. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 1, p. 92–97, 2013.

ALPDOĞAN, G.; SUNGUR, S. AAS and Spectrophotometric Methods for the Determination Metoprolol Tartrate in Tablets. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 55, n. 13, p. 2705–2709, 1999.

ANGUS, J. C. Diamond Synthesis by Chemical Vapor Deposition: The Early Years. **Diamond and Related Materials**, v. 49, p. 77–86, 2014.

ARISTOV, N.; HABEKOST, A. Cyclic Voltammetry - a Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes. **World Journal of Chemical Education**, v. 3, n. 5, p. 115–119, 2015.

BAIRU, S. G.; STEFAN, R.-I.; VAN STADEN, J. F. Polycrystalline Diamond-Based Electrochemical Sensors and Their Applications in Inorganic and Organic Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 145–153, 2003.

BANNISTER, F. A.; LONSDALE, K. Laboratory Synthesis of Diamond. **Nature**, v. 151, p. 334–335, 1943.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BARROS, R. de C. M. de; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. da S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de Diamante CVD Dopado Com Boro. Parte I. Histórico, Produção E Caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005.

BEITOLLAHI, H.; GHORBANI, F. Benzoylferrocene-Modified Carbon Nanotubes Paste Electrode as a Voltammetric Sensor for Determination of Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical and Biological Samples. **Ionics**, v. 19, n. 11, p. 1673–1679, 19 Nov. 2013.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRETT, A. M. O. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. New York: Oxford University Press Inc, 1993.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica princípios, métodos e aplicações**. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 1993.

BRIJESH, S.; PATEL, D. K.; GHOSH, S. K. Development of Reverse-Phase HPLC Method for Simultaneous Analysis of Metoprolol Succinate and Hydrochlorothiazide in a Tablet Formulation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 6, p. 539–543, 2009.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British pharmacopoeia**. 5. ed. London: The Stationery Office, 2013.

BROCENSKI, R. F.; HAMMER, P.; DESLOUIS, C.; ROCHA-FILHO, R. C. Assessments of the Effect of Increasingly Severe Cathodic Pretreatments on the Electrochemical Activity of Polycrystalline Boron-Doped Diamond Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5363–5368, 17 May 2016.

BRYCHT, M.; KACZMARSKA, K.; USLU, B.; OZKAN, S. A.; SKRZYPEK, S. Sensitive Determination of Anticancer Drug Imatinib in Spiked Human Urine Samples by Differential Pulse Voltammetry on Anodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 68, p. 13–22, 2016.

CHRISTENSEN, P. A.; HAMNETT, A. **Techniques and mechanisms in electrochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1994.

COSTA, D. J. E.; MARTÍNEZ, A. M.; RIBEIRO, W. F.; BICHINHO, K. M.; DI NEZIO, M. S.; PISTONESI, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Determination of Tryptamine in Foods Using Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry. **Talanta**, v. 154, p. 134–140, 2016.

DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Adsorptive Stripping Differential Pulse Voltammetric Determination of Metoprolol at Nafion-CNT-Nano-Compostite Film Sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 632–638, 2013.

DILGIN, D. G.; KARAKAYA, S. Differential Pulse Voltammetric Determination of Acyclovir in Pharmaceutical Preparations Using a Pencil Graphite Electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 63, p. 570–576, 2016.

DRUGS.COM. **Top 100 Drugs for 2013 by Units - U.S. Pharmaceutical Statistics**. Disponível em: <<https://www.drugs.com/stats/top100/2013/units>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

EISELE, A. P. P.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1734–1741, 2013.

EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R. Simple and Rapid Determination of Loratadine in Pharmaceuticals Using Square-Wave Voltammetry and a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Anal. Methods**, v. 7, n. 20, p. 8697–8703, 2015.

ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. **Practical statistics for the analytical scientist**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009.

FANG, J.; SEMPLE, H. A.; SONG, J. Determination of Metoprolol, and Its Four Metabolites in Dog Plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 809, n. 1, p. 9–14, 2004.

