



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES POZENATO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
VOLTAMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTI-  
HIPERTENSIVOS EMPREGANDO O ELETRODO DE  
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES POZENATO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
VOLTAMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTI-  
HIPERTENSIVOS EMPREGANDO O ELETRODO DE  
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Tese apresentada ao Programa de  
Doutorado Associado  
UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial  
à obtenção do título de Doutor.

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

Londrina  
2019

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

Moraes, Jaqueline Tobias de .

Desenvolvimento e validação de métodos voltamétricos para a determinação de anti-hipertensivos empregando o eletrodo de diamante dopado com boro / Jaqueline Tobias de Moraes. - Londrina, 2019.  
120 f. : il.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.  
Inclui bibliografia.


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

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES POZENATO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
VOLTAMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTI-  
HIPERTENSIVOS EMPREGANDO O ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Associado UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elien Julciléia Romão Sartori  
Braz  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

---

Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Lúcio César de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de Fevereiro de 2019.

*Dedico esta tese à minha família*

*Ao meu marido Beto, meu companheiro de todas as horas, meu ponto de equilíbrio. Seu carinho, amor e sua forma positivista de enfrentar as dificuldades da vida, foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui.*

*Aos meus pais Dito e Clarice, tudo que consegui foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo, vocês são meus exemplos de vida!*

*Aos meus irmãos, Leandro e Daniela, pelo amor, carinho e apoio em momentos difíceis.*

*À minha sogra Nice e meu sogro Athayde (in memoriam) e aos meus cunhados; Viviane, Fernando, Elisângela e Marco, pelo carinho que sempre demonstraram por mim.*

*Agradeço a todos pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.*

*Muitíssimo obrigada, amo vocês!!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos divinas, principalmente a vida, e aos planos a mim colocados, pois, sempre foram maiores do que meus sonhos!

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elen Romão Sartori, não só pelos conhecimentos transmitidos e pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua dedicação, confiança, amizade, paciência e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis, sempre me aconselhando e me ajudando a me tornar uma profissional muito melhor, à você muito obrigada!

À Dra. Ieda Spacino Scarmínio, pelo empréstimo da coluna cromatográfica para a análise das amostras pelo método comparativo.

À Dra. Suzana Lucy Nixdorf e ao Thiago do laboratório DIA, pela amizade e também pela disponibilização do uso do equipamento de cromatografia para a realização das análises comparativas.

Aos colegas do laboratório LAES, Camila, Max, Gabriel, Adriana, Bruna, Nathalia, Kayque e em especial a Jéssica, a Ana Paula e ao Carlos com os ensinamentos iniciais deste trabalho, escrita de artigos e por sempre estarem disponíveis quando eu os chamavam. Vocês moram em meu coração!

À técnica Ana, que ao longo de minha trajetória se tornou minha grande amiga.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, especialmente à Regina.

A todos que com boa intenção colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não  
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não  
sou o que era antes”.

Marthin Luther King

MORAES, Jaqueline Tobias. **Desenvolvimento e Validação de Métodos Voltamétricos para a Determinação de Anti-hipertensivos Empregando o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**. 2019. 117 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Pacientes hipertensos fazem uso diário de medicamentos para o controle diário da pressão arterial. Muitos desses anti-hipertensivos, quando administrados com dosagens acima ou abaixo do recomendado para o tratamento, podem causar efeitos indesejáveis de moderados a graves ou causar a ineficiência do mesmo. Portanto, existe a necessidade de que as quantidades apresentadas nos rótulos dos medicamentos devem estar de acordo com a dosagem indicada para cada princípio ativo. Assim, neste trabalho três procedimentos voltamétricos, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), foram desenvolvidos para a determinação simultânea do besilato de anlodipino (AML) em associação com outras classes de anti-hipertensivos em medicamentos disponíveis comercialmente. No desenvolvimento das metodologias, inicialmente foram estudados o tipo de pré-tratamento do EDDB, o pH e o eletrólito suporte. Na sequência, a influência da velocidade de varredura no processo de oxidação dos anti-hipertensivos também foram estudados, os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades indicaram que as reações para os anti-hipertensivos, na superfície do EDDB são irreversíveis e controladas por difusão. Após o estudo dos parâmetros instrumentais das técnicas, os melhores valores obtidos para as técnicas de voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD), foram empregados na construção das curvas analíticas para cada um dos três trabalhos, obtendo um intervalo linear de concentração de 2,9 – 33 e 9,8 – 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AML e atenolol (ATN), respectivamente e 0,9 – 14 e 0,2 – 1,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AML e ramipril (RMP), respectivamente, e para a mistura quaternária, as curvas analíticas construídas apresentaram um intervalo linear de concentração de 0,9 – 31, 8,7 – 125, 29 – 260 e 11 – 91  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AML, cloridrato de amilorida (AMI), hidroclorotiazida (HCTZ) e ATN, respectivamente. Os métodos propostos, foram aplicados na determinação simultânea de AML e ATN, AML e RMP e, por fim, na determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN em amostras farmacêuticas comercialmente disponíveis. Os resultados obtidos nos novos procedimentos foram comparados estatisticamente com métodos de cromatografia líquida de alta eficiência, provando suas semelhanças a um nível de confiança de 95%.

**Palavras-chave:** Voltametria. Eletrodo de diamante dopado com boro. Controle de qualidade. Anti-hipertensivos. Drogas comerciais.

