



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA COLDIBELI

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
ELETROANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
PRAVASTATINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO**

Londrina
2020

BRUNA COLDIBELI

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
ELETROANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
PRAVASTATINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina
2020

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

Coldibeli, Bruna.

Desenvolvimento de novas estratégias eletroanalíticas para a determinação de pravastatina e sua associação com o ácido acetilsalicílico / Bruna Coldibeli. - Londrina, 2020.
68 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, 2020.
Inclui bibliografia.

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

CDU 54

BRUNA COLDIBELI

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
ELETROANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE
PRAVASTATINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO**

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^a. Dr^a. Elen Julciléia Romão
Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Andressa Galli
Universidade Estadual do Centro-Oeste –
UNICENTRO

Prof^o. Dr^o. Mario Henrique Montazzolli Killner
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de Fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todo cuidado, sem Ele nada seria possível.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elen Julciléia Romão Sartori por toda orientação, por todas as oportunidades concedidas a mim ao longo da realização desse trabalho, pela confiança, amizade e carinho. Aprendi e cresci muito com a senhora.

Agradeço a minha família por todo apoio, carinho e suporte sempre, sem vocês nada disso aconteceria. Muito obrigada! Em especial, à minha mãe Deiva por sempre ter acreditado em mim e me incentivado a crescer. Todo seu amor, conselhos e exemplo fazem de mim quem eu sou hoje.

Ao meu amigo, namorado e companheiro Marco Aurélio por fazer parte de todos os momentos da minha vida, me incentivando e ajudando a crescer. Eu te amo muito!

Aos amigos e companheiros de laboratório que me acompanharam durante esses dois anos, em especial ao Carlos que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Gustavo do LQCN pelo auxílio nas análises cromatográficas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pelo auxílio financeiro durante este mestrado.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

COLDIBELI, Bruna. **Desenvolvimento de Novas Estratégias Eletroanalíticas para a Determinação de Pravastatina e sua Associação com o Ácido Acetilsalicílico.** 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O presente trabalho explora uma nova estratégia para a determinação de pravastatina (PRAV) e de sua associação com o ácido acetilsalicílico (AAS) empregando técnicas eletroanalíticas em conjunto com o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB). O comportamento voltamétrico da PRAV e do AAS foi investigado por voltametria cíclica apresentando processos irreversíveis e controlados por difusão, independente do pré-tratamento do EDDB. Sob as condições experimentais estudadas (EDDB pré-tratado catodicamente e solução tampão fosfato (pH 4,0)) e empregando a técnica de amperometria (potencial de 1,3 V), a curva analítica para PRAV foi obtida na faixa linear de concentração de 1,0 – 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção (LD) de 0,102 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A determinação simultânea de PRAV e AAS (usando EDDB pré-tratado anodicamente e solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1}) foi realizada utilizando a técnica de VOQ com resposta linear na faixa de concentração de 1,08 – 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PRAV e 3,9 – 42,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AAS, com LD de 0,204 e 0,078 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os métodos propostos foram aplicados com sucesso na determinação dos analitos em formulações farmacêuticas comercialmente disponíveis, água de torneira e urina sintética.

Palavras-chave: Determinação de estatina. Formulações farmacêuticas. Determinação simultânea. Amostra biológica. Amostra de água de torneira.

COLDIBELI, Bruna. **Development of New Electroanalytical Strategies to the Determination of Pravastatin and its Association with Acetylsalicylic Acid.** 2020. 68 p. Dissertation (Master in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

This present work explores a new strategy to the determination of pravastatin (PRAV) and its association with acetylsalicylic acid (ASA) employing electroanalytical techniques coupled to boron-doped diamond electrode (BDDE). The voltammetric behavior of PRAV and ASA was investigated by cyclic voltammetry showing irreversible and diffusion-controlled oxidation processes for both analytes, regardless of the type of BDDE pretreatment. Under the optimized conditions (cathodically pretreated BDDE and phosphate buffer solution (pH 4.0)) and employing amperometry (potential of 1.3 V), the analytical response for PRAV was linear over the range 1.0 to 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtaining a limit of detection (LOD) of 0.102 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The simultaneous determination of PRAV and ASA, (using the anodically pretreated BDDE in 0.3 mol L^{-1} H_2SO_4 solution) was made using square-wave voltammetry with linear responses over the concentration range of 1.08 – 16.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for PRAV and 3.9 – 42.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for ASA, obtaining a LOD of 0.204 and 0.078 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The methods were successfully applied to pharmaceutical formulations, synthetic urine and tap water samples.

Keywords: Statin determination. Pharmaceutical formulations. Simultaneous determination. Biological sample. Tap water sample.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fórmula estrutural da PRAV.....	21
Figura 2	Fórmula estrutural do AAS	24
Figura 3	Esquema da representação do emprego do EDDB-PTC e amperometria na determinação individual de PRAV em amostras farmacêuticas, água de torneira e urina sintética, e do EDDB-PTA juntamente com a voltametria na determinação simultânea de PRAV e AAS em amostras farmacêuticas formuladas	30
Figura 4	Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) obtidos empregando o EDDB-PTC para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ em solução tampão BR (pH 5,0)	34
Figura 5	Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) obtidos para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ em solução tampão BR (pH 5,0) empregando EDDB-PTA e EDDB-PTC	35
Figura 6	(A) Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) obtidos para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ empregando EDDB-PTC em solução tampão BR com valores de pH entre 2,0 – 7,0. (B) Gráfico de E (V) por pH	36
Figura 7	Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) obtidos para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ empregando EDDB-PTC em diferentes soluções tampão com pH 4,0	37
Figura 8	Voltamogramas cíclicos obtidos para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 4,0) empregando EDDB-PTC variando a velocidade de varredura de 5 à 200 mV s ⁻¹	38
Figura 9	Relação linear entre (A) intensidade de corrente do pico de oxidação da PRAV e a raiz quadrada da velocidade de varredura, e, (B) logaritmo da intensidade de corrente e logaritmo da velocidade de varredura, para PRAV 99,0 µmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 4,0) empregando EDDB-PTC ...	38
Figura 10	Cronoamperogramas obtidos com potencial fixo em 1,3 V para PRAV na faixa de concentração de 2,5 – 24,4 µmol L ⁻¹ empregando EDDB-PTC em solução tampão fosfato (pH 4,0). Inserção: gráficos de I _{pa} vs t ^{-1/2}	39

Figura 11	(A) Amperograma registrado em potencial de 1,3 V para adições de PRAV na faixa de concentração 1,0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) usando EDDB-PTC e (B) curva analítica correspondente.	41
Figura 12	Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos empregando EDDB-PTA para PRAV 196,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1}	46
Figura 13	Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} empregando EDDB-PTA e EDDB-PTC.....	47
Figura 14	Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA em diferentes soluções de ácidos a 0,01 mol L^{-1}	48
Figura 15	Voltamogramas cíclicos obtidos para (A) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} empregando EDDB-PTA e variando a velocidade de varredura de 5 à 200 mV s^{-1}	49
Figura 16	Relação linear entre intensidade de corrente do pico de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura para (A-i) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (A-ii) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Relação linear entre logaritmo da intensidade de corrente e logaritmo da velocidade de varredura para (B-i) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B-ii) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50
Figura 17	Cronoamperogramas obtidos para (A) PRAV na faixa de concentração de 1,99 – 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com potencial fixo em 1,32 V e (B) AAS na faixa de concentração de 4,98 – 33,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com potencial fixo em 2,10 V empregando EDDB-PTA em solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} . Inserção: gráficos de i_{pa} vs $t^{-1/2}$	51
Figura 18	Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ Hz}$; $a = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) registrados em solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} empregando o EDDB-PTA para PRAV (b – i) 1,08 – 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS (b – i) 3,96 – 42,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: amplificação dos voltamogramas da PRAV	53

- Figura 19** Curvas analíticas obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 16 para a determinação simultânea de (A) PRAV e (B) AAS54
- Figura 20** Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ Hz}$; $a = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) registrados em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA para (A) PRAV ($b - i$) $1,08 - 16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de AAS $22,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e (B) AAS ($b - i$) $3,96 - 42,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de PRAV $12,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros analíticos associados às curvas analíticas obtidas por amperometria em diferentes valores de potencial para determinação de PRAV em solução tampão fosfato (pH 4,0) usando o EDDB-PTC	40
Tabela 2	Características do método amperométrico para determinação de PRAV em comparação com outros métodos eletroanalíticos encontrados na literatura.....	42
Tabela 3	Resultados obtidos na determinação de PRAV em comprimidos com diferentes dosagens usando método amperométrico e método cromatográfico.....	44
Tabela 4	Análise de PRAV em urina sintética e água de torneira por método de adição de padrão.....	45
Tabela 5	Parâmetros operacionais das técnicas de VOQ e VPD estudados para a determinação simultânea de PRAV e AAS empregando o EDDB-PTA.....	52
Tabela 6	Parâmetros analíticos obtidos para as curvas analíticas construídas simultaneamente para PRAV e AAS empregando as técnicas de VOQ e VDP em conjunto com o EDDB-PTA em solução de H ₂ SO ₄ 0,3 mol L ⁻¹	53
Tabela 7	Parâmetros analíticos para a determinação de PRAV e AAS em solução de H ₂ SO ₄ 0,3 mol L ⁻¹ utilizando a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA	56
Tabela 8	Dados obtidos do estudo de repetibilidade e precisão intermediária de diferentes concentrações de PRAV e AAS, utilizando a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA em solução de H ₂ SO ₄ 0,3 mol L ⁻¹	56
Tabela 9	Características analíticas do método empregado na determinação simultânea de PRAV e AAS em comparação com outros métodos encontrados na literatura	58
Tabela 10	Resultados obtidos na determinação simultânea de PRAV e AAS em cápsulas formuladas usando o método voltamétrico e métodos comparativos	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔE_s	Incremento de potencial
a	Amplitude
AAS	Ácido acetilsalicílico
AS	Ácido salicílico
BR	Britton-Robinson
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria
CVD	<i>Chemical vapor deposition</i>
D_{oap}	Coeficiente difusional aparente
DPR	Desvio padrão relativo
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
EDDB-PTA	Eletrodo de diamante dopado com boro com pré-tratamento anódico
EDDB-PTC	Eletrodo de diamante dopado com boro com pré-tratamento catódico
EHgGP	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
EIC	Eletrodo impresso de carbono
E_{pa}	Potencial de pico anódico
$E_{pa/2}$	Potencial de meia onda
f	Frequência
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
HPHT	<i>High pressure/High temperature</i>
LD	Limite de detecção
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LQ	Limite de quantificação
m	coeficiente angular
n	Número de elétrons
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PPD	Polarografia de pulso diferencial
PRAV	Pravastatina

PTA	Pré-tratamento anódico
PTC	Pré-tratamento catódico
S_d	Desvio padrão
SIA	<i>Sequential injection analysis</i>
t_m	Tempo de modulação
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VRAdOQ	Voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada
α	Coefficiente de transferência de carga
v	Velocidade de varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	15
1.1.1	Eletrodo de Diamante Dopado com Boro	17
1.2	PRAVASTATINA	19
1.2.1	Métodos para a Determinação de PRAV	21
1.3	FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMBINAÇÕES DE PRAV E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	23
1.3.1	Métodos para a Determinação Individual de AAS	25
1.3.2	Métodos para a Determinação Simultânea de PRAV e AAS	26
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVOS GERAIS	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAS E MÉTODOS	28
3.1	REAGENTES E PREPARO DE SOLUÇÕES	28
3.2	INSTRUMENTAÇÃO	29
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
3.4	PREPARO DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS: COMPRIMIDOS E CÁPSULAS	31
3.5	DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL DE PRAV EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA E URINA SINTÉTICA	32
3.6	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE PRAV E AAS EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA MANIPULADA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE PRAV	34
4.1.1	Comportamento Eletroquímico da PRAV sobre o EDDB	34
4.1.2	Estudo dos Parâmetros Experimentais para a Determinação de PRAV 34	
4.1.3	Estudo da Velocidade de Varredura	37
4.1.4	Determinação Amperométrica de PRAV Usando EDDB-PTC	40

4.1.5	Aplicação do Método Amperométrico Desenvolvido na Determinação Individual de PRAV em Amostras Farmacêuticas, Ambientais e Biológicas	44
4.2	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE PRAV E AAS	45
4.2.1	Comportamento Eletroquímico da PRAV e AAS sobre o EDDB	45
4.2.2	Estudo dos Parâmetros Experimentais para a Determinação Simultânea de PRAV e AAS	46
4.2.3	Estudo da Velocidade de Varredura	48
4.2.4	Determinação Voltamétrica Simultânea de PRAV e AAS usando o EDDB-PTA	52
4.2.5	Aplicação do Método Voltamétrico Desenvolvido na Determinação Simultânea de PRAV e AAS em Amostra Farmacêutica Formulada	59
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a prática da medicina moderna expressa uma relação direta com o crescimento do consumo de fármacos, que são usados para finalidades que vão desde amenizar desconfortos ocasionados por dores, até mesmo tratamento de doenças que podem levar a morte.

Com o crescimento da população mundial, há um aumento correspondente da demanda de fármacos, e assim, conseqüentemente, necessidade cada vez maior do investimento no setor farmacêutico na pesquisa e desenvolvimento para que haja como resultado um fluxo constante de produtos inovadores que salvam, prolongam e melhoram a qualidade de vida da população (AUS DER BEEK et al., 2016; SCHWEITZER e LU, 2018).

Uma das etapas de fundamental importância no processo produtivo nas indústrias farmacêuticas é o controle de qualidade, implantado com a finalidade de garantir o cumprimento das determinações impostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), definidas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010, a qual dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BRASIL, 2010). O controle de qualidade verifica todas as matérias-primas, observa os aspectos qualitativos das operações de fabricação e inspeciona a qualidade e estabilidade dos medicamentos produzidos, a fim de assegurar qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos (KOROLKOVAS, 1988; ROCHA e GALENDE, 2014). É nessa etapa em que é realizado o monitoramento do princípio ativo do medicamento para verificar se a dosagem é concordante com a indicação do rótulo do produto, tendo em vista a garantia do sucesso terapêutico do medicamento, bem como a proteção contra possíveis efeitos adversos conseqüentes da administração de dosagens inadequadas.

Para o controle de qualidade dos medicamentos nas indústrias são adotados procedimentos oficiais descritos em farmacopéias, que podem empregar titulação por volumetria, cromatografia, gravimetria, espectrofotometria, entre outros (KOROLKOVAS, 1988). Porém, na maioria dos casos, devido a interferências e limitações dos equipamentos, as análises não são realizadas diretamente na matriz bruta da amostra, assim, essas metodologias requerem etapas de tratamento e extração da amostra, que resultam em aumento no tempo e custo da análise, além

do uso de quantidade considerável de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos ao operador e ainda tornar a técnica não ambientalmente amigável. Deste modo, surge a necessidade do desenvolvimento de novos procedimentos analíticos para a determinação de fármacos que sejam eficazes e confiáveis, com atributos adicionais como simplicidade, rapidez, baixo custo e ser ambientalmente amigável.

Em vista disso, as técnicas eletroanalíticas como a amperometria e a voltametria em conjunto com o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), consitiu uma estratégia para se compensar tempo e custo no controle de qualidade de fármacos em medicamentos ou amostras biológicas, empregando-se tratamento simplificado da amostra, apenas dissolução/diluição da mesma e uso de pouco ou nenhum solvente orgânico nas medidas realizadas.

1.1 MÉTODOS ELETROANALÍTICOS

Os métodos eletroanalíticos de análise são aqueles baseados em propriedades elétricas dos analitos em solução, como exemplo, destacam-se a voltametria e a amperometria.