FERRAZ, B. R. L.; LEITE, F. R. F.; BATISTA, B. L.; MALAGUTTI, A. R. Voltammetric Determination of Ethionamide in Pharmaceutical Formulations and Human Urine Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 677–684, 2016.

FUJIMORI, N.; IMAI, T.; DOI, A. Characterization of Conducting Diamond Films. **Vacuum**, v. 36, n. 1–3, p. 99–102, 1986.

GAO, F.; ZHANG, M.; CUI, X.; WANG, Z.; SUN, Y.; GU, J. Simultaneous Quantitation of Hydrochlorothiazide and Metoprolol in Human Plasma by Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 149–154, 2010.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

GRANGER, M. C.; SWAIN, G. M. The Influence of Surface Interactions on the Reversibility of Ferri/ferrocyanide at Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 12, p. 4551–4558, 1999.

GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. **Instrumental methods in electrochemistry**. 1. ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985.

GUEDES, T. de J.; ALECRIM, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; LIMA, A. B.; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS, W. T. P. Determination of Prazosin in Pharmaceutical Samples by Flow Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometric Detection Using Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, p. 1–7, 30 Dec. 2015.

GUPTA, K. R.; TAJNE, M. R.; WADODKAR, S. G. New Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Metoprolol Tartarate and Hydrochlorothiazide in Tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 4, p. 511–513, 2008.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's – the pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive Diamond Thin-Films in Electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 10, p. 1940–1949, 2003.

JADHAV, A. S.; TARKASE, K. N.; DESHPANDE, A. P. Quantitative Determination of Metoprolol Succinate in Bulk and Tablet Dosage Form through Comparative Study of UV and Derivative Spectroscopy. **Der Pharmacia Lettre**, v. 4, n. 3, p. 763–767, 2012.

JENSEN, B. P.; SHARP, C. F.; GARDINER, S. J.; BEGG, E. J. Development and Validation of a Stereoselective Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry Assay for Quantification of S- and R-Metoprolol in Human Plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 865, n. 1, p. 48–54, 2008.

JOHNSON, R. D.; LEWIS, R. J. Quantitation of Atenolol, Metoprolol, and Propranolol in Postmortem Human Fluid and Tissue Specimens via LC/APCI-MS. **Forensic Science International**, v. 156, n. 2–3, p. 106–117, 2006.

KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ENSAFI, H. R. Ferrocenedicarboxylic Acid Modified Carbon Paste Electrode: A Sensor for Electrocatalytic Determination of Hydrochlorothiazide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 880–887, 2009.

KATSUKI, N.; TAKAHASHI, E.; TOYODA, M.; KUROSU, T.; IIDA, M.; WAKITA, S.; NISHIKI, Y.; SHIMAMUNE, T. Water Electrolysis Using Diamond Thin-Film Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, n. 7, p. 2358–2362, 1998.

KRAFT, A. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of Detection a Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, Jun. 1983.

LOURENCAO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous Determination of Antihypertensive Drugs by Flow Injection Analysis Using Multiple Pulse Amperometric Detection with a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 754, p. 154–159, 2015.

MANSANO, G. R.; EISELE, A. P. P.; DALL'ANTONIA, L. H.; AFONSO, S.; SARTORI, E. R. Electroanalytical Application of a Boron-Doped Diamond Electrode: Improving the Simultaneous Voltammetric Determination of Amlodipine and Valsartan in Urine and Combined Dosage Forms. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 188–194, 2015.

MANSANO, G. R.; EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R. Electrochemical Evaluation of a Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Determination of an Antihypertensive Ternary Mixture of Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan in Pharmaceuticals. **Analytical Methods**, v. 7, n. 3, p. 1053–1060, 2015.

MANSANO, G. R.; SARTORI, E. R. Oxidação Eletroquímica de Anlodipino E Hidroclorotiazida Sobre O Eletrodo de Diamante Dopado Com Boro: Potencialidade de Determinação Simultânea Em Urina. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 81–86, 2015.