MORAES, Jaqueline Tobias. **Development and Validation of Voltammetric Methods for the Determination of Antihypertensives Employing the Boron-doped Diamond Electrode**. 2019. 117 p. Thesis (Doctorate degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Hypertensive patients daily use of antihypertensive drugs for controlling blood pressure. Many of these antihypertensives when given at above or below recommended dosages for treatment may cause moderate to severe undesirable effects or cause ineffectiveness. Therefore, it is needed for the quantities labeled to be presented in the tablets in accordance with the dosage indicated for each active ingredient. Thus, in this work three voltammetric procedures using a boron-doped diamond electrode (BDDE) were developed for the simultaneous determination of amlodipine besylate (AML) in association with other classes of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations commercially available. In the development of these methods, the type of pre-treatment of BDDE, the pH and the supporting electrolyte were initially studied. In sequence the influence of the scan rate on the antihypertensives oxidation process was also studied, the cyclic voltammograms obtained at different scan rates indicate that the reaction for each antihypertensive drug on the BDDE surface are irreversible and diffusion-controlled. After, in the study of the instrumental parameters of the techniques, the best values obtained for the techniques of square-wave voltammetry (SWV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used to the construction of analytical curves for each one of the three methods, obtaining a linear range of concentration of 2.9 - 33 and 9.8 - 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for AML and atenolol (ATN), respectively and 0.9 - 14 and 0.2 - 1.9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for AML and ramipril (RMP), respectively, and, for the quaternary mixture, analytical curves constructed showed a linear range of concentration of 0.9 - 31, 8.7 - 125, 29 - 260 and 11 - 91  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for AML, amiloride hydrochloride (AMI), hydrochlorothiazide (HCTZ) and ATN, respectively. The proposed methods were applied to the simultaneous determination of AML and ATN, AML and RMP and, finally, in the simultaneous determination of AML, AMI, HCTZ and ATN in commercially available pharmaceutical samples. The obtained results in the new procedures were statistically compared with high performance liquid chromatography method, proving their similarities at 95% confidence level.

**Keywords:** Voltammetry. Boron doped diamond electrode. Quality control. Antihypertensive. Commercial drugs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Estruturas químicas dos anti-hipertensivos (A) Besilato de anlodipino (AML), (B) Cloridrato de amilorida (AMI), (C) Hidroclorotiazida (HCTZ), (D) Atenolol (ATN) e (E) Ramipril (RMP).....	19
<b>Figura 2 -</b>	Sinal de excitação em voltametria cíclica.....	25
<b>Figura 3 -</b>	Sinais de excitação para a voltametria de pulso diferencial.....	26
<b>Figura 4 -</b>	Geração de um sinal de excitação em voltametria de onda quadrada.....	27
<b>Figura 5 -</b>	Diferenças do “GAP” de energia entre um material isolante e um material semi-condutor.....	31
<b>Figura 6 -</b>	Eletrodo de diamante dopado com boro .....	33
<b>Figura 7 -</b>	Terminações superficiais dos filmes de diamantes dopados com boro. Em vermelho eletrodo de diamante dopado com boro com pré tratamento anódico (EDDB – PA), em azul eletrodo de diamante dopado com boro com pré-tratamento catodico (EDDB – PC).....	35
<b>Figura 8 -</b>	Esquema da célula eletroquímica com indicação dos os eletrodos de trabalho (filme de DDB), auxiliar (placa de Pt) e de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L <sup>-1</sup> )).....	41
<b>Figura 9 -</b>	Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB com diferentes pré-tratamentos usando AML 48 µmol L <sup>-1</sup> e ATN 190 µmol L <sup>-1</sup> em solução tampão fosfato (pH 7,0): (—) pré-tratamento catódico, (—) pré-tratamento anódico. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	47
<b>Figura 10 -</b>	Voltamogramas cíclicos individuais dos analitos obtidos empregando EDDB-PC utilizando: (—) solução tampão fosfato (pH 7,0), (—) AML 49,0 µmol L <sup>-1</sup> e (—) ATN 49,0 µmol L <sup>-1</sup> ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	48
<b>Figura 11 -</b>	Reação de oxidação do besilato de anlodipino (AML). .....	50
<b>Figura 12 -</b>	Reação de oxidação do atenolol (ATN).....	50

<b>Figura 13</b> - Influência da concentração hidrogeniônica do meio na separação do potencial dos picos anódicos (A) e nas correntes dos picos (B) de AML 46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATN 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$ usando soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 - 11,0) e a VOQ. Condições da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .....	51
<b>Figura 14</b> - Voltamogramas de onda quadrada de AML 46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATN 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$ usando um EDDB-PC em soluções tampão BR (—) e fosfato (—), ambos em pH 7,0. Condições da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .....	52
<b>Figura 15</b> - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para AML 49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATN 97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,0) usando EPC (—), EPNTC (—), ECV (—) e EDDB-PC (—). Condições da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$ , $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .....	53
<b>Figura 16</b> - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) para (A) AML 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) ATN 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura, de 5 - 200 $\text{mV s}^{-1}$ . Inserido: dependência linear de $\log I_{pa}$ com $\log v$ . ....	54
<b>Figura 17</b> - Influência da variação dos parâmetros da técnica de VOQ no aspecto geral dos voltamogramas do AML 47 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ATN 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ empregando o EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0). (A) Variação da frequência da onda quadrada ( $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (B) Variação da amplitude de onda quadrada ( $f = 20 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (C) Variação do incremento de varredura ( $a = 70 \text{ mV}$ , $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ). ....	56
<b>Figura 18</b> - Voltamogramas de (A) pulso diferencial e de (B) onda quadrada em EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) na faixa de concentração para AML 2,9-33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para ATN 9,8-190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . <i>Inserido</i> : curvas analíticas de AML e ATN para o processo de oxidação. Parâmetros da VPD: $a = 75 \text{ mV}$ , $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ , $t = 3 \text{ ms}$ , e da VOQ: $f = 20 \text{ Hz}$ , $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_S = 3 \text{ mV}$ .....	60