A voltametria consiste na aplicação de um potencial variante com o tempo ao eletrodo de trabalho, resultando na oxidação ou redução das espécies eletroativas presentes na solução, gerando como sinal analítico a variação da intensidade de corrente, a qual é relacionada linearmente com a concentração da espécie em questão. Enquanto que na amperometria, um potencial determinado é aplicado e mantido constante ao decorrer da análise, resultando em uma variação da intensidade de corrente decorrente da oxidação ou redução da espécie adicionada à solução (BRETT e BRETT, 1993; CROUCH, SKOOG e HOLLER, 2007).

Ambas técnicas apresentam grande aplicabilidade na determinação de fármacos devido às suas vantagens como alta sensibilidade, instrumentação relativamente simples e de baixo custo, faz uso de baixos volumes de solventes orgânicos, e ainda a análise pode ser realizada em soluções coloridas e que apresentam partículas em suspensão, garantindo um preparo simples da amostra (SKOOG et al., 2007).

Além de seu uso na quantificação de espécies, a voltametria é uma

ferramenta muito valiosa para a caracterização de sistemas eletroquímicos. A voltametria cíclica (VC), por exemplo, é comumente utilizada em estudos preliminares de análise exploratória do comportamento voltamétrico dos analitos sobre a superfície do eletrodo (KISSINGER e HEINEMAN, 1983; ARISTOV e HABEKOST, 2015).

Os voltamogramas cíclicos apresentam informações importantes sobre o processo eletroquímico em estudo, de sua caracterização em processo reversível, irreversível ou quase-reversível, além do cálculo para estimar a quantidade de elétrons que são transferidos durante a reação eletroquímica na superfície do eletrodo. Outras propriedades também podem ser estimadas, como os coeficientes de transferência de carga e de difusão aparente do analito sobre a superfície do eletrodo (GOSSER, 1993; BARD e FAULKNER, 2001).

Também, o mecanismo de transporte de massa pode ser caracterizado empregando a VC e a equação de Randles-Sevcik, sendo avaliada a relação entre a intensidade de corrente do pico voltamétrico (I_p) e a velocidade de varredura (ν). Processos controlados preferencialmente pela difusão das espécies apresentam linearidade entre I_p e $\nu^{1/2}$, e coeficiente angular da reta obtida pela relação entre $\log I_p$ e $\log \nu$ próximo do valor teórico de 0,5. Já os processos controlados pela adsorção apresentam linearidade entre I_p e ν , e coeficiente angular próximo de 1,0 para a relação entre $\log I_p$ e $\log \nu$ (GOSSER, 1993).

Existem vários tipos de eletrodos de trabalho que podem ser empregados nessas técnicas, como por exemplo, eletrodos contínuos por metais inertes, como platina ou ouro; eletrodos a base de carbono, como grafite pirolítico em eletrodos de pasta de carbono, carbono vítreo, EDDB; eletrodos semicondutores, como óxido de estanho ou de índio; metal recoberto com um filme de mercúrio (BRETT e BRETT, 1993; SKOOG et al., 2007).

Cada eletrodo é caracterizado por uma faixa de potencial de trabalho que apresenta limite inferior por elevados valores de corrente devido a oxidação da água, e limite superior pela redução da água, sendo que pode variar não somente pelo material que é constituído, mas também pela solução em que está inserido, o eletrólito suporte (SKOOG et al., 2007).

1.1.1 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

O diamante é um mineral que apresenta muitas propriedades, tais como alta dureza, alto ponto de fusão, estabilidade química, alta condutividade térmica, alta resistividade, que o tornam um material de amplo emprego nas mais variadas áreas. Por apresentar uma energia de “band-gap” de aproximadamente 5,45 eV, é classificado como um isolante elétrico e não pode ser utilizado como eletrodo (BARROS et al., 2005; LUONG, MALE e GLENNON, 2009). Porém, com a adição de impurezas em sua rede cristalina, o material tem sua energia de “band-gap” diminuída, tornando-se um semicondutor. A dopagem do diamante pode ser feita com nitrogênio, boro, fósforo e enxofre, sendo o boro mais comumente utilizado (PLESKOV, 2002). Com a adição de átomos de nitrogênio e fósforo, o material preparado é um semicondutor tipo-n, apresentando energias de “band-gap” de 0,6 e 1,6 eV, respectivamente. Já para a dopagem com átomos de boro, o resultado é um material semicondutor tipo-p com energia de “band-gap” de aproximadamente 0,37 eV, e então este material passou a ser conhecido como diamante dopado com boro (LUONG, MALE e GLENNON, 2009).

Para se obter diamante sintético dopado com boro, foram desenvolvidos dois métodos de síntese, na década de 50, que são a deposição química a partir da fase vapor, do inglês “chemical vapor deposition” (CVD) e o crescimento a alta-pressão/alta-temperatura, do inglês “high-pressure/high-temperature” (HPHT). Atualmente, por ser econômico, utilizar reatores de construção e manuseio simplificado e permitir o crescimento dos filmes em vários substratos de diferentes formatos e tamanhos, o método CVD é o mais empregado na produção em série de filmes de diamante para suas diversas aplicações. Este consiste no crescimento de diamante sintético em diferentes tipos de substrato (sílica, grafite, carbono vítreo, molibdênio, tungstênio e até mesmo o próprio diamante) a partir da ativação de uma fase gasosa composta geralmente de metano e excesso de hidrogênio introduzida em um reator sob baixas pressões (BARROS et al., 2005; KRAFT, 2007).

A inserção de impurezas na rede cristalina do filme de diamante, para conferir ao material característica de semicondutor, é realizada com a injeção

da espécie no reator juntamente com a fase gasosa. Para a dopagem do diamante com boro, pode ser utilizado hidreto de boro (B_2H_6), trióxido de diboro (B_2O_3) e trimetilboro ($B(CH_3)_3$). A concentração de boro nos filmes de diamante podem variar de 500 a 10000 ppm, estando relacionada com a resistividade do produto final (BARROS et al., 2005; KRAFT, 2007). No geral, filmes de diamante dopado com 8000 ppm de boro têm sido os mais comumente utilizados na eletroanálise, por fornecer estabilidade às medidas realizadas.

O EDDB tem chamado atenção de pesquisadores para seu emprego em diferentes áreas, como no tratamento de água, em eletrossínteses, em fotoeletroquímica, em aplicações eletroanalíticas, entre outras, devido às suas excelentes propriedades. São elas, alta estabilidade eletroquímica, resistência à corrosão, corrente de fundo baixa e estável, ampla janela de potencial de trabalho com intervalo de aproximadamente 4,0 V vs Ag/AgCl e fraca adsorção de espécies na superfície (PLESKOV, 2002; KRAFT, 2007; PECKOVÁ, MUSILOVÁ e BAREK, 2009). Essas características aliadas ao fato da não necessidade de realização de pré-tratamento eletroquímico constante em sua superfície, faz o EDDB despontar como um dos eletrodos mais utilizados na determinação de compostos orgânicos (BALUCHOVÁ et al., 2019), principalmente fármacos.

Outra vantagem do EDDB é a possibilidade de mudança de suas terminações superficiais, que pode exercer diferenças na determinação de cada analito. Inicialmente, quando fabricado, o eletrodo apresenta suas terminações predominantemente em hidrogênio, porém, a mudança para oxigênio pode ser feita a partir de pré-tratamento eletroquímico anódico (oxidação da água) e o retorno para a superfície com terminações majoritárias em hidrogênio é realizado por pré-tratamento eletroquímico catódico (redução da água). A superfície terminada em hidrogênio confere ao eletrodo característica hidrofóbica e alta condutividade, enquanto que a terminação em oxigênio garante tendência hidrofílica e baixa condutividade (SILVA et al., 1999; SUFFREDINI et al., 2004). O EDDB pode ser utilizado em uma maior quantidade de medidas eletroquímicas sem a necessidade de realizar um novo tratamento eletroquímico, reduzindo custos, tempo e danos ambientais, quando comparado a outros eletrodos modificados e não modificados empregados na eletroanálise.

Popa e colaboradores (1999) demonstraram em seu trabalho que o

pré-tratamento anódico (PTA) foi importante na separação de dopamina e ácido ascórbico, promovendo a determinação seletiva da mesma em meio ácido. As terminações em oxigênio também promoveram a separação efetiva dos processos de oxidação de quatro fármacos da classe terapêutica dos antihipertensivos, como cloridrato de amilorida, besilato de anlodipino, hidroclorotiazida e atenolol para a determinação dos mesmos em amostras de águas e medicamentos (MORAES et al., 2017). Esse tipo de pré-tratamento também foi adequado na separação dos processos de oxidação de fármacos de diferentes classes terapêuticas em suas misturas binárias, como a atorvastatina cálcica (estatina) e besilato de anlodipino (antihipertensivo) para a determinação simultânea em medicamentos comerciais (REBECH et al., 2017).

Por outro lado, o pré-tratamento catódico (PTC), melhorou a separação e definição dos potenciais de oxidação entre cafeína e orfenadrina, na determinação simultânea de ambos com paracetamol em formulações farmacêuticas (EISELE et al., 2013). No geral, este tipo de pré-tratamento possibilita a obtenção de maiores intensidades de corrente e menores valores de potenciais de oxidação/redução para vários tipos de fármacos, tais como sulfametoxazol e trimetoprima (ANDRADE et al., 2009), propranolol e atenolol (SARTORI et al., 2010), ciclopirox (SANTOS et al., 2014), captopril (VITORETI et al., 2014), ramipril (MATTOS et al., 2017) e oxcarbazepina (LIMA et al., 2018).

1.2 PRAVASTATINA

Atualmente, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), as doenças cardiovasculares são indicadas como a principal causa de morte no mundo e estima-se que um terço dos casos dessas doenças apresentam como precursor distúrbios nos níveis de colesterol no sangue (WHO, 2008; OPAS, 2017).

A hipercolesterolemia, quadro relacionado com concentrações plasmáticas de complexos lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL, do inglês “low density lipoprotein”) superiores a 160 mg dL^{-1} , é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, em destaque a aterosclerose, e conseqüentemente outras patologias associadas a ela, tais como doença cardíaca coronariana, doença

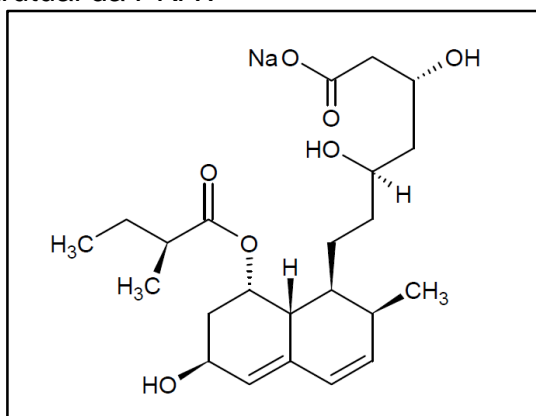
cerebrovascular isquêmica e doença vascular periférica (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 1996).

Para o controle dos níveis de LDL é recomendada mudança no estilo de vida, como alimentação saudável e atividade física, no entanto, quando essas medidas não são eficazes, também se faz necessária a administração de fármacos da classe farmacológica das estatinas para o tratamento da hipercolesterolemia. As estatinas são empregadas para tal finalidade, pois atuam como potentes inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa uma das etapas iniciais e limitante da biossíntese do colesterol (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 1996; GOLAN et al., 2014).

A classe das estatinas surgiu com a descoberta por Endo e colaboradores em 1976 de compostos isolados de cultivos de fungos *Penicillium citrinium* que inibiam a biossíntese do colesterol. Atualmente, as principais estatinas disponíveis comercialmente são a pravastatina (PRAV, Figura 1), sinvastatina, lovastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, que podem ser de origem fúngica ou sintética (ENDO, 2008; COSTA et al., 2016).

A PRAV tem origem semissintética, sendo um produto derivado da estatina natural lovastatina, é encontrada como um sal sódico, $C_{23}H_{35}NaO_7$, de massa molecular $446,51 \text{ g mol}^{-1}$ e se apresenta como um pó cristalino branco higroscópico solúvel em água e metanol.

O tratamento com a PRAV é indicado com doses de 10, 20 e 40 mg, na forma de comprimidos, sendo rapidamente absorvido pelo organismo, com taxa de excreção em 20% através da urina (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 1996; MOFFAT, OSSENTON e WIDDOP, 2004). De acordo com a “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA, a PRAV pode ser administrada por pacientes pediátricos a partir dos oito anos de idade e adolescentes (RADAELLI et al., 2018). Em vista da importância da PRAV no tratamento clínico de adultos, adolescentes e crianças, configura-se de extrema importância um rigoroso controle de qualidade dos medicamentos que contêm esse fármaco em sua composição, para eficácia terapêutica do medicamento ingerido e para que não cause nenhum dano a saúde do paciente.

Figura 1 – Fórmula estrutural da PRAV

Fonte: o próprio autor

1.2.1 Métodos para a Determinação de PRAV

Na literatura são descritos vários métodos analíticos para a determinação da PRAV em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos (plasma sanguíneo e urina). Esses métodos empregam técnicas como eletroforese capilar (NIGOVIĆ e VEGAR, 2008), espectrofotometria cinética (ASHOUR e KHATEEB, 2011), espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DUBEY, PANDEY e SHUKLA, 2017), espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), polarografia e voltametria.

A espectrofotometria é a técnica analítica mais empregada nas determinações individuais de PRAV em formulações farmacêuticas. Pode ser realizada de maneira direta, sem a necessidade de reações que antecedem a análise (BALAJI e KATTEBOINA, 2009; KALVIKKARASI et al., 2009; BODIWALA et al., 2014), ou indiretamente, a partir da redução de íons férrico a ferroso, seguido pela complexação destes íons e então a medida de absorvância (KALVIKKARASI et al., 2009). Em determinações diretas de PRAV com outras classes de fármacos, pode-se haver necessidade de tratamento matemático dos dados para a obtenção de resultados confiáveis, devido a sobreposição das bandas de absorção (EL-OLEMY, 2017).

A CLAE com detecção espectrofotométrica (CLAE-UV) é uma técnica valiosa para a separação de compostos presentes na mesma formulação e posterior quantificação. Ela tem sido utilizada para a determinação individual de

PRAV (ÖNAL e SAGIRLI, 2006; ASHOUR, NAKSHBANDI e OMAR, 2008; RAJ et al., 2010; MASLARSKA, 2014; ÜSTÜN et al., 2017), bem como simultaneamente com outras estatinas (CHAUDHARI, PATEL e SHAH, 2007; ABDALLAH, 2011; SILVA et al., 2012; SHAMSHAD, SULTANA e ARAYNE, 2015). Entretanto, como comentado, esta técnica apresenta algumas desvantagens, colocando os métodos eletroanalíticos como alternativa viável na determinação individual e simultânea de PRAV.

Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para a determinação individual de PRAV fizeram uso de eletrodos de mercúrio e eletrodos a base de carbono.

Coskun e colaboradores (1997) empregaram o eletrodo de mercúrio de gota pendente (EHgGP) e polarografia de pulso diferencial (PPD) para a determinação de PRAV em amostras farmacêuticas comerciais. Nesse tipo de eletrodo, a PRAV apresentou pico catódico irreversível em $-2,1$ V vs Ag/AgCl, que foi usado para a construção da curva analítica na faixa linear de concentração entre 80 e 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método desenvolvido necessitou de etapa de extração do fármaco das amostras com metanol por 30 min. Após essa etapa as amostras foram filtradas e tratadas com brometo de tetrametilamônio e desaeradas com nitrogênio anteriormente às análises.

Também empregando o EHgGP, Nigović (2006) reportou a determinação de PRAV em medicamentos baseados na redução do fármaco na superfície do eletrodo, usando voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de redissolução adsortiva de onda quadrada (VRAdOQ). A PRAV apresentou um pico catódico em aproximadamente $-1,4$ V vs Ag/AgCl em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 4,5). As curvas analíticas foram obtidas nas faixas de concentração de 1,0 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (VOQ) e 0,080 a 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (VRAdOQ) com tempo de acumulação de 30 s. Previamente às análises, as amostras eram sonificadas por 5 min e o nitrogênio era borbulhado na célula eletroquímica durante 4 min para a remoção de oxigênio.