MATTOS, G. J.; SCREMIN, J.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; SARTORI, E. R. The Performance of Boron-Doped Diamond Electrode for the Determination of Ramipril and Its Association with Hydrochlorothiazide. **Electroanalysis**, 2017.

MILLER, J. M.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6. ed. Harlow: Pearson, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

MORAES, J. T.; EISELE, A. P. P.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; SCREMIN, J.; SARTORI, E. R. Simultaneous Voltammetric Determination of Antihypertensive Drugs Amlodipine and Atenolol in Pharmaceuticals Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1264–1272, 2016.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706–723, 1964.

NIGOVIĆ, B.; MORNAR, A.; ZAVRŠKI, M. Rapid Electroanalytical Method for Determination of Nebivolol at a Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1535–1541, 2015.

PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C.; KORN, M. G. A. Determination of Metoprolol, Acebutolol and Propranolol in Pharmaceutical Formulations Using the Same SIA System. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 563–568, 2008.

PASTOR-MORENO, G.; RILEY, D. J. Electrochemical Studies of Moderately Boron Doped Polycrystalline Diamond in Non-Aqueous Solvent. **Electrochimica Acta**, v. 47, n. 16, p. 2589–2595, 2002.

PEREZ, M. Ângela F. Validação de Métodos Analíticos: Como Fazer? Por Que Ela É Importante? **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimentos de Embalagens**, v. 22, n. 3, p. 1–9, 2010.

PHANI R S CH; PRASAD, K. R. S.; MALLU, U. R.; PHANI, R. S. C.; PRASAD, K. R. S.; MALLU, U. R. High Resolution RP-HPLC Method for the Determination of Hypertensive Drug Products. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 440–454, 2013.

PLESKOV, Y. V.; SAKHAROVA, A. Y.; KROTOVA, M. D. Photoelectrochemical Properties of Semiconductor Diamond. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 228, n. 1–2, p. 19–27, 1987.

PLESKOV, Y. V. Synthetic Diamond, a New Electrode Material for Electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045–1050, Nov. 2000.

RAJ, C. R.; TOKUDA, K.; OHSAKA, T. Electroanalytical Applications of Cationic Self-

Assembled Monolayers: Square-Wave Voltammetric Determination of Dopamine and Ascorbate. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 2, p. 183–191, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & dale's pharmacology**. 7. ed. London: Elsevier, 2012.

RAWOOL, N. D.; VENKATCHALAM, A. Analytical Method for the Simultaneous Estimation of Hydrochlorothiazide and Metoprolol Tartrate Using RP HPLC. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 2, p. 219–223, Mar. 2011.

RAZAK, A. O. Electrochemical Study of Hydrochlorothiazide and Its Determination in Urine and Tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 433–440, 2004.

REBECH, I.; SCREMIN, J.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. Sensitive Voltammetric Determination of Ticlopidine in Pharmaceuticals Employing a Multi-Walled Carbon Nanotubes Paste Electrode. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 164–173, 2016.

REZAEI, B.; DAMIRI, S. Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode as a Sensor for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide. **IEEE Sensors Journal**, v. 8, n. 9, p. 1523–1529, Sep. 2008.

ROTE, A. R.; SONAVANE, P. R. Bioanalytical Method Development and Validation for Determination of Metoprolol Tartarate and Hydrochlorothiazide Using HPTLC in Human Plasma. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 845–851, Dec. 2013.

SAKHAROVA, A.; NYIKOST, L.; PLESKOV, Y. Adsorption and Partial Charge Transfer at Diamond electrodes—I. Phenomenology: An Impedance Study. **Electrochimica Acta**, v. 37, n. 5, p. 973–978, 1992.

SALAMANCA-NETO, C. A. R.; HATUMURA, P. H.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. Electrochemical Evaluation and Simultaneous Determination of Binary Mixture of Antihypertensives Hydrochlorothiazide and Enalapril in Combined Dosage Forms Using Carbon Nanotubes Paste Electrode. **Ionics**, v. 21, n. 6, p. 1615–1622, 2015.

SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the Changing Electrochemical Behaviour of Boron-Doped Diamond Surfaces with Time after Cathodic Pre-Treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, 2006.