- Figura 19** - Voltamogramas de onda quadrada com EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) para (A) AML 2,9 - 34  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para concentração fixa de ATN 71  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) concentração fixa para AML 24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para ATN 9,6 - 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . .....61
- Figura 20** - Voltamograma cíclico correspondente ao EDDB-PA na solução tampão amônio (pH 9,0), a 50  $\text{mV s}^{-1}$ . Solução branco (—) e mistura de AML 24,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 136  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 272  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 90,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (—). *Inserido*: Voltamogramas cíclicos correspondentes obtidos empregando o EDDB-PC. ....68
- Figura 21** - Voltamogramas cíclicos obtidos para AML 24,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 136  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 272  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 90,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) empregando (A) EDDB-PA e (B) ECV;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....69
- Figura 22** - Voltamogramas de onda quadrada de AML 24,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 137  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 182  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 91,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  usando um EDDB-PA empregando como eletrólito suporte a pH 9,0 as soluções tampão amônio (—), BR (—), carbonato (—) e TRIS (—). Condições da VOQ:  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . .....70
- Figura 23** - Voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura (5 - 175  $\text{mV s}^{-1}$ ) obtidos para (A) AML 98,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) AMI 294  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (C) HCTZ 392  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (D) ATN 196  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) usando um EDDB-PA. *Inserido*: dependência linear da  $I_{pa}$  e raiz quadrada da velocidade de varredura. ....72
- Figura 24** - Reação de oxidação da amilorida (AMI). .....73
- Figura 25** - Reação de oxidação da hidroclorotiazida (HCTZ). .....73

- Figura 26** - Influência da variação dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas do AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) empregando EDDB-PA. (A) Variação da frequência da onda quadrada ( $a = 70 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (B) Variação da amplitude de onda quadrada ( $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (C) Variação do incremento de varredura ( $a = 40 \text{ mV}$ ,  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ).....75
- Figura 27** - Voltamogramas de onda quadrada empregando um EDDB-PA de (a) solução tampão amônio (pH 9,0) e (b - h) AML  $0,9 - 31 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $8,7 - 125 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $29 - 260 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $11 - 91 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 10 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ . .....77
- Figura 28** - Voltamogramas cíclicos em velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  obtidos em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 10,0) contendo  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  de RMP, para as duas superfícies do filme de DDB realizadas neste estudo (anódica (A-B) e catódica (C-D)).....86
- Figura 29** - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB-PC em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 10,0) contendo  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  de RMP.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....87
- Figura 30** - Voltamogramas de onda quadrada de AML  $49,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando um EDDB-PC em soluções tampão BR (—) e fosfato (—), ambos em pH 6,0. Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ . .....89
- Figura 31** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para AML  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH 6,0) usando ECV (—) e EDDB-PC (—). Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ . .....90

<b>Figura 32</b> - Voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura (5 - 250 $\text{mV s}^{-1}$ ) obtidos para (A) AML 97,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) RMP 194,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 6,0) usando um EDDB-PC. <i>Inserido</i> : dependência linear da $I_{pa}$ e raiz quadrada da velocidade de varredura; dependência linear de $\log I_{pa}$ com $\log v$ . ....	91
<b>Figura 33</b> - Reação de oxidação do Ramipril (RMP). ....	92
<b>Figura 34</b> - Influência da variação dos parâmetros da técnica de VPD na resposta do AML 97,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e RMP 194 $\mu\text{mol L}^{-1}$ empregando EDDB-PC em solução tampão BR (pH 6,0). (A) Variação da amplitude do pulso (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 e 125 mV) ( $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , $t = 5 \text{ mV}$ ). (B) variação da velocidade de varredura (3; 5; 7,5; 10; 12,5 $\text{mV s}^{-1}$ ) ( $a = 100 \text{ mV}$ , $t = 5 \text{ mV}$ ). (C) variação do tempo de modulação (3; 5 e 7,5 $\text{ms}^{-1}$ ) ( $a = 100 \text{ mV}$ , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ). ....	94
<b>Figura 35</b> - Voltamogramas de pulso diferencial empregando um EDDB-PC de (a) solução tampão BR (pH 6,0) e (b - h) AML 0,99 – 14,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , RMP 0,29 – 1,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD: $a = 100 \text{ mV}$ , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 3 \text{ ms}$ . ....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais para a determinação simultânea de AML e ATN no EDDB-PC empregando-se VPD e VOQ.....	58
<b>Tabela 2 -</b>	Parâmetros analíticos obtidos na determinação voltamétrica de AML e ATN por VPD e VOQ em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando um EDDB-PC.....	59
<b>Tabela 3 -</b>	Comparação dos parâmetros analíticos obtidos deste trabalho com diferentes técnicas analíticas para a determinação de AML e ATN.....	63
<b>Tabela 4 -</b>	Resultados obtidos na determinação simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas combinadas por VOQ empregando o EDDB-PC e pelo método comparativo (CLAE). ....	66
<b>Tabela 5 -</b>	Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais da técnica de VOQ para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN no EDDB-PA.....	76
<b>Tabela 6 -</b>	Parâmetros analíticos obtidos na determinação voltamétrica simultânea da mistura de AML, AMI, HCTZ e ATN em solução tampão amônio (pH 9,0) por VOQ empregando um EDDB-PA.....	78
<b>Tabela 7 -</b>	Avaliação da interferência entre os picos de oxidação dos anti-hipertensivos na determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. Uma série de medidas na VOQ foram registradas mantendo a concentração de três componentes constantes e variando a concentração de um deles.....	80
<b>Tabela 8 -</b>	Comparação das faixas de concentração linear para a determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN usando diferentes métodos analíticos com este trabalho. ....	82
<b>Tabela 9 -</b>	Resultados obtidos na determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN em formulações farmacêuticas comerciais utilizando o método proposto comparado com CLAE.....	84