O uso de eletrodos a base de carbono para a determinação de PRAV foi primeiramente reportado por Neves e colaboradores (2010). O eletrodo de carbono vítreo (ECV) e o eletrodo impresso de carbono (EIC) foram empregados e a PRAV apresentou processo irreversível de oxidação em 1,3 V (vs Ag/AgCl) e 1,0 V

(vs Ag pseudo-referência) em solução tampão BR (pH 5,0). Entre as medidas, o EIC era substituído e o ECV era polido com Al_2O_3 . A relação linear entre a intensidade de corrente e a concentração de PRAV foi obtida em uma faixa linear de concentração de $60 - 920 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50 - 1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ para EIC e ECV, respectivamente. O método apresentou tratamento simples da amostra, pela sonificação durante 5 min para a extração do fármaco.

Nesse sentido, o EDDB pode ser utilizado em substituição a esses tipos de materiais eletródicos descritos na literatura para a determinação individual e simultânea de PRAV em medicamentos ou outros tipos de amostras sem necessidade de renovação de superfície ou descarte de eletrodo após cada medida, e ainda, evitando o trabalho com materiais tóxicos como o mercúrio.

1.3 FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO COMBINAÇÕES DE PRAV E ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

O ácido acetilsalicílico (AAS), cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 2, de massa molecular $180,2 \text{ g mol}^{-1}$, pode se apresentar na forma de cristais brancos, pó cristalino branco ou grânulos pouco solúveis em água (MOFFAT, OSSENTON e WIDDOP, 2004).

Este fármaco foi sintetizado pela primeira vez em 1897 pelo químico alemão Felix Hoffmann a partir da reação do ácido salicílico com ácido acético, com o objetivo de produzir um substituto para o salicilato de sódio no tratamento de doenças reumáticas, uma vez que seu uso trazia como efeito colateral forte irritação no estômago. Mais tarde, em 1899, Friedrich Bayer patenteou o produto como aspirina, como hoje é conhecido popularmente (ELWOOD, 2001).

Pertencente ao grupo dos fármacos antiinflamatórios não-esteróides, o AAS apresenta propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas, e é indicado para alívio de dores, febre e no tratamento de doenças reumáticas. Ademais, em dosagens adequadas, o medicamento representa papel importante como agente antiplaquetário no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e cérebro-vasculares. Ele previne a agregação das células sanguíneas responsáveis pela coagulação e a formação de coágulos sanguíneos, que podem causar angina e ataque cardíaco (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN,

1996; GOLAN et al., 2014).

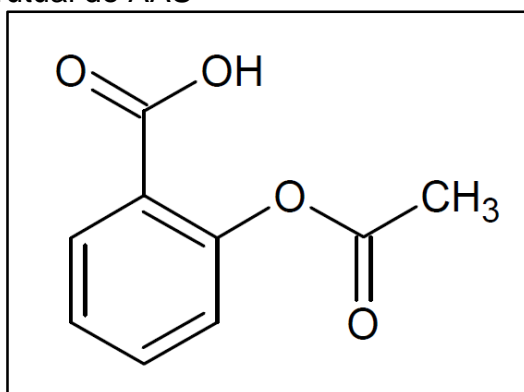
Seu mecanismo de ação consiste na ligação irreversível com o sítio ativo da enzima ciclooxigenase plaquetária através da acetilação covalente, inibindo a síntese das prostaglandinas e, assim, evitando a agregação plaquetária, responsável pelo bloqueio do fluxo sanguíneo (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 1996; RANG et al., 2012; GOLAN et al., 2014).

A dosagem de AAS indicada para seu uso como agente antiplaquetário é de 81 mg, administrada uma vez ao dia, enquanto a dose antiinflamatória desse fármaco pode atingir 650 mg, com administrações de 3 a 4 vezes por dia. Seu uso crônico pode causar irritação e erosão gástrica, hemorragia, vômitos e necrose tubular renal (GOLAN et al., 2014).

O uso combinado de PRAV e AAS é uma prática comum para diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo e prevenção contra infarto em pacientes com doença coronária. Ainda é assunto de discussão sobre a associação de ambos fármacos frente a benefícios e riscos, porém, estudos vem sendo realizados e resultados a curto prazo mostraram que a administração combinada de estatina e AAS foram eficientes para o propósito (HENNEKENS et al., 2004; LUZAK et al., 2012; ZHANG et al., 2018; FLANNAGAN et al., 2019). A dosagem comercialmente disponível de PRAV e AAS é de 40 e 81 mg, respectivamente.

Assim, considerando a condição de risco dos pacientes, surge a necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos precisos, confiáveis e ao mesmo tempo que sejam simples e rápidos para a determinação desses fármacos em diagnósticos clínicos e controle de qualidade.

Figura 2 – Fórmula estrutural do AAS



Fonte: o próprio autor.

1.3.1 Métodos para a Determinação Individual de AAS

Na literatura são descritos vários métodos para a determinação individual do AAS, seja na forma direta ou indireta. Esta última se refere a quantificação do ácido salicílico resultante da hidrólise alcalina do AAS. Esses métodos empregam, dentre outras técnicas, a espectrofotometria, potenciometria, amperometria e voltametria.

Trinder (1954) realizou a determinação espectrofotométrica do AAS a partir da reação de íons Fe^{3+} com o ácido salicílico, obtido após hidrólise alcalina do AAS, com formação de um complexo de coloração roxa que apresenta absorvância máxima em 525 nm. Mais tarde, essa mesma reação foi adaptada para um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, “flow injection analysis”) (PEREIRA, ANICETO e FATIBELLO-FILHO, 1998), utilizando “spot test” e reflectância difusa (MATIAS, VILA e TUBINO, 2004).

O sistema FIA com detecção potenciométrica foi utilizado para o desenvolvimento de procedimentos para a determinação indireta de AAS empregando um eletrodo de silicilato-tricaprililmetilamônio imobilizado com membrana de acetato de etilenovinila (ROVER et al., 1998; KUBOTA et al., 1999). Também, o sistema de análise de injeção sequencial (SIA, do inglês “sequential injection analysis” utilizando eletrodo constituído de uma membrana de policloreto de vinila contendo salicilato de tetraoctilamônio foi utilizado para a determinação de AAS (PASEKOVÁ et al., 2001).

Empregando técnicas voltamétricas, como a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a VOQ, o AAS foi determinado de forma indireta empregando o ECV (TORRIERO et al., 2004), o eletrodo de pasta de carbono e eletrodo de lápis de grafite (SUPALKOVA et al., 2006), bem como eletrodo de pasta de carbono impregnada com nanopartículas de óxido de zircônio dopado com cério (ALIZADEH e NAYERI, 2018). Nesses casos citados, o AAS foi determinado de forma indireta devido ao emprego de eletrodos de trabalho que não apresentam faixa de potencial de trabalho ampla o suficiente para atingir o alto potencial de oxidação do fármaco, ao contrário do EDDB. Assim, em 2009 este tipo de eletrodo a base de carbono foi empregado pela primeira vez na determinação voltamétrica direta de AAS, sem

necessidade da etapa de hidrólise (SARTORI et al., 2009). Após esse trabalho, outros eletrodos a base de carbono modificados com materiais nanoestruturados foram empregados para a mesma finalidade (LU e TSAI, 2010; ZHAO e LIN, 2017).

1.3.2 Métodos para a Determinação Simultânea de PRAV e AAS

Em pesquisa realizada na literatura foram encontrados dois métodos cromatográficos para a determinação simultânea de PRAV e AAS.

O primeiro método foi reportado por Polagani e colaboradores (2012) com o procedimento para a determinação simultânea dos fármacos em plasma humano empregando CLAE com detecção por espectrometria de massa (CLAE-EM) e fase móvel isocrática composta de solução tampão acetato (5,0 mmol L⁻¹) e acetonitrila (20:80, v/v). E o mais recente trabalho foi realizado por Athota e colaboradores (2017) com o desenvolvimento de um procedimento CLAE-UV para determinação em formulações farmacêuticas, empregando fase móvel constituída de mistura de água, acetonitrila e ácido acético (40:59:01, v/v/v).

Em vista de poucos procedimentos descritos na literatura para a determinação simultânea de PRAV e AAS, a voltametria em conjunto com as vantagens supracitadas do EDDB torna-se uma estratégia alternativa para tal finalidade. Destaca-se que, até o momento da realização desse trabalho, não há nenhum método voltamétrico descrito na literatura para a determinação simultânea de PRAV e AAS em medicamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Propor novas estratégias eletroanalíticas para a determinação individual de PRAV e sua associação com AAS, explorando as vantagens do EDDB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter, empregando VC, o perfil voltamétrico da PRAV e AAS para a caracterização do comportamento eletroquímico dos analitos na superfície do EDDB pela ocorrência de processos de oxidação e/ou redução.

Estudar as condições experimentais para a determinação de PRAV e AAS, como o tipo de pré-tratamento do EDDB e eletrólito suporte, nos quais os analitos apresentem melhores respostas.

Calcular o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica da PRAV e do AAS com auxílio da VC, como também caracterizar o tipo de transporte de massa dos analitos até superfície do eletrodo.

Determinar, empregando a cronoamperometria, o coeficiente de difusão aparente dos analitos em cada método proposto.

Otimizar os parâmetros instrumentais relacionados à amperometria e VOQ para a construção de curvas analíticas para a determinação da PRAV e de sua associação com AAS, respectivamente.

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras a serem analisadas.

Aplicar o método amperométrico proposto na determinação de PRAV em formulações farmacêuticas, água de torneira e urina sintética.

Aplicar o método voltamétrico simultâneo desenvolvido na determinação de PRAV e AAS em amostras farmacêuticas formuladas.

Aplicar métodos cromatográfico e titulométrico descritos na literatura, como métodos comparativos, na determinação de PRAV e AAS, respectivamente.

Comparar criteriosamente os resultados obtidos pelos métodos propostos com aqueles obtidos utilizando métodos comparativos.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PREPARO DE SOLUÇÕES

As soluções utilizadas em todos os experimentos realizados foram preparadas com reagentes comerciais de grau analítico e água ultrapura (resistividade = 18,2 M Ω cm), purificada em sistema Milli-Q (Millipore®). PRAV, AAS e ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Todos os demais reagentes foram obtidos da Anidrol.

As amostras farmacêuticas de PRAV contendo 10, 20 e 40 mg por comprimido do fármaco foram adquiridas em drogaria local na cidade de Londrina, Paraná, Brasil. As cápsulas manipuladas contendo 40 e 81 mg de PRAV e AAS, respectivamente, foram adquiridas em farmácia de manipulação local na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

As soluções de ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido perclórico (HClO₄), ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO₃), foram preparadas em diferentes concentrações pela diluição de volumes apropriados de cada ácido em água ultrapura.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) foi preparada pela mistura de ácido acético, ácido bórico e H₃PO₄, em concentração de 0,04 mol L⁻¹. O pH foi ajustado para valores de 2,0 a 10,0 com adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 mol L⁻¹.

A solução tampão acetato (pH 4,0) foi preparada pela mistura das soluções de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 2,0 mol L⁻¹.

A solução tampão McIlvaine (pH 4,0) foi preparada pela mistura de soluções de ácido cítrico e fosfato de potássio dibásico, ambos em concentração 0,1 mol L⁻¹.

A solução tampão fosfato (pH 4,0) foi preparada pela mistura de soluções de fosfato de potássio monobásico e dibásico, ambos em concentração 0,1 mol L⁻¹.

A solução estoque de PRAV 10,0 mmol L⁻¹ foi preparada em água ultrapura e a solução estoque de AAS 10,0 mmol L⁻¹ foi preparada em solução de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ e sonificada por 10 min em banho de ultrassom para completa

dissolução (SARTORI et al., 2009). As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição apropriada das soluções estoque no respectivo eletrólito suporte, sendo preparadas nos dias dos experimentos.

As soluções utilizadas para o estudo de interferentes para cada um dos métodos desenvolvidos foram preparadas na concentração $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo realizadas diluições apropriadas.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas amperométricas e voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de vidro com compartimento único acoplada à um potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT101 (Autolab) controlado pelo software NOVA 2.1. Na célula eletroquímica foram posicionados os três eletrodos necessários às análises, sendo eles, uma placa de platina de $0,25 \text{ cm}^2$ como eletrodo auxiliar, o Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência e o EDDB como eletrodo de trabalho.

O EDDB utilizado apresenta área geométrica de $0,25 \text{ cm}^2$ cujo filme de diamante contendo 8000 ppm de boro foi adquirido comercialmente da Adamant (Suíça). O método de crescimento desse filme em um substrato de silício foi realizado pela técnica CVD, na qual a fase gasosa consistia em metano com excesso de gás hidrogênio e trimetilboro como dopante. Antecedente às análises eletroquímicas, o EDDB foi pré-tratado anodicamente pela aplicação de densidade de corrente de $+0,25 \text{ A cm}^2$ por 60 segundos ou catodicamente pela aplicação de $-0,25 \text{ A cm}^2$ por 240 segundos em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

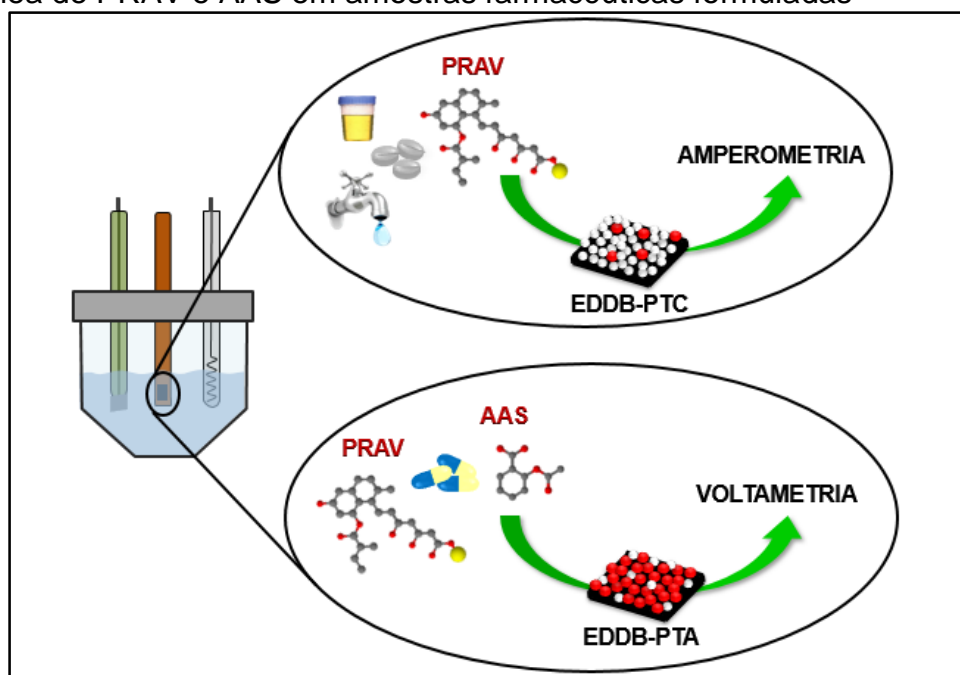
O pH das soluções foi medido a $25 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando um pHmetro BEL Engineering W3B acoplado a um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externa de Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido LC Thermo Electron Corporation Finnigan com detector de arranjo de fotodiodo Surveyor PDA Plus, e uma coluna ACE 5 C18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$).