SANTOS, M. C. G.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Evaluation of Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide and Losartan in Pharmaceutical Formulations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 263–270, 2013.

SARTORI, E. R. **Determinação voltamétrica de analitos de interesse farmacêutico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro**. 2009. Universidade de São Carlos, 2009.

SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-Wave Voltammetric Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode without the Need of Previous Alkaline Hydrolysis Step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 360–366, 2009.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods**. 2. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

SCREMIN, J.; KARIMI-MALEH, H.; SARTORI, E. R. Electrochemical Study of the Antiplatelet Agent Ticlopidine and Its Voltammetric Determination in Pharmaceutical and Urine Samples Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Anal. Methods**, v. 7, n. 9, p. 3750–3756, 2015.

ŠELEŠOVSKÁ, R.; JANÍKOVÁ-BANDŽUCHOVÁ, L.; CHÝLKOVÁ, J. Sensitive Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Determination of the Chemotherapeutic Drug Methotrexate in Pharmaceutical and Biological Samples. **Electroanalysis**, v. 27, n. 1, p. 42–51, 2015.

SHAH, A. H.; ZAID, W.; SHAH, A.; RANA, U. A.; HUSSAIN, H.; ASHIQ, M. N.; QURESHI, R.; BADSHAH, A.; ZIA, M. A.; KRAATZ, H.-B. pH Dependent Electrochemical Characterization, Computational Studies and Evaluation of Thermodynamic, Kinetic and Analytical Parameters of Two Phenazines. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 162, n. 3, p. H115–H123, 2015.

SHORE, E. T.; CEPIN, D.; DAVIDSON, M. J. Metoprolol Overdose. **Annals of Emergency Medicine**, v. 10, n. 10, p. 524–527, 1981.

SILVA, L. L. G. da; CORAT, E. J.; BARROS, R. de C. M. de; TRAVA-AIROLDI, V. J.; LEITE, N. F.; IHA, K. Crescimento de Diamante Dopado Com Boro Para Eletrodos de Uso Em Eletroquímica. **Materials Research**, v. 2, n. 2, p. 99–103, 1999.

SMITH, E. T. Examination of  $N = 2$  Reaction Mechanisms That Reproduce pH-Dependent Reduction Potentials. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 259–264, 2006.

STOLARCZYK, M.; EKIERT, R.; KRZEK, J.; RZESZUTKO, W. Determination of Metoprolol and Hydrochlorothiazide by Derivative Spectrophotometric Method in Pharmaceutical Preparations. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, n. 3, p. 169–173, 2006.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced Electrochemical Response of Boron-Doped Diamond Electrodes Brought on by a Cathodic Surface Pre-Treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 22, p. 4021–4026, 2004.

ŠVORC, L.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Green Electrochemical Sensor for Environmental Monitoring of Pesticides: Determination of Atrazine in River Waters Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 294–300, 2013.

ŠVORC, L.; SOCHR, J.; TOMČÍK, P.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Simultaneous Determination of Paracetamol and Penicillin V by Square-Wave Voltammetry at a Bare Boron-Doped Diamond Electrode. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 227–234, 2012.

SWAIN, G. M. The Use of CVD Diamond Thin Films in Electrochemical Systems. **Advanced Materials**, v. 6, n. 5, p. 388–392, 1994.

SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R. The Electrochemical Activity of Boron-Doped Polycrystalline Diamond Thin Film Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 345–351, 1993.

TENNE, R.; PATEL, K.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. **Efficient electrochemical reduction of nitrate to ammonia using conductive diamond film electrodes** *Journal of Electroanalytical Chemistry*. [s.l.: s.n.].

TIAN, X.; CHENG, C.; YUAN, H.; DU, J.; XIAO, D.; XIE, S.; CHOI, M. M. F. Simultaneous Determination of L-Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid with Gold Nanoparticles- $\beta$ -Cyclodextrin-graphene-Modified Electrode by Square Wave Voltammetry. **Talanta**, v. 93, p. 79–85, 2012.