<b>Tabela 10</b> - Influência do pH na separação e nas correntes dos picos de AML e RMP usando soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 - 11,0) e a VOQ. Condições da VOQ: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_S = 2$ mV. ....	88
<b>Tabela 11</b> - Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais para a determinação simultânea de AML e RMP no EDDB-PC usando tampão BR (pH 6,0) e 97,1 e 194,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e RMP, respectivamente. ....	95
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica de AML e RMP por VPD e VOQ em solução tampão BR (pH 6,0) utilizando um EDDB-PC. ....	96
<b>Tabela 13</b> - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos deste trabalho com diferentes técnicas analíticas descritas na literatura para a determinação de AML e RMP. ....	99
<b>Tabela 14</b> - Resultados obtidos na determinação simultânea de AML e RMP em formulações farmacêuticas combinadas por VPD empregando o EDDB-PC e pelo método comparativo (CLAE). ....	102

## LISTA DE SIGLAS

$D_0$	Coeficiente de difusão
$E_p$	Potencial de pico
$E_{p/2}$	Potencial de meio pico
$\Delta E_s$	Incremento de potencial
AMI	Cloridrato de amilorida
AML	Besilato de anlodipino
ATN	Atenolol
BR	Britton-Robinson
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
DVQ	Deposição de vapor químico
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
ECV-NTC-Nafion	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e nafion
ECV-NTC-NPsAu	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro
ECV-NTC-NPsAu-poli-metionina	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
EDDB-PA	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente
EDDB-PC	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EPNTC	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono
HCTZ	Hidroclorotiazida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de detecção
LOS	Losartana
LQ	Limite de quantificação

MTP	Metoprolol
$n$	Número de elétrons
N	Número de replicatas.
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Photodiode array detector
RMP	Ramipril
UV	Ultravioleta
VAL	Valsartana
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
$a$	Amplitude
$f$	Frequência de onda quadrada
$t$	Tempo de modulação
$v$	Velocidade de varredura
$\alpha$	Coeficiente de transferência eletrônica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.2	ANTI-HIPERTENSIVOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	17
1.3	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	21
1.4	DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL E SIMULTÂNEA DE AML, AMI, HCTZ, ATN E RMP.....	23
1.5	TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS .....	24
1.6	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E DIFERENTES ELETRODOS DE TRABALHO EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE AML, AMI, HCTZ, ATN E RMP.....	28
1.7	ELETRODO DE TRABALHO - ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	39
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	39
3.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	40
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS DETERMINAÇÕES VOLTAMÉTRICAS .....	42
3.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS: MÉTODOS COMPARATIVOS.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
4.1	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML E ATN .....	47
4.1.1	Estudo Eletroquímico do AML e ATN sobre o EDDB .....	47
4.1.2	Efeito da Concentração Hidrogeniônica do Meio e Eletrólito Suporte .....	50
4.1.3	Influência da Velocidade de Varredura no Processo de Oxidação do AML e ATN .....	53
4.1.4	Escolha da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea de AML e ATN.....	54
4.1.5	Comparação com Métodos Analíticos Descritos na Literatura .....	62

4.1.6	Aplicação do Método Voltamétrico Desenvolvido na Determinação Simultânea de AML e ATN em Formulações Farmacêuticas Combinadas .....	65
4.2	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML, AMI, HCTZ E ATN .....	67
4.2.1	Estudo do Comportamento Eletroquímico do AML, AMI, HCTZ e ATN sobre o EDDB.....	67
4.2.2	Efeito do pH e Eletrólito Suporte .....	69
4.2.3	Influência da Velocidade de Varredura no Processo Oxidação do AML, AMI, HCTZ e ATN .....	70
4.2.4	Seleção da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea da Mistura Quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN no EDDB-PA .....	73
4.2.5	Comparação com outros Métodos Analíticos Descritos na Literatura .....	81
4.2.6	Aplicação do Método Voltamétrico em Formulações Farmacêuticas Combinadas .....	83
4.3	DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML E RMP .....	85
4.3.1	Estudo Eletroquímico do AML e RMP sobre o EDDB.....	85
4.3.2	Efeito do pH e Eletrólito Suporte .....	87
4.3.3	Influência da Velocidade de Varredura no Processo de Oxidação do AML e RMP .....	90
4.3.4	Escolha da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea da Mistura Binária de AML E RMP no EDDB-PC .....	92
4.3.5	Comparação com Outros Métodos Analíticos Descritos na Literatura.....	98
4.3.6	Aplicação do Método Voltamétrico em Formulações Farmacêuticas Combinadas .....	101
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	103
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	105