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Estudos preliminares empregando VC foram realizados para a obtenção do perfil voltamétrico da PRAV e do AAS sobre o EDDB, bem como para a escolha das melhores condições experimentais referentes à superfície do EDDB, pH do meio e eletrólito suporte. A amperometria e o EDDB-PTC foram empregados no desenvolvimento de procedimento para determinação individual de PRAV, e para a determinação simultânea de PRAV e AAS foram utilizados a VOQ e o EDDB-PTA. A Figura 3 ilustra a representação esquemática das diferentes superfícies do EDDB, técnicas eletroanalíticas empregadas na determinação de PRAV e de sua associação com AAS, contendo seus respectivos tipos de amostras.

Figura 3 – Esquema da representação do emprego do EDDB-PTC e amperometria na determinação individual de PRAV em amostras farmacêuticas, água de torneira e urina sintética, e do EDDB-PTA juntamente com a voltametria na determinação simultânea de PRAV e AAS em amostras farmacêuticas formuladas



Fonte: o próprio autor

Após a escolha dos parâmetros instrumentais das técnicas eletroquímicas, as curvas analíticas foram construídas por adições sucessivas de alíquotas de solução padrão dos analitos na célula eletroquímica contendo 10 mL do respectivo eletrólito suporte, sendo precedidas pelas medidas amperométricas ou

voltamétricas.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$LD = \frac{3 \times S_d}{m} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_d}{m} \quad (2)$$

sendo, S_d o desvio padrão da intensidade de corrente calculado para dez medidas da solução do branco, e m o valor do coeficiente angular da respectiva curva analítica (LONG e WINEFORDNER, 1983).

A precisão dos métodos desenvolvidos foram avaliadas em termos de repetibilidade e precisão intermediária, pela medida da intensidade de corrente de cada analito em dez análises por dia, por um período de cinco dias. Os resultados foram comparados pelo valor de desvio padrão relativo (DPR).

3.4 PREPARO DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS: COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

Para o preparo das amostras farmacêuticas, dez comprimidos de cada dosagem de PRAV (10, 20 e 40 mg/comprimido) foram pesados e pulverizados em um amofariz até homogeneização. Em seguida, a massa referente à um comprimido foi dissolvida em água. Para as formulações manipuladas de PRAV e AAS, os conteúdos de dez cápsulas foram retirados cuidadosamente e pesados. Uma solução foi preparada contendo a massa referente à uma cápsula em solução de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} e sonificada em banho ultrasom por 10 min para completa dissolução de AAS (SARTORI et al., 2009).

3.5 DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL DE PRAV EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA E URINA SINTÉTICA

A determinação de PRAV em formulações farmacêuticas, amostras de água de torneira e urina sintética foi realizada por método amperométrico.

Para os medicamentos, uma alíquota de cada amostra previamente preparada no item 3.4 foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão fosfato (pH 4,0) e os amperogramas foram obtidos em triplicata. A concentração de PRAV em cada formulação foi determinada, em triplicata, utilizando a curva analítica previamente construída com soluções padrão de PRAV. Para a comparação dos resultados obtidos pelo método amperométrico proposto, foi realizada a determinação de PRAV por método cromatográfico descrito na literatura, sem modificações (ÖNAL e SAGIRLI, 2006). O sistema cromatográfico foi composto por uma fase móvel constituída pela mistura de metanol e solução tampão fosfato (pH 7,0; 0,02 mol L⁻¹) na proporção de 57:43 (v/v), vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ e detecção por espectrofotometria UV em 238 nm.

A amostra de água de torneira foi coletada no dia do experimento na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil e, dopada com 30,0 µmol L⁻¹ de PRAV. Em seguida, 1,0 mL dessa amostra dopada foi transferida para a célula eletroquímica contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato (pH 4,0). A concentração de PRAV na amostra foi determinada, em triplicata, pelo método de adição de padrão.

A amostra de urina sintética foi preparada no dia do experimento de acordo com procedimento descrito na literatura (LAUBE, MOHR e HESSE, 2001). Esta solução continha mistura de cloreto de cálcio 7,5 mmol L⁻¹, cloreto de sódio 50,05 mmol L⁻¹, sulfato de sódio 15,84 mmol L⁻¹, fosfato de potássio monobásico 12,29 mmol L⁻¹, cloreto de potássio 21,46 mmol L⁻¹, cloreto de amônio 18,69 mmol L⁻¹, ureia 0,42 mol L⁻¹ e creatinina 9,72 mmol L⁻¹. A amostra de urina sintética foi dopada com 25,0 µmol L⁻¹ de PRAV. Em seguida, 1,0 mL da amostra dopada foi transferida para a célula eletroquímica contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato (pH 4,0).

3.6 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE PRAV E AAS EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA MANIPULADA

A determinação de PRAV e AAS em formulação farmacêutica manipulada (40:81 mg/cápsula) foi realizada por método voltamétrico. Para isso, uma alíquota da amostra anteriormente preparada (item 3.4) foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} e os voltamogramas foram registrados em triplicata. A concentração de PRAV e AAS foi determinada, em triplicata, utilizando a curva analítica previamente construída com as soluções padrão de PRAV e AAS.

O método comparativo adotado para a determinação de PRAV foi o cromatográfico descrito por Önal e Sagirli (2006), como mencionado. E para a determinação de AAS foi utilizada a titulação de retorno descrita na Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013) com algumas modificações (PEREIRA, ANICETO e FATIBELLO-FILHO, 1998). A massa referente à uma cápsula foi tratada com solução padronizada de NaOH 0,0926 mol L^{-1} e aquecida cautelosamente em forno microondas para completa hidrólise do AAS em ácido salicílico, sem a ebulição da solução. Após o resfriamento, o excesso de OH^- foi titulado com solução padronizada de HCl 0,0954 mol L^{-1} , usando fenolftaleína como indicador.

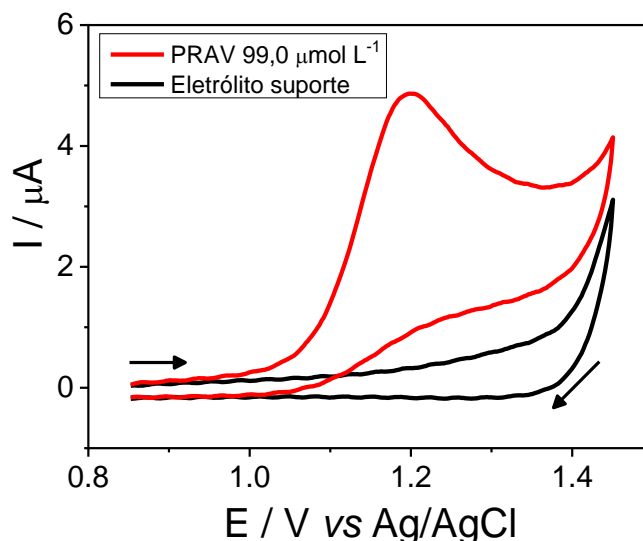
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE PRAV

4.1.1 Comportamento Eletroquímico da PRAV sobre o EDDB

O comportamento eletroquímico da PRAV sobre a superfície do EDDB-PTC em solução tampão BR (pH 5,0) foi avaliado por meio dos voltamogramas cíclicos registrados para $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito em uma janela de potencial compreendida entre 0,85 e 1,45 V (Figura 4). De acordo com o perfil voltamétrico obtido, é possível observar que no sentido anódico de varredura ocorre uma variação da intensidade de corrente com valor máximo em 1,2 V, indicando que a PRAV está envolvida em processo de oxidação irreversível, uma vez que não é observado processo de redução no sentido reverso de varredura.

Figura 4 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos empregando o EDDB-PTC para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 5,0)



Fonte: o próprio autor

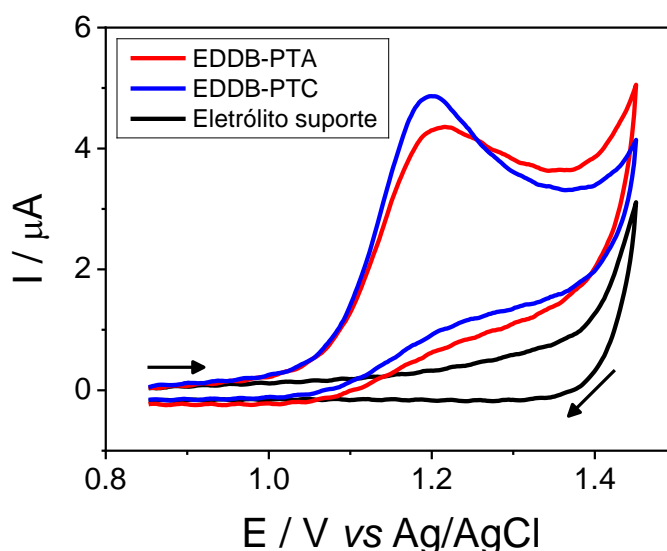
4.1.2 Estudo dos Parâmetros Experimentais para a Determinação de PRAV

Com o objetivo de determinar os parâmetros experimentais nos quais a resposta eletroquímica da PRAV sobre o EDDB apresentasse melhor

desempenho em termos de maior intensidade de corrente, melhor definição do pico anódico e repetibilidade entre as medidas, foram realizados alguns estudos.

Primeiramente, foi realizado o estudo do pré-tratamento do eletrodo. Para isso, foi investigado o efeito das duas diferentes terminações superficiais do EDDB na oxidação da PRAV. Empregando VC, foram realizadas medidas de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do fármaco no EDDB-PTA e, posteriormente, no EDDB-PTC (Figura 5). A comparação entre os resultados mostrou que a oxidação da PRAV sobre o EDDB-PTC apresentou pico de oxidação com melhor definição e maior intensidade de corrente. Logo, todos os experimentos posteriores foram realizados com o EDDB-PTC.

Figura 5 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 5,0) empregando EDDB-PTA e EDDB-PTC

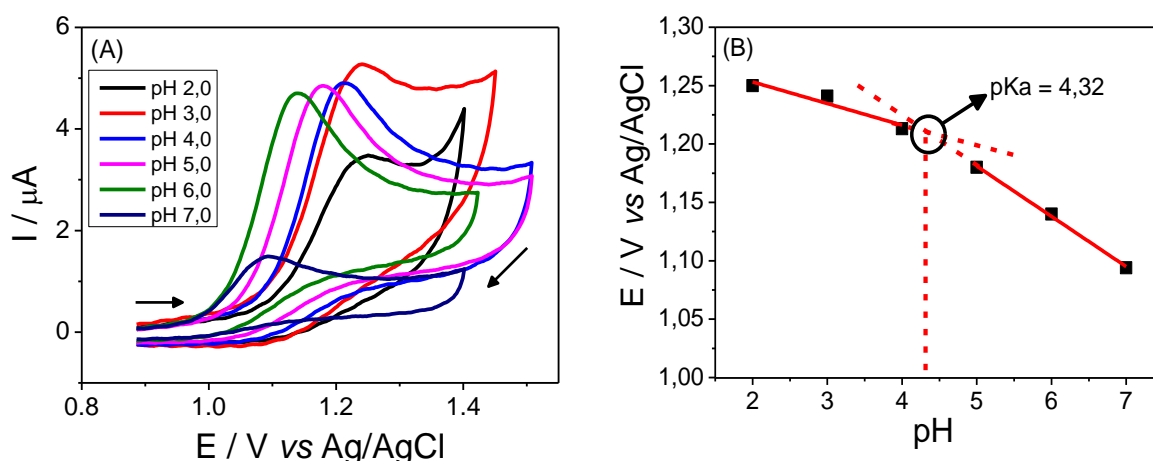


Fonte: o próprio autor

Uma vez que o tipo de pré-tratamento do eletrodo tenha sido selecionado, foi estudado o pH do eletrólito suporte. Para isso, foram realizadas análises de PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por VC variando o pH da solução tampão BR de 2,0 à 7,0 (Figura 6A). Como pode ser observado, o potencial de oxidação da PRAV é praticamente constante na faixa de pH entre 2,0 e 4,0. Por outro lado, no intervalo de 5,0 a 7,0, o potencial de oxidação desce linearmente em $43,0 \text{ mV pH}^{-1}$, de acordo com a seguinte equação: $E \text{ (V)} = (-0,043 \text{ V}) \times \text{pH} + 1,396$ ($R^2 = 0,9967$), indicando que prótons estão participando da oxidação do analito no EDDB. Ademais,

a intersecção das duas retas obtidas (Figura 6B), em pH 4,32, é atribuído ao valor experimental de pKa da PRAV, valor próximo ao teórico, de 4,2 (SERAJUDDIN, RANADIVE e MAHONEY, 1991). Em relação às características do pico anódico, valores similares de intensidade de corrente foram obtidos para os valores de pH 4,0 e 5,0. No entanto, considerando a melhor repetibilidade entre as medidas, o pH 4,0 foi escolhido para a continuidade do trabalho. Além disso, manter o pH das amostras de PRAV em torno de 4,0 impede a conversão da molécula em sua forma lactona (JEMAL e XIA, 2000). Os valores de corrente obtidos para $\text{pH} \geq 8,0$ apresentaram intensidade relativamente baixas, e por isso, os resultados não foram acrescentados na Figura 6.

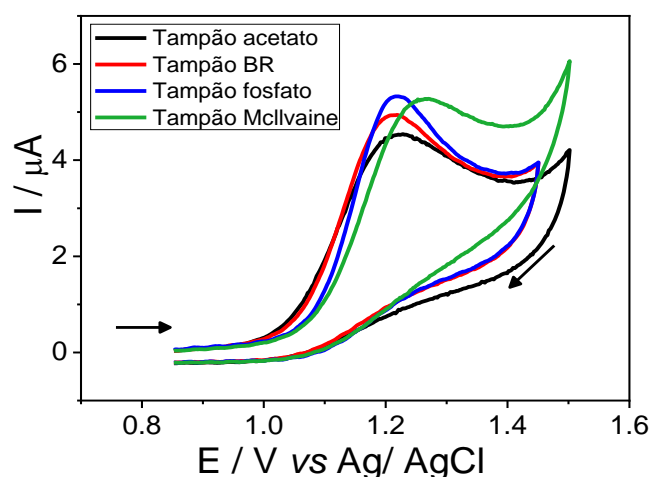
Figura 6 – (A) Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTC em solução tampão BR com valores de pH entre 2,0 – 7,0. (B) Gráfico de E (V) por pH



Fonte: o próprio autor

A resposta eletroquímica da PRAV foi avaliada em diferentes soluções tampão com valor de pH igual a 4,0. Foram realizadas análises por VC de PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato, BR, fosfato e McIlvaine (Figura 7). De acordo com os resultados obtidos, a solução tampão fosfato apresentou melhor resposta voltamétrica da PRAV, caracterizada pela melhor definição de pico de oxidação e com maior intensidade de corrente. Assim, o desenvolvimento do procedimento para a determinação individual de PRAV teve continuidade utilizando solução tampão fosfato (pH 4,0) como eletrólito suporte.

Figura 7 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTC em diferentes soluções tampão com pH 4,0



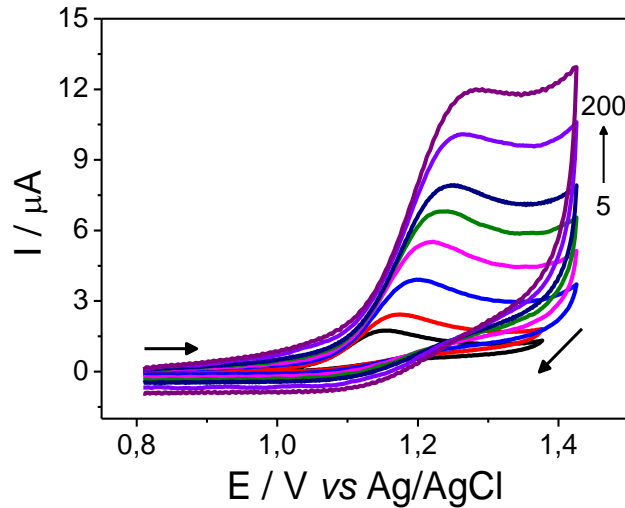
Fonte: o próprio autor

4.1.3 Estudo da Velocidade de Varredura

O estudo da velocidade de varredura foi realizado variando-se a mesma no intervalo de 5 à 200 mV s^{-1} pelo registro de voltamogramas cíclicos para $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PRAV em solução tampão fosfato (pH 4,0) (Figura 8). O aumento da velocidade de varredura resultou no aumento da magnitude de corrente do pico de oxidação e, simultaneamente, no seu descolamento para potenciais mais positivos, indicando um comportamento característico de sistemas totalmente irreversíveis (GOSSER, 1993).