TSVETKOVA, B. G.; PEIKOVA, L. P. Determination of Metoprolol Tartrate and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage Form by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 168–171, 2013.

VALEZI, C. F.; DUARTE, E. H.; MANSANO, G. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. An Improved Method for Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Amlodipine and Enalapril at Multi-Walled Carbon Nanotubes Paste Electrode Based on Effect of Cationic Surfactant. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 234–243, 2014.

VRANIC, B. Z.; VANDAMME, T. F. Preliminary Study of an Offline Simultaneous Determination of Metoprolol Tartrate and Hydrochlorothiazide in Powders and Tablets by Reflectance near-Infrared Spectroscopy. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 1, p. 99–104, Jan. 2015.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2. ed. New York: WILEY-VCH, 2000.

WANG, L. Capillary Electrophoresis Coupled with Microdialysis for Continuous Monitoring of Free Metoprolol in Rabbit Blood. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 203–206, 22 Feb. 2015.

WANG, Y.; WU, Q.; CHENG, M.; CAI, C. Determination of  $\beta$ -Blockers in Pharmaceutical and Human Urine by Capillary Electrophoresis with Electrochemiluminescence Detection and Studies on the Pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 13, p. 871–877, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Q&As on hypertension**. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/82/en/>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

WU, F.; HUANG, T.; HU, Y.; YANG, X.; OUYANG, Y.; XIE, Q. Differential Pulse Voltammetric Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid on a Glassy Carbon Electrode Modified with Electroreduced Graphene Oxide and Imidazolium Groups. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 9, p. 2539–2546, 2016.

XU, T.; BAO, S.; GENG, P.; LUO, J.; YU, L.; PAN, P.; CHEN, Y.; HU, G. Determination of Metoprolol and Its Two Metabolites in Human Plasma and Urine by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Its Application in Pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 937, p. 60–66, 2013.

YANG, X. J.; HU, Y. S.; ZHENG, X.; WANG, G. J.; TU, X. D. Determination of Metoprolol in Plasma by Gas Chromatography and Electron-Capture Detection. **Yao Xue Xue Bao**, v. 25, n. 6, p. 457–61, 1990.

YANG, X.; SUN, D.; XIE, X.; ZHANG, H. Sensitive and Rapid Determination of Nifedipine Using Polyvinylpyrrolidone-Modified Carbon Paste Electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 50, n. 5, p. 453–457, 2014.

YILMAZ, B. Determination of Metoprolol in Pharmaceutical Preparations by Zero-, Second- and Third-Order Derivative Spectrophotometric Method. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2010.

YILMAZ, B.; ARSLAN, S.; AKBA, V. Gas Chromatography–mass Spectrometry Method for Determination of Metoprolol in the Patients with Hypertension. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 346–351, 2009.

YILMAZ, B.; ASCI, A.; ARSLAN, S. Determination of Metoprolol in Human Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 13, p. 1904–1908, Jul. 2010.

YILMAZ, B.; KABAN, S.; AKCAY, B. K.; CILTAS, U. Differential Pulse Voltammetric Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Preparations and Human Serum. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 2, p. 285–294, 2015.

YILMAZ, B.; MERAL, K.; ASCI, A.; ORNGANER, Y. Determination of Metoprolol in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms by Spectrofluorometry and High Performance Liquid Chromatography. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 17, n. 1, p. 25–31, 2011.

ZAK, S.; HONC, F.; GILLERAN, T. G. A Sensitive Gas Chromatography Method for the Determination of Metoprolol in Human Plasma. **Analytical Letters**, v. 13, n. 15, p. 1359–1371, 24 Jan. 1980.

ZORLUOĞLU, S. L.; TAŞDEMİR, İ. H.; ECE, A.; KILIÇ, E. A Cooperative Computational and Experimental Investigation on Electrochemical Behavior of Metoprolol and Its Voltammetric Determination. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 91, n. 10, p. 951–959, Oct. 2013.

ZUMAN, P. **The elucidation of organic electrode processes**. New York: Academic Press, 1969.