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hipertensão arterial no Brasil atinge aproximadamente 25% dos indivíduos adultos, e estima-se que em 2025 este número atingirá cerca de 40%, contribuindo direta ou indiretamente para as mortes causadas por doença cardiovascular (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2016). Quando o indivíduo é diagnosticado com a pressão arterial igual ou maior que 140/90 mmHg, o tratamento é indicado, e tem como principal objetivo, a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares. Esta doença pode apresentar estágios diferentes entre os pacientes, pois, deve-se considerar a condição do mesmo, e os fatores de risco como a idade, gênero e etnia, excesso de peso, ingestão de sal e álcool, e sedentarismo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2016). A hipertensão arterial é uma doença crônica multifatorial, que, quando não controlada, está relacionada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais, podendo citar doenças cerebrovascular e arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular (JEFFERS e colab., 2015; ROCHA e ZIEMEL, 2015; SILVA e RAMOS, 2016). O tratamento inicia-se com mudanças de hábitos alimentares e introdução das práticas de atividades físicas, porém, pelo fato de as mudanças dos hábitos de toda a vida do paciente não ser uma tarefa fácil, geralmente se faz necessário o emprego de medicamentos anti-hipertensivos que são fármacos usados pelos pacientes hipertensos para redução e/ou controle da pressão arterial (CARVALHO e colab., 2017; SILVA e RAMOS, 2016).

Quando o tratamento medicamentoso é indicado, pode-se empregar diferentes classes de anti-hipertensivos, dentre os quais, os diuréticos, inibidores adrenérgicos (ação central, betabloqueadores e alfabloqueadores), vasodilatadores diretos, antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da

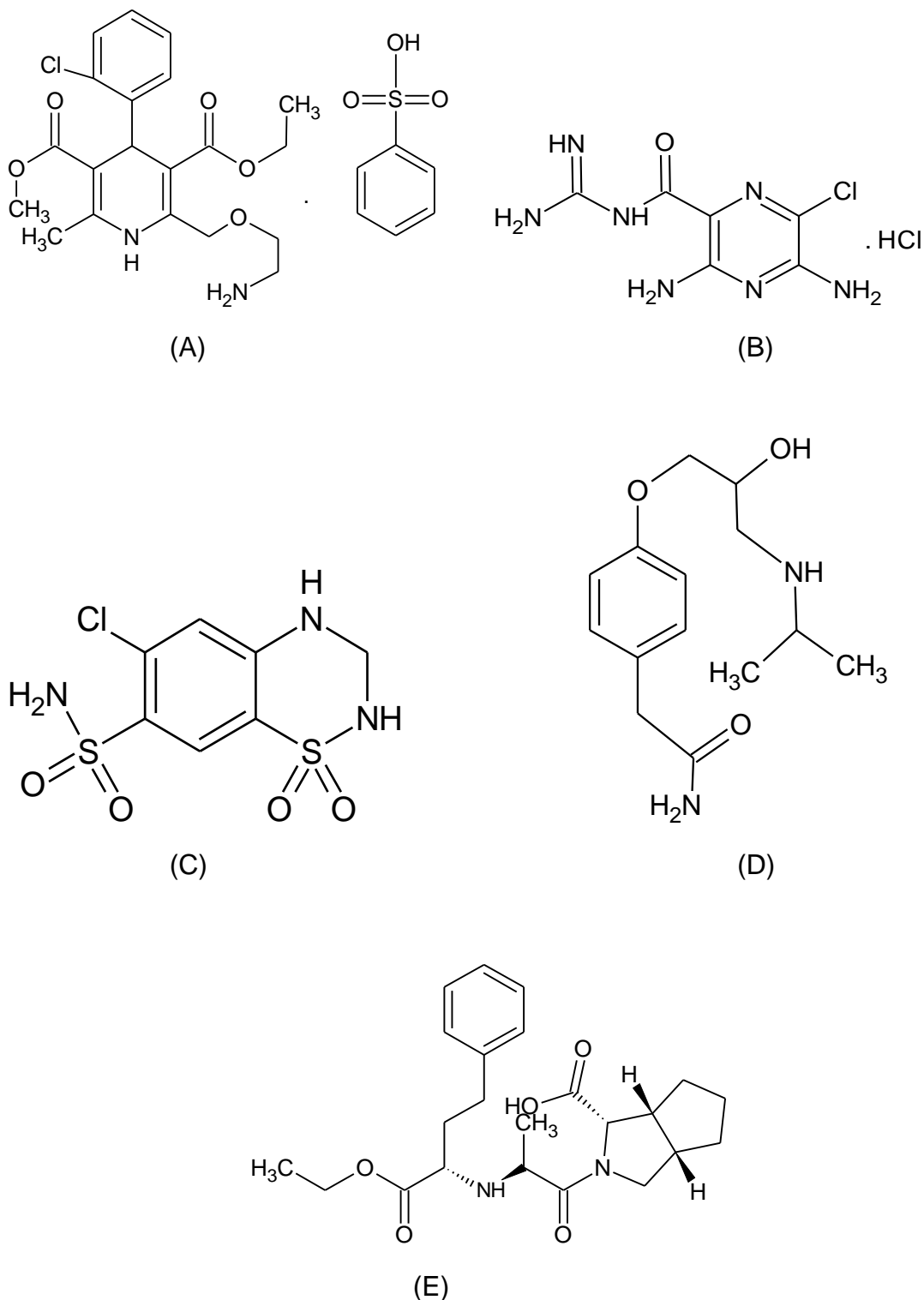
enzima conversora da angiotensina e antagonista do receptor da angiotensina II (CARVALHO; ALVES; MARTINS, 2017; NOVELLO et al., 2017). Apesar da grande diversidade de classes de anti-hipertensivos, e as diferentes ações no organismo para cada uma das mesmas, de um modo geral, esses fármacos irão atuar no sentido de reduzir ou controlar a pressão arterial do paciente (MASSA et al., 2016; SOLIMAN; PRINEAS, 2017). Para o tratamento da hipertensão arterial, o emprego de qualquer medicamento das classes dos anti-hipertensivos comercialmente disponíveis, sob a condição de preservar as indicações e contraindicações específicas de cada paciente, podem ser utilizados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