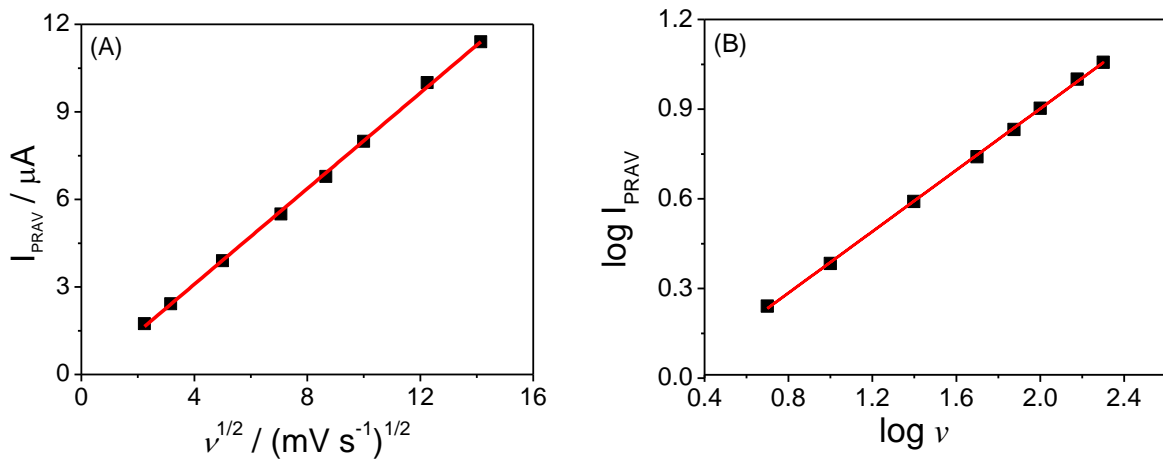
Ainda a partir dos voltamogramas da Figura 8, foram construídos gráficos de intensidade de corrente do pico de oxidação (I_{PRAV}) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e $\log I_{PRAV}$ vs $\log v$ (Figura 9). A dependência linear entre I_{PRAV} e $v^{1/2}$ expressa pela equação $I_{PRAV} = 0,819 \times v^{1/2} - 0,188$ com $R^2 = 0,9992$, indica que o processo de oxidação do PRAV sobre o EDDB-PTC é controlado pela difusão das espécies do seio da solução para a superfície do eletrodo (GOSSER, 1993). Além disso, o coeficiente angular igual a 0,5 da relação linear entre $\log I_{PRAV}$ e $\log v$ através da equação $\log I_{PRAV} = 0,513 \times \log v - 0,125$, quando comparado com o valor teórico de 0,5, confirma que a etapa mais lenta do processo eletródico é a difusão das espécies (GOSSER, 1993).

Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) empregando EDDB-PTC variando a velocidade de varredura de 5 à 200 mV s^{-1}



Fonte: o próprio autor

Figura 9 – Relação linear entre (A) intensidade de corrente do pico de oxidação da PRAV e a raiz quadrada da velocidade de varredura, e, (B) logaritmo da intensidade de corrente e logaritmo da velocidade de varredura, para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) empregando EDDB-PTC



Fonte: o próprio autor

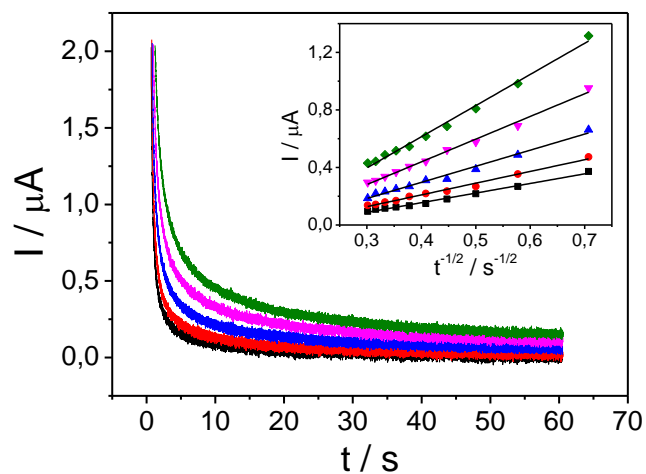
O número de elétrons (n) transferidos na oxidação da PRAV sobre o EDDB-PTC foi estimado pela Equação 3 (BARD e FAULKNER, 2001), onde E_{pa} / V é o potencial do pico anódico, $E_{pa/2} / \text{V}$ é o potencial de meia onda e α é o coeficiente de transferência de carga, cujo valor descrito na literatura para processos totalmente irreversíveis é de 0,50 (GOSSER, 1993).

$$E_{pa} - E_{pa/2} = \frac{0,047}{\alpha n} \quad (3)$$

De acordo com o voltamograma cíclico registrado com velocidade de 50 mV s^{-1} (Figura 8), os valores de E_{pa} e $E_{pa/2}$ para oxidação da PRAV foram 1,217 e 1,141 V, respectivamente. Assim, o cálculo indica que um elétron ($n = 1$) está envolvido na oxidação da PRAV na superfície do EDDB-PTC. A oxidação da PRAV pode ser explicada pela perda de 1 elétron e 1 próton do grupo hidroxila ligado ao anel e formação de um cátion radicalar (KHERA e HU, 2013).

Com auxílio da cronoamperometria foi possível determinar o coeficiente difusional aparente (D_{oap}) da PRAV em solução tampão fosfato (pH 4,0). Os cronoamperogramas foram registrados com potencial fixo em 1,3 V para concentrações do analito na faixa de $2,5 - 24,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 10). A partir dos dados obtidos foram construídos gráficos de I_{pa} vs $t^{-1/2}$ (Inserção da Figura 10), dos quais o valor do coeficiente angular da equação de reta correspondente foi aplicado na equação de Cottrell (BARD e FAULKNER, 2001) e assim, o valor de D_{oap} determinado foi de $1,39 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Figura 10 – Cronoamperogramas obtidos com potencial fixo em 1,3 V para PRAV na faixa de concentração de $2,5 - 24,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTC em solução tampão fosfato (pH 4,0). *Inserção*: gráficos de I_{pa} vs $t^{-1/2}$



Fonte: o próprio autor

4.1.4 Determinação Amperométrica de PRAV Usando EDDB-PTC

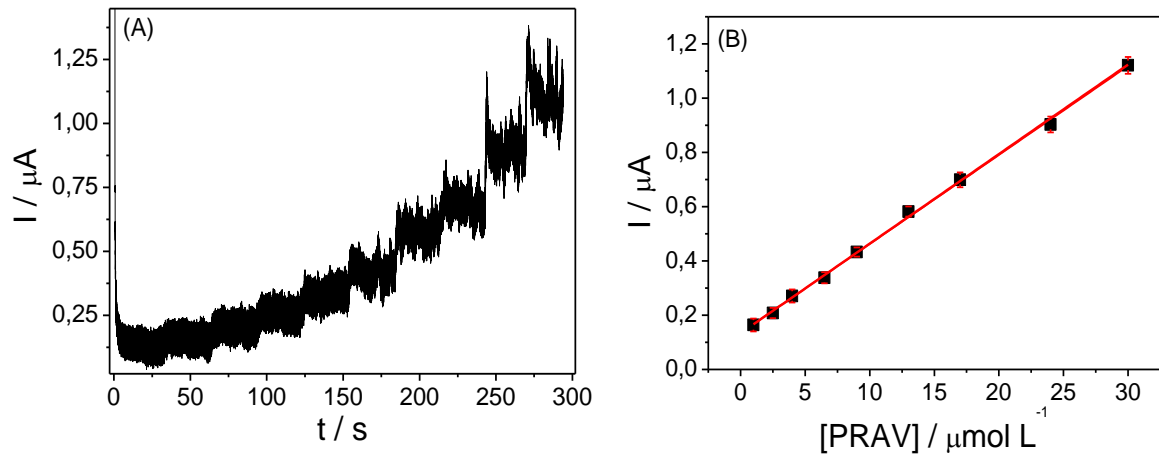
O procedimento para determinação de PRAV foi desenvolvido utilizando a amperometria e o EDDB-PTC em solução tampão fosfato (pH 4,0). Para a obtenção da curva analítica deve-se avaliar inicialmente a influência do valor de potencial aplicado. Para isso, selecionou-se 1,2, 1,3 e 1,4 V sendo construído uma curva analítica para cada valor de potencial, em intervalos de 30 s. Os parâmetros analíticos correspondentes à cada curva analítica obtida estão organizados na Tabela 1. Pode-se observar que a curva analítica construída em potencial de 1,3 V apresentou melhores resultados em termos de linearidade e sensibilidade, sendo escolhida para a determinação individual de PRAV em amostras reais. Os valores de LD e LQ calculados foram 0,102 e 0,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

O estudo da repetibilidade foi realizado a partir de 10 medidas amperométricas de PRAV 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) e apresentou DPR de 2,71%. O estudo da precisão intermediária foi feito pelas medidas de PRAV 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em um período de 5 dias, sendo que a solução analisada foi preparada no dia do estudo. O DPR calculado foi de 3,16%. Os resultados obtidos indicam a precisão do método desenvolvido, uma vez que apresentam valores de DPR < 5%.

Tabela 1 – Parâmetros analíticos associados às curvas analíticas obtidas por amperometria em diferentes valores de potencial para determinação de PRAV em solução tampão fosfato (pH 4,0) usando o EDDB-PTC

Parâmetros	Potencial (V)		
	1,2	1,3	1,4
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,0 – 24	1,0 – 30	1,0 – 30
Coeficiente angular ($\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0314	0,0328	0,0189
Coeficiente linear (μA)	0,0748	0,134	0,0757
Coeficiente de determinação, R^2	0,9960	0,9986	0,9984

Figura 11 – (A) Amperograma registrado em potencial de 1,3 V para adições de PRAV na faixa de concentração 1,0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) usando EDDB-PTC e (B) curva analítica correspondente.



Fonte: o próprio autor

As características resultantes do método amperométrico desenvolvido para a determinação de PRAV foram comparadas com aquelas apresentadas por outros métodos eletroquímicos descritos na literatura (Tabela 2). Como pode ser observado, o método amperométrico empregando o EDDB-PTC destaca-se em relação à algumas características, como por exemplo, apresentou valor de LD mais baixo em relação aos outros métodos comparados, nos quais foram empregados EHgGP, ECV e EIC (NIGOVIĆ, 2006; NEVES, NOUWS e DELERUE-MATOS, 2010), com exceção daquele no qual foi utilizada a técnica de redissolução adsortiva (NIGOVIĆ, 2006). Ademais, o uso da amperometria juntamente com o EDDB não demanda tratamento complexo de amostra que requer várias etapas ou uso de solventes orgânicos, mas somente a solubilização da PRAV em água, tornando o procedimento rápido, econômico e ambientalmente favorável. O uso do EDDB é uma alternativa ao emprego de outros materiais eletródicos já empregados na determinação de PRAV, pois não requer polimento, limpeza ou de pré-tratamento eletroquímico de sua superfície após cada medida, além de não ser tóxico como o mercúrio.

Tabela 2 – Características do método amperométrico para determinação de PRAV em comparação com outros métodos eletroanalíticos encontrados na literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Características do método	Referência
EHgGP	PPD	80 – 240	–	<ul style="list-style-type: none"> - material eletródico tóxico - uso de solventes orgânicos - tratamento complexo da amostra - etapa de desaeração 	(COSKUN, AYCAN e SUNGUR, 1997)
EHgGP	VOQ	1,0 – 10	0,13	<ul style="list-style-type: none"> - material eletródico tóxico - renovação da superfície para cada análise - tratamento simples da amostra - LD relativamente baixo - etapa de desaeração 	(NIGOVIĆ, 2006)
EHgGP	VRAdOQ	0,08 – 0,5	0,036	<ul style="list-style-type: none"> - material eletródico tóxico - etapa de adsorção - tratamento simples da amostra - LD relativamente baixo - etapa de desaeração 	(NIGOVIĆ, 2006)

ECV	VOQ	60 – 920	11	<ul style="list-style-type: none"> - baixo custo - etapa de limpeza da superfície para cada medida - tratamento simples da amostra 	(NEVES, NOUWS e DELERUE-MATOS, 2010)
EIC	VOQ	50 – 1000	30	<ul style="list-style-type: none"> - baixo custo - substituição do EIC entre as análises (eletrodo descartável) - tratamento simples da amostra 	(NEVES, NOUWS e DELERUE-MATOS, 2010)
EDDB	Amperometria	1,0 – 30	0,102	<ul style="list-style-type: none"> - não faz uso de solventes orgânicos - tratamento simples da amostra, sem filtração, apenas dissolução/diluição - sem necessidade de limpeza, renovação ou pré-tratamento da superfície do eletrodo - 200 medidas com apenas um pré-tratamento eletroquímico (DPR < 5,0%) - custo relativamente baixo 	Este trabalho

4.1.5 Aplicação do Método Amperométrico Desenvolvido na Determinação Individual de PRAV em Amostras Farmacêuticas, Ambientais e Biológicas

Anteriormente à aplicação do método nas amostras, sua seletividade foi avaliada no estudo da possível interferência de espécies comumente presentes nas matrizes das amostras analisadas. Os possíveis interferentes selecionados para esse estudo foram dióxido de silício, celulose microcristalina, lactose, óxido de magnésio, talco, Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Mn^{2+} , NO_3^- , Fe^{2+} , ácido ascórbico, cafeína, epinefrina, dopamina, ureia e ácido úrico. Para isso, uma concentração de $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PRAV foi adicionada à célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato (pH 4,0) e, em seguida, foram realizadas sucessivas adições dos possíveis interferentes para que fossem realizadas medidas amperométricas das proporções molar 10:1, 1:1, 1:10 (analito:interferente). Os resultados mostraram que as espécies estudadas não causaram variação significativa na intensidade de corrente da PRAV, e assim, foi comprovada a seletividade do método proposto.

Os resultados obtidos na determinação de PRAV em amostras farmacêuticas de diferentes dosagens foram comparados com aqueles obtidos pelo método cromatográfico (ÖNAL e SAGIRLI, 2006) (Tabela 3). Os resultados demonstram que o procedimento desenvolvido é estatisticamente semelhante ao método cromatográfico em um nível de confiança de 95%, pois aplicado o teste *t* pareado, o valor de *t* calculado foi de 2,24, menor que o *t* tabelado de 2,31. Ainda assim, a precisão do método foi comprovada pelo teste F, uma vez que, como indicado na Tabela 3, todos os valores de F calculado foram menores que o F crítico, em um nível de confiança de 95%.

Tabela 3 – Resultados obtidos na determinação de PRAV em comprimidos com diferentes dosagens usando método amperométrico e método cromatográfico

Amostra	Quantidade (mg) ^a			E (%) ^b	F _{calc} ^c
	Rotulado	Amperometria	Cromatografia		
A	10	10,4 ± 0,1	10,0 ± 0,2	3,33	3,39
B	20	19,7 ± 0,2	20,6 ± 0,4	-4,87	4,36
C	40	40,1 ± 0,2	41,0 ± 0,1	-2,20	4,66

^aMédia de 3 replicatas. ^bErro relativo = [(Método amperométrico – método cromatográfico) / (método cromatográfico)] × 100. ^c Valor crítico de F = 19,0 (nível de confiança = 95%).