## 1.2 ANTI-HIPERTENSIVOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL

Alguns anti-hipertensivos, como besilato de anlodipino (AML) (3-etil 5-metil 2-(2-aminoetoxi)metil-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-diidropiridina-3,5-dicarboxilato), de fórmula molecular  $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$  e peso molecular  $408,9 \text{ g mol}^{-1}$ ), cloridrato de amilorida (AMI) (3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilidene)pirazina-2-carboxamida, de fórmula molecular  $C_6H_8ClN_7O$  e peso molecular  $229,6 \text{ g mol}^{-1}$ ), hidroclorotiazida (HCTZ) (6-cloro-1,1-dioxo-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida de fórmula molecular  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$  e peso molecular  $297,6 \text{ g mol}^{-1}$ ), atenolol (ATN) (2- [4- [2-hidroxi-3- (propan-2-ilamino)propoxi]fenil]acetamida, de fórmula molecular  $C_{14}H_{22}N_2O_3$  e peso molecular  $266,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) e ramipril (RMP) ((2S, 3aS, 6aS) -1 - [(2S) -2 - [[(2S) -1-etoxi-1-oxo-4-fenilbutan-2- il] amino] propanoil] -3,3a, 4, Ido 5,6,6a-hexa-hidro-2H-ciclopenta [b] pirrole-2-ácido carboxílico, de fórmula molecular  $C_{23}H_{32}N_2O_5$  e peso molecular  $416,5 \text{ g mol}^{-1}$ ) (Figura 1) são prescritos para pacientes hipertensos em estágios iniciais da doença e ainda para os casos considerados moderados ou graves (KOHLMANN-JR et al., 1999). É descrito na literatura, que dependendo da gravidade da doença, a administração de apenas um anti-hipertensivo (monoterapia) não é suficiente. Sendo assim, o tratamento combinado de anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de

ação, quando administrados por via oral, aumenta a probabilidade de ocorrer uma interação entre os fármacos, melhorando a eficácia do tratamento (CHRYSANT et al., 2008; ROCHA; ZIEMEL, 2015), diminuindo possíveis danos que podem ser causados em alguns órgãos, como, coração, cérebro e rins, além das vantagens como menor custo do medicamento, simplicidade do tratamento, e a conveniência do paciente passar a ingerir menos comprimidos durante o tratamento (DAI et al., 2013). Este conjunto possibilita melhor adesão do paciente ao tratamento pelo fato de ocorrer poucos atrasos na ingestão dos comprimidos, menos doses perdidas e a dosagem correta na administração medicamentosa (NOBRE et al., 2003).

**Figura 1** - Estruturas químicas dos anti-hipertensivos (A) Besilato de anlodipino (AML), (B) Cloridrato de amilorida (AMI), (C) Hidroclorotiazida (HCTZ), (D) Atenolol (ATN) e (E) Ramipril (RMP).



O AML é um fármaco da classe das dihidropiridinas e é um bloqueador do canal de cálcio (GAZY, 2004) e o ATN é um agente beta-bloqueador. Ambos medicamentos são disponibilizados na forma de dosagens individuais

ou combinados em formulações farmacêuticas. Porém, a combinação é preferida para o tratamento de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares em pacientes hipertensos (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

O AMI é um diurético poupador de potássio (MORALES-OLIVAS, 2008) que atua nos túbulos distais aumentando a excreção de sódio (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996), enquanto que a HCTZ pertence à classe dos diuréticos tiazídicos (MORALES-OLIVAS, 2008) e atua sobre o mecanismo tubular renal de absorção de eletrólitos, aumentando o volume de urina e reduzindo o volume de sangue e seu retorno para o coração (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Esses dois diuréticos conferem reduções significativas no acidente vascular cerebral e eventos cardiovasculares. Na maioria dos casos, os diuréticos são recomendados como terapia inicial para pacientes hipertensos e são a base para múltiplas drogas anti-hipertensivas (ERNST et al., 2006). Esses dois fármacos podem ser encontrados em formulações combinadas, onde estudos clínicos demonstraram que a utilização combinada de AMI e HCTZ promove uma diminuição na insuficiência e na mortalidade cardiovascular (MAGUREGUI; JIMENEZ; ALONSO, 1998).