O método proposto também foi aplicado na determinação de PRAV em amostras de água de torneira e urina sintética (Tabela 4). Os resultados mostraram ótimas porcentagens de recuperação para ambas as amostras, demonstrando assim, a versatilidade do uso da amperometria em conjunto com o EDDB-PTC na determinação de PRAV em vários tipos de amostras.

Tabela 4 – Análise de PRAV em urina sintética e água de torneira por método de adição de padrão

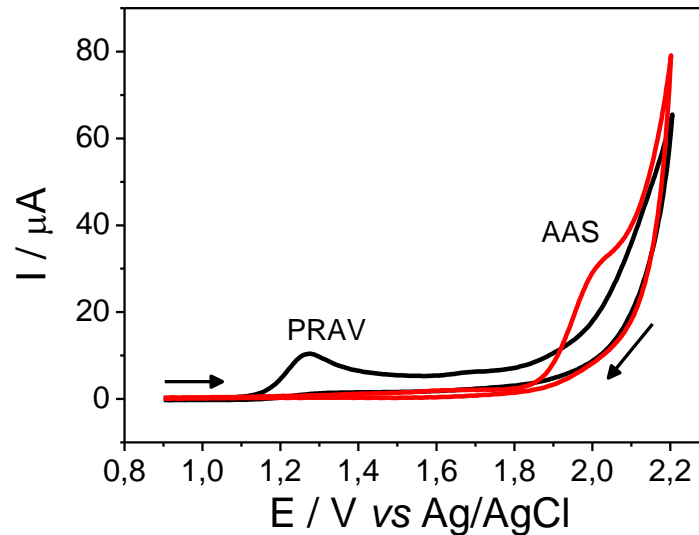
Amostra	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Recuperação ^a (%)
	Adicionado	Esperado	Recuperado	
Urina sintética	0	2,5	2,61	104
	6,5	9,0	8,91	99,0
Água de torneira	0	3,0	3,09	103
	15,0	18,0	17,8	98,8

4.2 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE PRAV E AAS

4.2.1 Comportamento Eletroquímico da PRAV e AAS sobre o EDDB

Inicialmente, a voltametria cíclica foi empregada na investigação do comportamento eletroquímico de PRAV $196,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB-PTA (Figura 12). Os perfis voltamétricos registrados em janela de potencial compreendida entre 0,7 e 2,2 V revelou que ambos fármacos estão envolvidos em processos de oxidação independentes, em potenciais distintos de 1,25 e 2,03 V, para PRAV e AAS, respectivamente, possibilitando a determinação simultânea sem interferência. Também é notada a ausência de picos de redução no sentido catódico de varredura, indicando que ambos os processos são irreversíveis.

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos empregando EDDB-PTA para PRAV $196,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

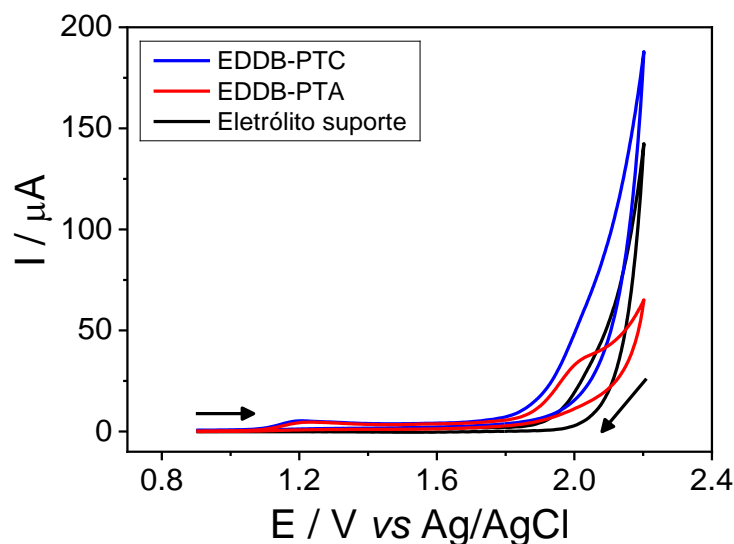


Fonte: o próprio autor

4.2.2 Estudo dos Parâmetros Experimentais para a Determinação Simultânea de PRAV e AAS

O efeito do tipo de pré-tratamento do EDDB sobre o processo de oxidação de PRAV e AAS, ambos a uma concentração de $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado empregando VC (Figura 13). De acordo com os voltamogramas obtidos, é possível observar que a oxidação do AAS na superfície do EDDB-PTA apresentou um pico anódico com melhor definição em comparação ao EDDB-PTC, no qual não é possível visualizá-lo nessas condições. Em relação ao pico de oxidação da PRAV nenhuma diferença significativa foi observada. Dessa forma, o EDDB-PTA foi utilizado para todos os experimentos realizados posteriormente.

Figura 13 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA e EDDB-PTC



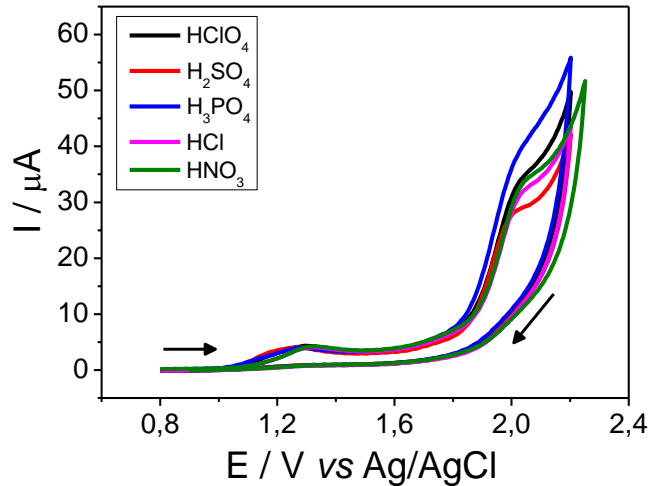
Fonte: o próprio autor

A determinação simultânea de PRAV e AAS foi realizada em meio ácido com o intuito de manter a estabilidade do AAS, evitando sua hidrólise a ácido salicílico e ácido acético (CONNORS, AMIDON e STELLA, 1986). Assim, o estudo do eletrólito suporte foi realizado, primeiramente, pela escolha do ácido e, em seguida, pela concentração do mesmo.

Para a escolha do ácido, foram registrados voltamogramas cíclicos para PRAV e AAS, ambos a uma concentração de $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando um EDDB-PTA em soluções de HClO_4 , H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl e HNO_3 em concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 14). Os voltamogramas resultantes mostram que não houve mudança significativa no pico de oxidação da PRAV; no entanto, para o AAS, o H_2SO_4 forneceu uma resposta com uma melhor definição de pico, sendo então selecionado para o próximo estudo.

A influência da concentração do H_2SO_4 foi avaliada em uma faixa de $0,01 - 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (resultados não apresentados). A solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou melhores resultados em termos de definição de pico de oxidação para PRAV e AAS e melhor repetibilidade entre as medidas de corrente, na qual foi selecionada como eletrólito suporte para a determinação simultânea de PRAV e AAS.

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos para PRAV $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA em diferentes soluções de ácidos a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

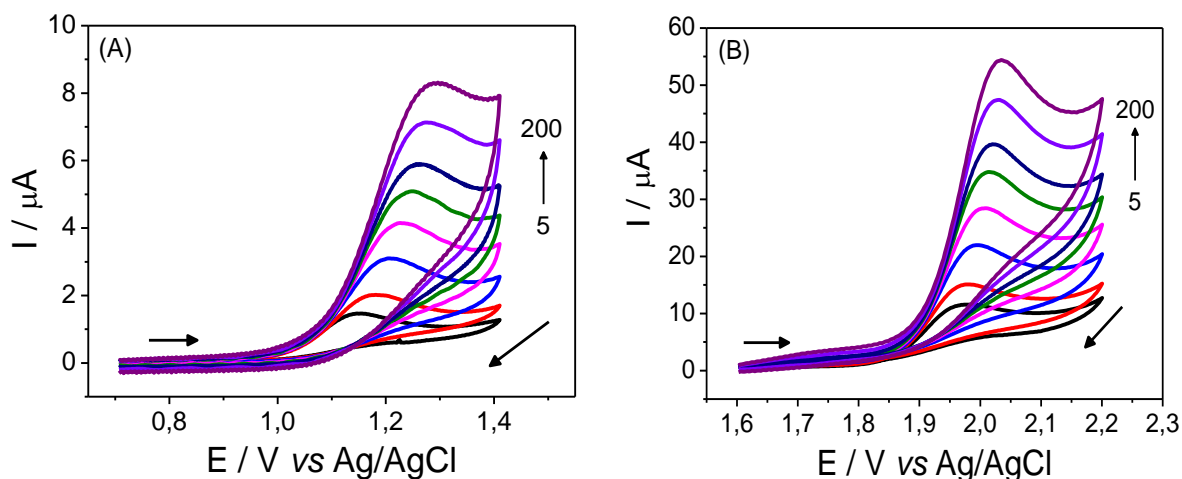


Fonte: o próprio autor

4.2.3 Estudo da Velocidade de Varredura

O estudo da velocidade de varredura foi realizado individualmente no intervalo de 5 à 200 mV s^{-1} para PRAV e AAS, ambos analitos na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 15). Os voltamogramas obtidos mostraram comportamento de processos totalmente irreversíveis (GOSSER, 1993), ou seja, aumento da intensidade de corrente com o aumento da velocidade de varredura para ambos os analitos, e, concomitantemente, o deslocamento dos potenciais de oxidação para valores mais positivos.

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos obtidos para (A) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} empregando EDDB-PTA e variando a velocidade de varredura de 5 à 200 mV s^{-1}



Fonte: o próprio autor

Os gráficos de I vs $\nu^{1/2}$ e $\log I$ vs $\log \nu$ (Figura 16) foram construídos com os dados resultantes do estudo da velocidade de varredura de ambos os analitos (Figura 15). A relação linear entre I e $\nu^{1/2}$, expressa pelas equações de reta (Equações 4 e 5) para PRAV e AAS, respectivamente, é indicativo de um processo ocorrente na superfície do EDDB-PTA controlado preferencialmente pela difusão das espécies (GOSSER, 1993). Também, os coeficientes angulares da relação linear entre $\log I$ e $\log \nu$ (Equações 6 e 7) para PRAV e AAS foram 0,468 e 0,419, respectivamente, confirmando processo difusional, dado que o valor descrito na literatura é de 0,5 (GOSSER, 1993).

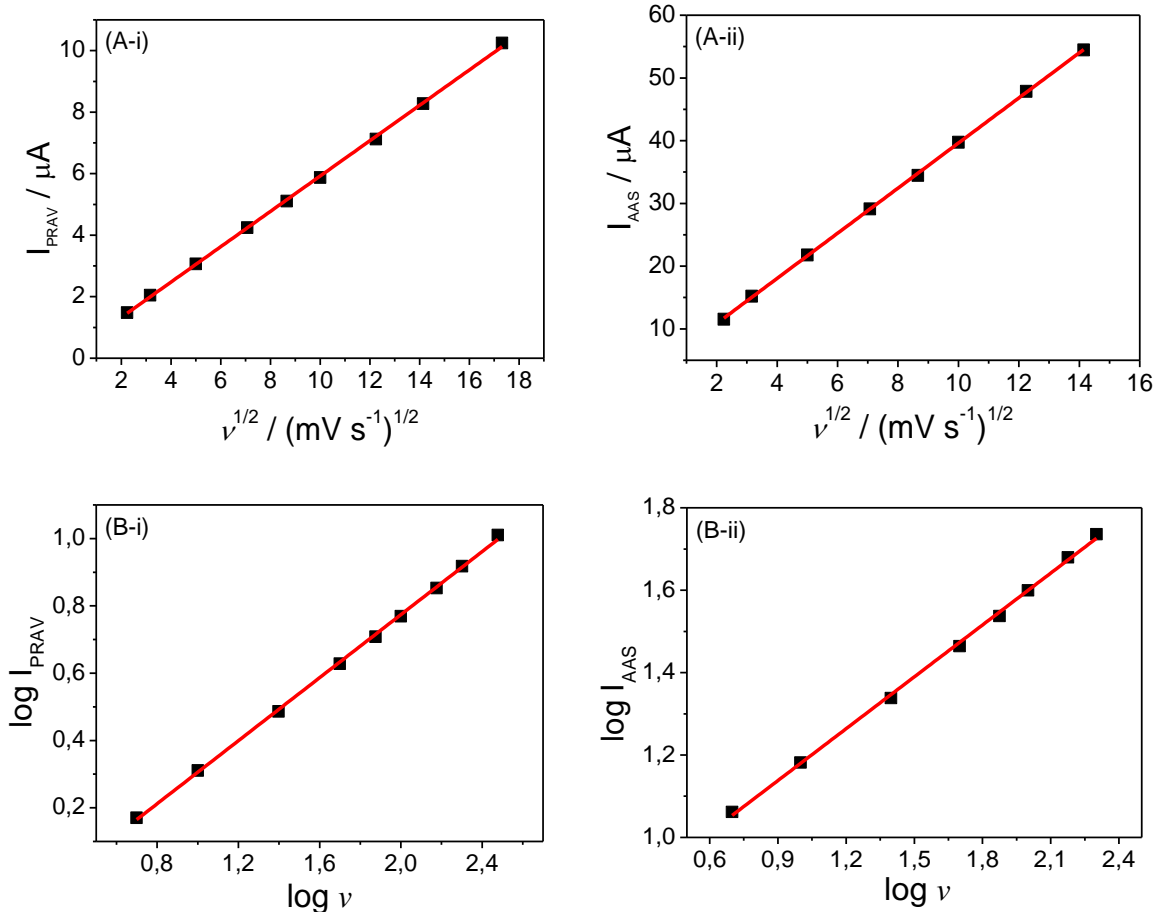
$$I_{\text{PRAV}} = 0,5746\nu^{1/2} + 0,176 \quad (R^2 = 0,9995) \quad (4)$$

$$I_{\text{AAS}} = 3,596\nu^{1/2} + 3,672 \quad (R^2 = 0,9998) \quad (5)$$

$$\log I_{\text{PRAV}} = 0,468 \log \nu - 0,163 \quad (R^2 = 0,9993) \quad (6)$$

$$\log I_{\text{AAS}} = 0,419 \log \nu + 0,760 \quad (R^2 = 0,9986) \quad (7)$$

Figura 16 – Relação linear entre intensidade de corrente do pico de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura para (A-i) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (A-ii) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Relação linear entre logaritmo da intensidade de corrente e logaritmo da velocidade de varredura para (B-i) PRAV 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B-ii) AAS 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$



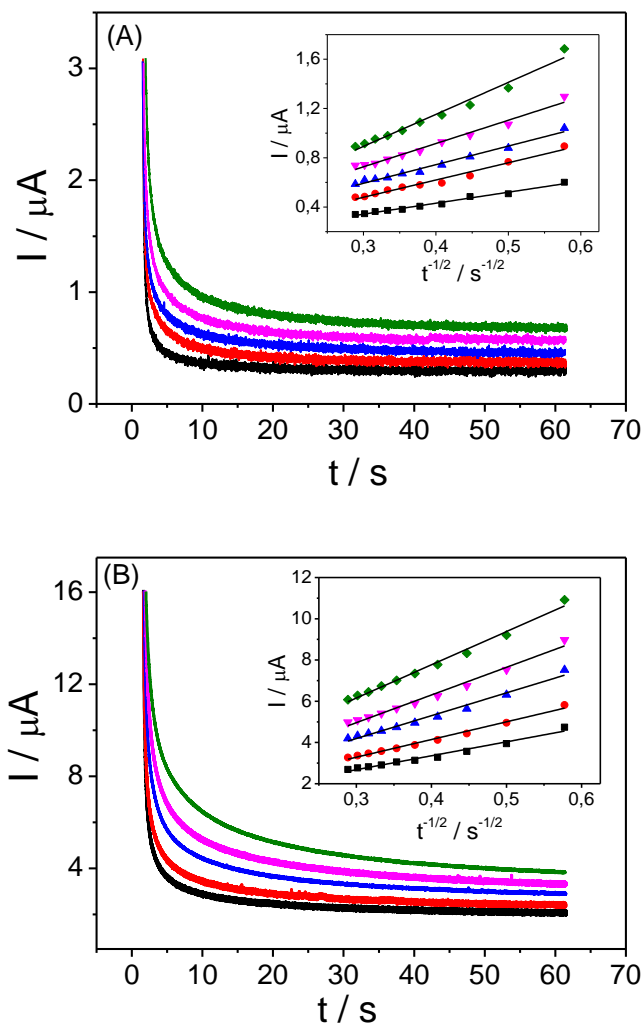
Fonte: o próprio autor

O valor de n envolvido na oxidação dos analitos na superfície do EDDB-PTA foi calculado pela Equação 3 (BARD e FAULKNER, 2001) a partir dos dados retirados do voltamograma cíclico a 50 mV s^{-1} (Figura 15). Os valores de E_p e $E_{p/2}$ foram 1,23 e 1,13 para PRAV, e 2,03 e 1,94 para AAS, respectivamente. Foi estimado 1 elétron envolvido na oxidação de cada analito, nessas condições. No caso do AAS, a oxidação ocorre devido a uma interação facilitada do analito com a superfície do EDDB-PTA devido a presença de radicais hidroxilas eletrogerados em potencial muito positivo durante a análise ($\sim 2,0 \text{ V}$), sendo provavelmente formado um composto quinônico como produto final (SARTORI, 2009).