O RMP é um inibidor da enzima conversora da angiotensina, causando efeito farmacológico vasodilatador e reduzindo a pressão arterial (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Por isso, o RMP é empregado no tratamento de quadros de hipertensão em forma de monoterapia, ou em associações com outras classes de anti-hipertensivos, como ramipril com hidroclorotiazida, ou ramipril com besilado de anlodipino (BRASIL, 2018).

O uso de AML e ATN com dosagens acima do recomendado pode causar fadiga, depressão, confusão mental, alucinações e, às vezes, levar à morte (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). O AMI apresenta como efeito colateral a disfunção sexual masculina, enquanto que o HCTZ quando utilizado inadequadamente pode causar várias alterações metabólicas no organismo, como aumento do colesterol e dos triglicerídeos, oferecendo riscos cardiovasculares a longo prazo (MORALES-OLIVAS, 2008). Por fim, o uso de dosagens acima do recomendado de RMP, por ser um vasodilatador, pode causar a dilatação excessiva dos vasos sanguíneos abaixo da cabeça e, como consequência, causar a queda brusca da pressão arterial e diminuição da

frequência cardíaca, além de alterações eletrolíticas e insuficiência dos rins (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Neste contexto, há uma grande preocupação sobre a segurança dos medicamentos, devido à necessidade que muitos pacientes apresentam, em manter o controle da pressão arterial com a utilização de anti-hipertensivos. Portanto, as quantidades apresentadas nos rótulos dos medicamentos devem estar de acordo com a dosagem indicada para cada princípio ativo, pois, o uso inadequado desses medicamentos, com dosagens acima do recomendado, podem causar efeitos indesejáveis, de moderados a graves. Além disso, o uso desses medicamentos com dosagens abaixo do recomendado, pode prejudicar a eficiência do tratamento. Assim, neste trabalho a determinação simultânea dos anti-hipertensivos foi investigada, a fim de desenvolver uma metodologia que seja capaz de quantificá-los simultaneamente com mínima utilização de solventes orgânicos, agilidade e baixo custo. Ainda, estas metodologias poderão ser aplicadas em controle de qualidade dos medicamentos anti-hipertensivos a fim de garantir sua qualidade, assegurando o uso dos mesmos pela sociedade.

### 1.3 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A certificação de uma metodologia é o processo por meio do qual uma entidade certificadora concede o certificado de que um produto, processo ou serviço está conforme com as respectivas exigências específicas. Estas precisam ser renovadas periodicamente, ou serão válidas por um período específico de tempo. A certificação de uma metodologia é obtida a partir de uma avaliação denominada validação (PEREZ, 2010).

A validação de um método analítico tem por objetivo, a partir de um conjunto de estudos laboratoriais, demonstrar que o método analítico desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, para a determinação e quantificação de um analito em uma matriz, assegurando a confiabilidade dos resultados (DE LA ROCA et al., 2007). Para tanto, na avaliação de métodos de ensaio, os parâmetros analíticos que devem ser explorados podem variar significativamente, dependendo do tipo de método

empregado. Geralmente, as avaliações e apresentações das figuras de méritos como:

- ✓ Seletividade: é a capacidade de método em identificar ou quantificar o analito de interesse em uma matriz contendo outros componentes;
- ✓ Linearidade: é a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito;
- ✓ Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho: são os intervalos de concentrações estudados que apresentam uma relação linear entre a concentração do analito e o sinal analítico de resposta;
- ✓ Limite de detecção (LD): investiga a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas;
- ✓ Limite de quantificação (LQ): é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas;
- ✓ Exatidão: é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, para o estudo da exatidão diferentes métodos podem ser adotados, como, o uso de material de referência certificado, comparação do método proposto com um método referência e ensaios de recuperação na matriz;
- ✓ Precisão: avalia a proximidade de várias medidas de uma mesma amostra e usualmente pode ser demonstrada em termos de desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação;
- ✓ Robustez: mede a capacidade que o método apresenta em resistir a pequenas variações das condições analíticas, geralmente este parâmetro é testado durante o desenvolvimento do método analítico.

As figuras de méritos citadas acima segundo a “Resolução - RE N° 899”, 2003; INMETRO: DOQ-CGCRE-008 (2016), são necessárias, pois a partir desses parâmetros analíticos é possível confirmar a validação do método proposto, e com isso, garantir a qualidade operacional e de desempenho analítico do método, garantindo a qualidade assegurada ao produto final.

#### 1.4 DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL E SIMULTÂNEA DE AML, AMI, HCTZ, ATN E RMP

Alguns métodos, certificados ou não, para a determinação individual de AML, AMI, HCTZ, ATN e RMP envolvem o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores UV e MS/MS (ALAAMA e colab., 2015; BI e colab., 1992; BRASIL, 2010; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013; DONIA e colab., 2018; LIU e colab., 2007; RAJORIYA e colab., 2016; ZARGHI e colab., 2005; ZEEB; FARAHANI; PAPAN, 2016). Outras técnicas analíticas também empregadas para a determinação individual desses anti-hipertensivos em amostras farmacêuticas e biológicas são a coulometria (KALYANARAMU; RAGHUBABU; VAMSIKUMAR, 2011), espectrofotometria UV-VIS (LAPA; LIMA; SANTOS, 2000; ABDELLATEF, 2007; AFIEROHO; OKORIE; OKONKWO, 2012), infravermelho próximo (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013) e eletroforese capilar (ARIAS e colab., 2001; MAGUREGUI; JIMENEZ; ALONSO, 1998).