O valor de D_{oap} para cada analito em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA foi determinado por cronoamperometria. Para isso, foram registrados cronoamperogramas na faixa de concentração $1,99 - 15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ para

a PRAV fixando o potencial em 1,32 V e na faixa de concentração 4,98 – 33,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AAS em potencial fixo de 2,10 V (Figura 17). Aplicando os valores de coeficiente angular obtidos pela relação linear entre I vs $t^{-1/2}$ (Inserção da Figura 17) na equação de Cottrell (BARD e FAULKNER, 2001), foram determinados valores de D_{oap} de $3,74 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para a PRAV e $2,89 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o AAS. O valor de D_{oap} obtido para PRAV foi menor que aquele obtido anteriormente, devido as medidas terem sido realizadas em diferentes condições experimentais, nesse caso no EDDB-PTA e solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} .

Figura 17 – Cronoamperogramas obtidos para (A) PRAV na faixa de concentração de 1,99 – 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com potencial fixo em 1,32 V e (B) AAS na faixa de concentração de 4,98 – 33,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com potencial fixo em 2,10 V empregando EDDB-PTA em solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} . *Inserção*: gráficos de I_{pa} vs $t^{-1/2}$



Fonte: o próprio autor

4.2.4 Determinação Voltamétrica Simultânea de PRAV e AAS usando o EDDB-PTA

No desenvolvimento do procedimento voltamétrico para a determinação simultânea de PRAV e AAS empregando o EDDB-PTA, as técnicas de VOQ e VPD foram comparadas. Assim, foi realizada a investigação dos parâmetros operacionais para cada uma das técnicas, sendo eles, a frequência (f), amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s) para VOQ, e, amplitude (a), velocidade de varredura (v) e tempo de modulação (tm) para a VPD. A análise de cada parâmetro foi feita pela variação em uma faixa de valores determinada, enquanto que os outros dois foram mantidos constantes. As medidas voltamétricas foram realizadas para $19,92 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada fármaco em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 5). O estudo foi efetuado com o objetivo de se determinar os parâmetros operacionais nos quais os analitos apresentassem melhores respostas, visando uma melhor resolução de pico e melhor detectabilidade do método final desenvolvido.

Tabela 5 – Parâmetros operacionais das técnicas de VOQ e VPD estudados para a determinação simultânea de PRAV e AAS empregando o EDDB-PTA

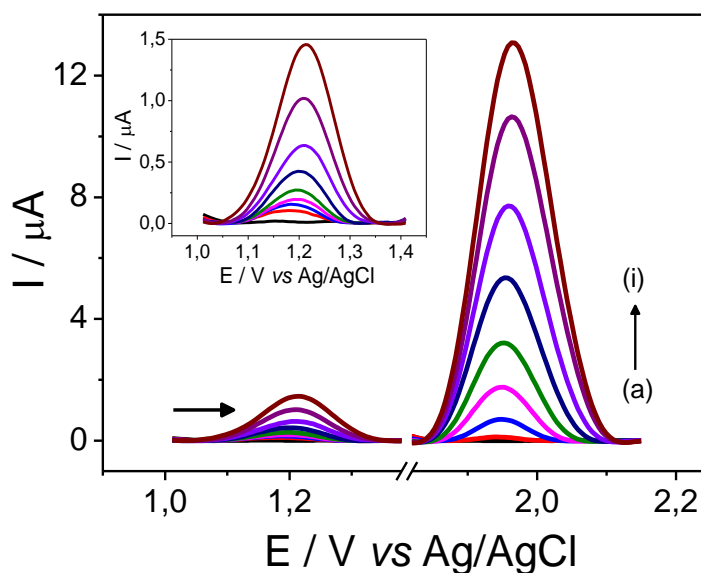
Técnica	Parâmetros	Intervalo estudado	Valor selecionado
VOQ	f (s^{-1})	10 – 80	60
	a (mV)	1 – 7	5
	ΔE_s (mV)	10 – 70	60
VPD	a (mV)	10 – 200	150
	v (mV s^{-1})	5 – 60	50
	tm (ms)	3 – 15	5

Após a escolha dos parâmetros operacionais das técnicas, foram construídas curvas analíticas para a determinação simultânea de PRAV e AAS empregando VOQ e VPD. Comparando os parâmetros analíticos (Tabela 6), é possível verificar que a VOQ apresentou melhores resultados em termos de sensibilidade, precisão e linearidade, portanto foi selecionada para a determinação simultânea de PRAV e AAS. As Figuras 18 e 19 mostram os voltamogramas obtidos e as respectivas curvas analíticas para PRAV e AAS.

Tabela 6 – Parâmetros analíticos obtidos para as curvas analíticas construídas simultaneamente para PRAV e AAS empregando as técnicas de VOQ e VDP em conjunto com o EDDB-PTA em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$

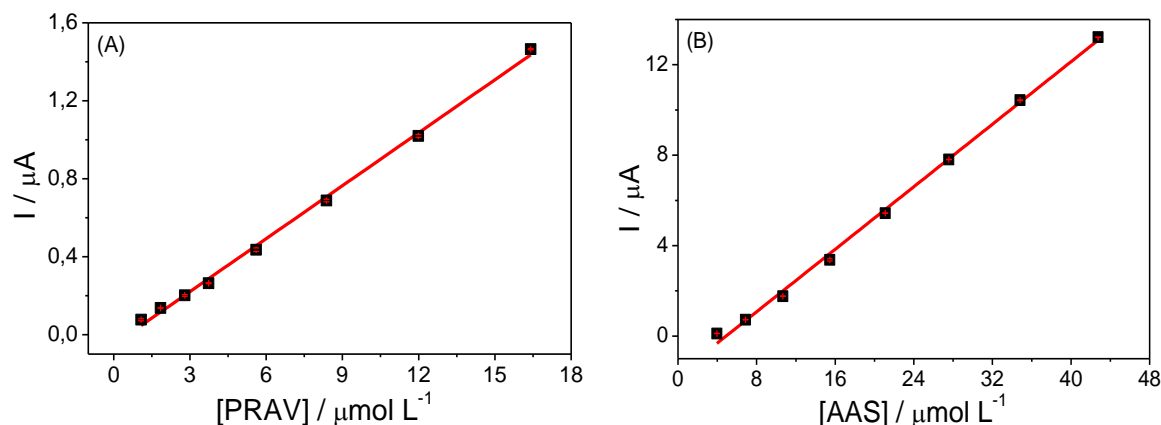
Parâmetros	VOQ		VDP	
	PRAV	AAS	PRAV	AAS
Potencial de pico (V)	1,20	1,96	1,16	1,93
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,08 – 16,4	3,96 – 42,7	0,89 – 6,91	4,93 – 42,4
R^2	0,9974	0,9972	0,9871	0,9973
Coeficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,091	0,346	0,059	0,339
Coeficiente linear (μA)	-0,052	-1,69	0,058	-1,94
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,204	0,781	0,242	0,213
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,679	0,260	0,807	0,710

Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ Hz}$; $a = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) registrados em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o EDDB-PTA para PRAV (b – i) $1,08 - 16,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AAS (b – i) $3,96 - 42,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. *Inserção:* amplificação dos voltamogramas da PRAV



Fonte: o próprio autor

Figura 19 – Curvas analíticas obtidas a partir dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 16 para a determinação simultânea de (A) PRAV e (B) AAS

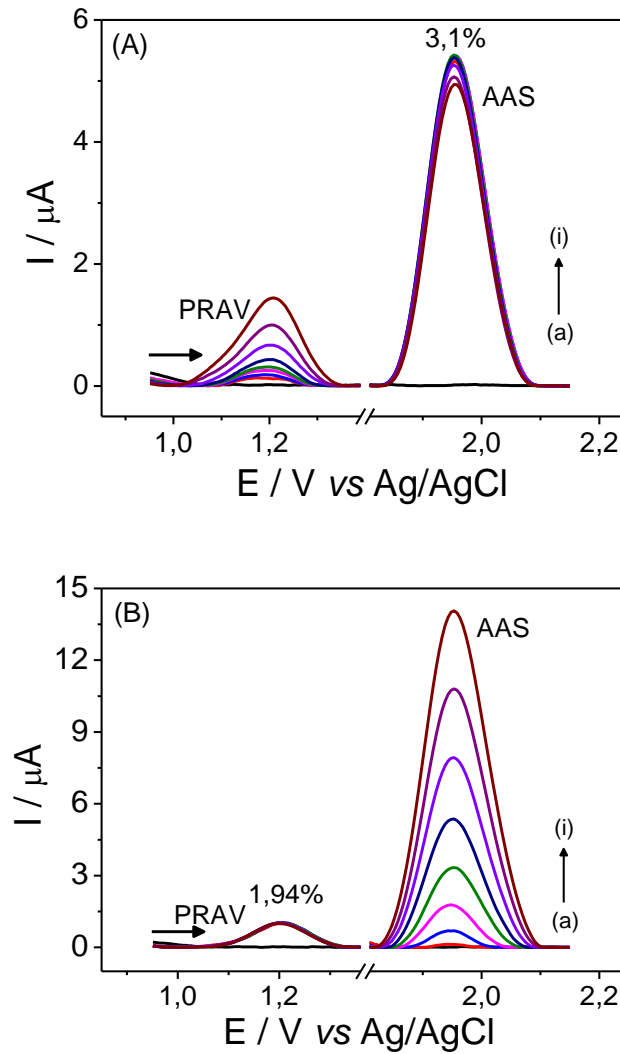


Fonte: o próprio autor

Também foi avaliado se na determinação simultânea de PRAV e AAS haveria interferência de um analito no sinal voltamétrico do outro. Esse estudo foi realizado pela construção da curva analítica de um analito enquanto a concentração do outro era mantida constante (Figura 20). A partir dos voltamogramas obtidos, é possível afirmar que não há interferência significativa de um analito na determinação do outro, dado que o DPR da intensidade de corrente para o analito com concentração mantida constante apresentou valores menores que 3,1%. Adicionalmente, as equações de retas resultantes do estudo, quando comparadas com aquelas construídas simultaneamente para PRAV e AAS (Tabela 7), não apresentaram diferenças significativas nos valores dos coeficientes angulares, confirmando assim, que um analito não interfere na determinação do outro.

A precisão do método voltamétrico simultâneo foi determinada pelo registro de 10 medidas sucessivas de concentrações diferentes de PRAV e AAS (repetibilidade) e, também, pelo registro de medida de soluções padrão preparadas diariamente em um período de 5 dias (precisão intermediária). Os resultados expressos em DPR (Tabela 8) confirmam que o método desenvolvido apresenta boa precisão para determinação simultânea de PRAV e AAS.

Figura 20 – Voltamogramas de onda quadrada ($f = 60 \text{ Hz}$; $\alpha = 60 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) registrados em solução de H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PTA para (A) PRAV (b – i) $1,08 - 16,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de AAS $22,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, e (B) AAS (b – i) $3,96 - 42,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de PRAV $12,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$



Fonte: o próprio autor

Tabela 7 – Parâmetros analíticos para a determinação de PRAV e AAS em solução de H₂SO₄ 0,3 mol L⁻¹ utilizando a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA

Analito	Faixa linear (μmol L ⁻¹)	Equação de regressão linear	R ²
a) Dados analíticos para a determinação simultânea de PRAV e AAS			
PRAV	1,08 – 16,4	$I_{\text{PRAV}} (\mu\text{A}) = 0,0906 \times c (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,0515$	0,9974
AAS	3,9 – 42,7	$I_{\text{AAS}} (\mu\text{A}) = 0,3456 \times c (\mu\text{mol L}^{-1}) - 1,96$	0,9972
b) Dados analíticos para a determinação de PRAV na presença de 22,0 μmol L ⁻¹ de AAS			
PRAV	1,08 – 16,4	$I_{\text{PRAV}} (\mu\text{A}) = 0,0894 \times c (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,0243$	0,9959
c) Dados analíticos para a determinação de AAS na presença de 12,9 μmol L ⁻¹ de PRAV			
AAS	3,9 – 42,7	$I_{\text{AAS}} (\mu\text{A}) = 0,3584 \times c (\mu\text{mol L}^{-1}) - 1,873$	0,9945

Tabela 8 – Dados obtidos do estudo de repetibilidade e precisão intermediária de diferentes concentrações de PRAV e AAS, utilizando a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA em solução de H₂SO₄ 0,3 mol L⁻¹

Analito	Concentração (μmol L ⁻¹)	Repetibilidade (DPR %)	Precisão intermediária (DPR %)
PRAV	2,86	5,34	4,89
	12,18	1,63	4,94
AAS	10,85	0,79	5,04
	35,2	0,55	3,37

As características analíticas resultantes do método voltamétrico para a determinação simultânea de PRAV e AAS foram comparadas com aquelas apresentadas por outros métodos encontrados na literatura (Tabela 9). Como pode ser observada, a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA apresentou algumas vantagens em relação aos métodos cromatográficos (POLAGANI, PILLI e GANDU, 2012; ATHOTA, JAGARLAPUDI e SINGAMPALLI, 2017), como menor tempo de análise, simplicidade no tratamento da amostra e não fazer uso de solvente orgânico e padrão interno. Não há necessidade de se fazer limpeza na superfície do eletrodo ou pré-tratamento eletroquímico após cada medida, uma vez que os analitos não adsorvem em sua superfície. Assim, a VOQ em conjunto com o EDDB é uma estratégia alternativa rápida, simples e ambientalmente favorável na determinação simultânea de PRAV e AAS em medicamentos.

Tabela 9 – Características analíticas do método empregado na determinação simultânea de PRAV e AAS em comparação com outros métodos encontrados na literatura

Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Características do método	Referência
	PRAV	AAS	PRAV	AAS		
CLAE-EM	0,0012 – 1,34	0,111 – 11,12	–	–	<ul style="list-style-type: none"> - determinação em plasma humano - uso de solvente orgânico (acetonitrila; éter metil-terc-butil) - tratamento complexo de amostra - uso de furosemida como padrão interno - tempo de análise de 2 min 	(POLAGANI, PILLI e GANDU, 2012)
CLAE-UV	22,4 – 67,4	113,8 – 341,4	0,17	1,13	<ul style="list-style-type: none"> - determinação em amostras farmacêuticas - uso de solvente orgânico (acetonitrila) - tratamento simples da amostra - tempo de análise de 6 min 	(ATHOTA, JAGARLAPUDI e SINGAMPALLI, 2017)
VOQ	1,08 – 16,4	3,96 – 42,7	0,204	0,078	<ul style="list-style-type: none"> - determinação em amostras farmacêuticas - não faz uso de solvente orgânico - tratamento simples da amostra - custo relativamente baixo - menos de 1 min por análise 	Este trabalho

4.2.5 Aplicação do Método Voltamétrico Desenvolvido na Determinação Simultânea de PRAV e AAS em Amostra Farmacêutica Formulada

Os excipientes presentes na amostra farmacêutica analisada foram investigados como possíveis interferentes na determinação simultânea de PRAV e AAS, sendo eles: dióxido de silício, celulose microcristalina, lactose, talco, dióxido de titânio e carbonato de magnésio. Para isso, foram registrados voltamogramas de PRAV e AAS, ambos em concentração de $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, na presença dos possíveis interferentes nas proporções molar de 10:1, 1:1, 1:10 (analito:interferente). Segundo os resultados obtidos, é possível afirmar que o método apresenta seletividade em amostras farmacêuticas, uma vez que não houve interferência significativa ($\text{DPR} < 5,0\%$) na intensidade de corrente da PRAV e AAS na presença das espécies analisadas.

O AS também foi testado como interferente e nesse caso apresenta pico de oxidação no mesmo potencial do AAS, inviabilizando medidas que sejam realizadas na sua presença. Dessa forma, o método voltamétrico simultâneo desenvolvido não foi aplicado na determinação de PRAV e AAS em amostras de água de torneira ou urina sintética, pois, o AS, proveniente da hidrólise alcalina do AAS, em geral está presente neste tipo de amostra (FARIA et al., 2012).

A determinação simultânea de PRAV e AAS em amostra farmacêutica formulada (40:81 mg) foi realizada pelo método voltamétrico desenvolvido e pelos métodos comparativos, sendo o cromatográfico para PRAV (ÖNAL e SAGIRLI, 2006) e o titulométrico para AAS (PEREIRA, ANICETO e FATIBELLO-FILHO, 1998; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013) (Tabela 10). O método eletroanalítico apresentou níveis equivalentes de precisão em comparação com os métodos comparativos em um nível de confiança de 95% ($F_{\text{calc}} < 19,0$). Além disso, o teste t pareado aplicado aos resultados, indicou que não há diferenças estatísticas entre os valores obtidos por VOQ e pelos métodos comparativos ($t_{\text{PRAV}} = 1,39$; $t_{\text{AAS}} = 3,30$; $t_{\text{tabelado}} = 4,30$), em nível de confiança de 95%.

Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação simultânea de PRAV e AAS em cápsulas formuladas usando o método voltamétrico e métodos comparativos

Analito	Quantidade (mg) ^a				E (%) ^b	F _{calc} ^c
	Rotulado	Método	Método			
		Voltamétrico	Comparativo			
PRAV	40	40,9 ± 0,8	41,1 ± 0,7		-0,59	1,32
AAS	81	80,7 ± 0,6	81,9 ± 1,0		-1,55	13,6

^a Média de 3 replicatas. ^b Erro relativo = [(Método voltamétrico – método comparativo) / (método comparativo)] × 100. ^c Valor crítico de F = 19,0 (nível de confiança = 95%).

5 CONCLUSÕES

Um procedimento amperométrico empregando EDDB-PTC foi desenvolvido para a determinação individual da PRAV, apresentando características como alta detectabilidade, simplicidade e rapidez, quando comparados com outros métodos já descritos na literatura. Nessas condições, a PRAV apresentou faixa linear no intervalo de 1,0 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com LD de 0,102 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) e potencial fixo de 1,3 V. O método foi aplicado com sucesso em medicamentos, água de torneira e urina sintética, demonstrando que o mesmo pode ser aplicado em diferentes tipos de matriz da amostra, desde controle de qualidade em uma indústria farmacêutica ou farmácia de manipulação até análises clínicas ou monitoramento deste em águas potáveis.

Na determinação simultânea de PRAV e AAS foi usada a VOQ em conjunto com o EDDB-PTA. Nesse caso, foi selecionado a solução de H_2SO_4 0,3 mol L^{-1} para as medidas, observando potenciais de oxidação distintos para ambos analitos, de 1,20 e 1,96 V para PRAV e AAS, respectivamente. A curva analítica apresentou faixa linear no intervalo de 1,08 – 16,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PRAV e 3,9 – 42,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AAS, com valores de LD de 0,204 e 0,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Nesse caso, o método foi aplicado com sucesso em medicamentos, demonstrando sua eficiência como método alternativo em controle de qualidade de medicamentos que contêm ambos fármacos na composição.

O filme de BDDE não apresentou adsorção de ambos fármacos na superfície do mesmo e não houve necessidade de renovação de superfície (pré-tratamento a cada medida). As técnicas eletroanalíticas empregadas proporcionaram uso de água como solvente na solubilização dos fármacos e nas medidas não houve necessidade do uso de solvente orgânico, não havendo prejuízos para o operador ou para o meio ambiente.

Por fim, os resultados aqui apresentados demonstram que as técnicas eletroanalíticas em conjunto com o EDDB configuram-se como uma excelente alternativa para a determinação individual de PRAV e de sua associação com AAS.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, O. M. RP-HPLC determination of three anti-hyperlipidemic drugs in spiked human plasma and in dosage forms. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 753–761, 2011.
- ALIZADEH, T.; NAYERI, S. Electrocatalytic oxidation of salicylic acid at a carbon paste electrode impregnated with cerium-doped zirconium oxide nanoparticles as a new sensing approach for salicylic acid determination. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 7, p. 2039–2048, 2018.
- ANDRADE, L. S. et al. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 13, p. 1475–1480, 2009.
- 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.
- ASHOUR, S.; KHATEEB, M. Kinetic spectrophotometric determination of pravastatin in drug formulations via derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 299–305, 2011.
- ASHOUR, S.; NAKSHBANDI, H.; OMAR, S. Quantitative determination of pravastatin in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **International journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 135–139, jun. 2008.
- ATHOTA, R. V.; JAGARLAPUDI, S. K.; SINGAMPALLI, M. R. Stability indicating HPLC method for the simultaneous quantification of aspirin and pravastatin in bulk and tablets: Method development and validation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 3, p. 48–56, 2017.
- AUS DER BEEK, T. et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 823–835, 2016.
- BALAJI, S.; KATTEBOINA, S. Development of spectrophotometric method for determination of pravastatin sodium in bulk and tablet formulations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1017–1019, 2009.
- BALUCHOVÁ, S. et al. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. **Analytica Chimica Acta**, 22 maio 2019.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARROS, R. de C. M. de et al. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005.

BODIWALA, K. B. et al. Development and validation of pH independent spectrophotometric method for determination of pravastatin sodium in dosage forms. **Journal of Pharmacy And Applied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 23–28, 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RCD nº 17, de 16 de abril de 2010; “Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos”**; publicado no Diário Oficial da União em 17/04/2010; Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em: 5 nov. 2019.

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

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

CHAUDHARI, B. G.; PATEL, N. M.; SHAH, P. B. Determination of simvastatin, pravastatin sodium and rosuvastatin calcium in tablet dosage forms by HPTLC. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 1, p. 130–132, 1 jan. 2007.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **Chemical stability of pharmaceuticals : a handbook for pharmacists**. Second Edition ed. [s.l.] Wiley, 1986.

COSKUN, N.; AYCAN, S.; SUNGUR, S. Differential pulse polarographic determination of pravastatin sodium in tablets. **Pharmazie**, v. 52, p. 485–486, 1997.

COSTA, S. et al. Statins and oxidative stress in chronic heart failure. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 35, n. 1, p. 41–57, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.repce.2015.12.016>>.

CROUCH, S.; SKOOG, D.; HOLLER, F. **Principles of Instrumental Analysis**. 6th. ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007.

DUBEY, S.; PANDEY, R.; SHUKLA, S. S. A validated method development for quantification of pravastatin sodium using diffuse reflectance fourier transform spectroscopy. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**], v. 51, n. 2, p. S115–S121, 2017.

EISELE, A. P. P. et al. 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, 1 jul. 2013.

EL-OLEMY, A. Simultaneous UV Spectrophotometric Determination of Pravastatin Sodium and Pioglitazone Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations. **Journal of Advanced Pharmacy Research**, v. 1, n. 3, p. 143–149, 2017.

ELWOOD, P. C. Aspirin : past , present and future. **Clinical Medicine**, v. 1, n. 2, p. 132–137, 2001.

ENDO, A. A gift from nature: The birth of the statins. **Nature Medicine**, v. 14, n. 10, p. 1050–1052, 2008.

FARIA, E. O. et al. Simultaneous Determination of Caffeine and Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Film Electrode by Differential Pulse Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 24, n. 5, p. 1141–1146, maio 2012.

FLANNAGAN, K. S. et al. Pilot randomized trial of short-term changes in inflammation and lipid levels during and after aspirin and pravastatin therapy. **Reproductive Health**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2019.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3ª Ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

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

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

HENNEKENS, C. H. et al. Additive Benefits of Pravastatin and Aspirin to Decrease Risks of Cardiovascular Disease: Randomized and Observational Comparisons of Secondary Prevention Trials and Their Meta-analyses. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 1, p. 40–44, 12 jan. 2004.

JEMAL, M.; XIA, Y.-Q. Bioanalytical method validation design for the simultaneous quantitation of analytes that may undergo interconversion during analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 5, p. 813–827, 2000.

KALVIKKARASI, S. et al. Spectrophotometric determination of pravastatin sodium in pharmaceutical oral solid dosage forms. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 1648–1650, 2009.

KHERA, S.; HU, N. Generation of statin drug metabolites through electrochemical and enzymatic oxidations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 18, p. 6009–6018, 13 jul. 2013.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702–706, 1983.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

KRAFT, A. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.

KUBOTA, L. T. et al. Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis. **Talanta**, v. 50, n. 3, p. 661–667, 1999.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1–2, p. 367–374, 1 nov. 2001.

LIMA, A. B. et al. Altered electrochemistry of oxcarbazepine on cathodically treated boron-doped diamond electrode: Selective detection by pulsed amperometric detection coupled to flow-injection analysis. **Electrochimica Acta**, v. 260, p. 564–570, 2018.

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.

LU, T. L.; TSAI, Y. C. Electrocatalytic oxidation of acetylsalicylic acid at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 148, n. 2, p. 590–594, 2010.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. v. 134, n. 10, 21 set. 2009.

LUZAK, B. et al. Pravastatin and simvastatin improves acetylsalicylic acid-mediated in vitro blood platelet inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 8, p. 864–872, 2012.

MASLARSKA, V. Development, optimization and validation of HPLC method for determination of pravastatin sodium in tablets. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 230–234, 2014.

MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 327–330, 2004.

MATTOS, G. J. et al. The performance of boron-doped diamond electrode for the determination of ramipril and its association with hydrochlorothiazide. **Electroanalysis**, v. 29, n. 4, p. 1180–1187, abr. 2017.

MOFFAT, A. C.; OSSENTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material**. 4th ed ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.

MORAES, J. T. et al. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, 2017.

NEVES, M. M. P. S.; NOUWS, H. P. A.; DELERUE-MATOS, C. Carbon surfaces for the oxidative quantification of pravastatin: glassy-carbon vs. screen-printed carbon electrodes. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 18, n. 5, p. 353–357, 2010.

NIGOVIĆ, B. Electrochemical properties and square-wave voltammetric determination of pravastatin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 2, p. 431–437, jan. 2006.

NIGOVIĆ, B.; VEGAR, I. Capillary electrophoresis determination of pravastatin and separation of its degradation products. **Croatica Chemica Acta**, v. 81, n. 4, p. 615–622, 2008.

ÖNAL, A.; SAGIRLI, O. Development of a selective LC method for the determination of pravastatin sodium. **Chromatographia**, v. 64, n. 3–4, p. 1–6, ago. 2006.

OPAS. **Doenças cardiovasculares**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096>. Acesso em: 10 nov. 2019.

PASEKOVÁ, H. et al. Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate-selective electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5–6, p. 1027–1036, 2001.

PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J.; BAREK, J. Boron-doped diamond film electrodes - new tool for voltammetric determination of organic substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 148–172, 2009.

PEREIRA, A. V.; ANICETO, C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid in tablets after on-line microwave-assisted alkaline hydrolysis. **Analyst**, v. 123, n. 5, p. 1011–1015, 1998.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: a review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275–1291, 2002.

POLAGANI, S. R.; PILLI, N. R.; GANDU, V. High performance liquid chromatography mass spectrometric method for the simultaneous quantification of pravastatin and aspirin in human plasma: Pharmacokinetic application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 206–213, 2012.

POPA, E. et al. Selective electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at anodized diamond thin film electrodes. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 2, n. 1, p. 49–51, 1999.

RADAELLI, G. et al. Statin treatments and dosages in children with familial hypercholesterolemia: Meta-analysis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 6, p. 810–821, 2018.

RAJ, N. D. et al. Reverse phase HPLC method for the determination of pravastatin in tablet dosage forms. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 187–189, 2010.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale's Pharmacology**. 7. ed. London: Elsevier, 2012.

REBECH, I. et al. Simultaneous voltammetric determination of amlodipine and atorvastatin on anodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Orbital**, v. 9, n. 4, p. 225–233, 2017.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97–103, 2014.

ROVER, L. et al. Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl

acetate membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1–3, p. 103–109, 1998.

SANTOS, M. C. G. et al. Oxidação do ciclopirox em eletrodo de diamante: estudo do comportamento voltamétrico e determinação eletroanalítica. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 147–155, 2014. Disponível em: <<http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/600>>.

SARTORI, E. R. et al. 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.

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. et al. Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 81, n. 4, p. 1418–1424, 2010.

SCHWEITZER, S. O.; LU, Z. J. **Pharmaceutical economics and policy: Perspectives, promises, and problems, third edition**. [s.l.] Oxford University Press, 2018.

SERAJUDDIN, A.; RANADIVE, S.; MAHONEY, E. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 80, n. 9, p. 830–834, 1991.

SHAMSHAD, H.; SULTANA, N.; ARAYNE, M. S. Simultaneous determination of cetirizine, atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin or pravastatin in formulations and human serum by RP-HPLC. **Analytical Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 109–116, 2015.

SILVA, L. L. G. da et al. Crescimento de diamante dopado com boro para eletrodos de uso em eletroquímica. **Materials Research**, v. 2, n. 2, p. 99–103, 1999.

SILVA, T. D. et al. Development and validation of a simple and fast HPLC method for determination of lovastatin, pravastatin and simvastatin. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 9, p. 831–838, 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

SUFFREDINI, H. B. et al. 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.

SUPALKOVA, V. et al. Electrochemical sensors for detection of acetylsalicylic acid. **Sensors**, v. 6, n. 11, p. 1483–1497, 2006.

TORRIERO, A. A. J. et al. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 247–254, 2004.

TRINDER, P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. **The Biochemical journal**, v. 57, n. 2, p. 301–303, 1954.

ÜSTÜN, Z. et al. An improved optimization study for determination of pravastatin in pharmaceutical form by using reversed phase liquid chromatography method. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, v. 7, n. 2, p. 602–607, 2017.

VITORETI, A. B. F. et al. Electroanalytical determination of captopril in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 3, p. 1044–1054, 2014.

WHO. **Raised cholesterol.** Disponível em: <https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/>. Acesso em: 10 nov. 2019.

ZHANG, Z. et al. Therapeutic effects of aspirin combined with atorvastatin on ischemic strokes. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 11, n. 10, p. 11104–11111, 2018.

ZHAO, C.; LIN, J. Electrochemically reduced graphene oxide modified screen-printed electrodes for sensitive determination of acetylsalicylic acid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, n. 11, p. 10177–10186, 2017.