Para a determinação simultânea de misturas binárias de AML e ATN e de AML e RMP, ou de uma mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN, ainda não existe um método oficial descrito em qualquer farmacopeia, pois, além do processo de validação, é preciso a certificação do método. Apesar disso, para a determinação desses anti-hipertensivos, há na literatura muitas técnicas com os mais diferentes métodos, os quais, são em grande maioria, métodos validados, porém não certificados. Algumas técnicas analíticas que são empregadas para a determinação simultânea das misturas binárias, tanto para a mistura de AML e ATN como para a mistura do AML e RMP, podem ser citadas, como, as técnicas espectrofotométricas (GARG; SARAF; SARAF, 2008; PATIL et al., 2009; PAWAR et al., 2013) e CLAE (ARGEKAR; POWAR, 2000; BARMAN et al., 2007; DAI et al., 2013; VENKATESH et al., 2013; KANNAPPAN; MANNEMALA, 2016; KORALLA et al., 2016). Já para a determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN, até o momento da finalização deste trabalho, nenhum método validado foi encontrado na literatura.

Para a determinação de analitos de interesse em amostras, geralmente, o uso da cromatografia é preferido em relação a outras técnicas, devido à

possibilidade de determinação simultânea de anti-hipertensivos, sem interferências (VISHNUVARDHAN et al., 2014; ALBISHRI; ABD EL-HADY; TAYEB, 2015). No entanto, esta técnica pode apresentar algumas desvantagens, como alto custo de aquisição e manutenção dos equipamentos, utilização de solventes orgânicos de grau espectroscópico de elevado custo e de considerável toxicidade ao analista e ao meio ambiente, e ainda um tratamento mais demorado das amostras (ALBISHRI; ABD EL-HADY; TAYEB, 2015). Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos que sejam alternativos aos métodos atuais, apresentando maior simplicidade e menor custo, visando a determinação de anti-hipertensivos em associações. Com isso, o desenvolvimento destes novos procedimentos voltamétricos referem-se aos processos de validação para a determinação de duas misturas binárias, das quais, AML e ATN, AML e RMP e ainda, uma mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN com aplicação em amostras farmacêuticas comerciais.

## 1.5 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

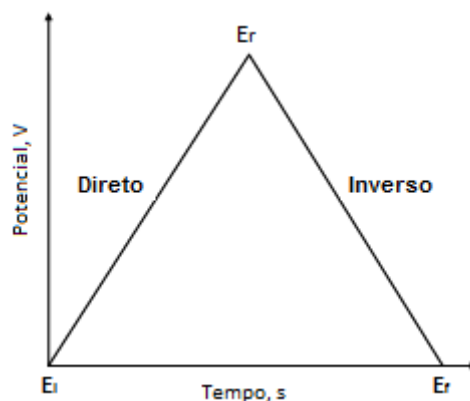
Nos últimos anos as técnicas eletroanalíticas vem se destacando frente a outras técnicas, tais como as cromatográficas e espectroscópicas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003a), uma vez que apresentam relativo baixo custo de aquisição do equipamento, utilizam mínima quantidade de reagentes tóxicos, geram menor quantidade de resíduos, atendendo, portanto, aos princípios de química verde (PAIOLA et al., 2017). Além disso, apresentam boa sensibilidade analítica e possibilidade de análise de amostras coloridas e com suspensão de sólidos, para a determinação de analitos de interesse diretamente em solução (DE SOUZA et al., 2011). Deste modo, as técnicas eletroanalíticas vêm em crescente expansão, como uma das principais áreas da química analítica no desenvolvimento de metodologias quantitativas, sendo impulsionadas principalmente por dois fatores: o desenvolvimento tecnológico e o crescente apelo ambiental nas últimas décadas.

As técnicas voltamétricas relacionam diretamente medidas de propriedades elétricas, como corrente, potencial e carga com a concentração da espécie de interesse. Ademais, fornecem limites de detecção relativamente

baixos, quando empregado as técnicas de pulso, e outras informações, como potenciais de oxidação e redução de determinados compostos químicos (BRETT e BRETT, 1993; WANG, 2006).

Dentre as técnicas voltamétricas, a voltametria cíclica (VC), apesar de não ser utilizada com frequência em determinações quantitativas, é muito empregada para aquisição de informações sobre a termodinâmica dos processos redox (GOSSER, 1993a), quantidade de elétrons envolvidos nas reações (GOSSER, 1993a; ARISTOV; HABEKOST, 2015). e a determinação dos potenciais redox das espécies eletroativas (GOSSER, 1993a; ARISTOV; HABEKOST, 2015). Por isso, a VC muitas vezes, é o primeiro experimento realizado em um estudo eletroanalítico. Nela, o potencial elétrico aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente na forma de uma onda triangular (Figura 2), produzindo a varredura de potencial no sentido direto e depois no sentido inverso. Enquanto a corrente é medida, este processo corresponde a um ciclo de varredura, possibilitando a observação da oxidação e ou redução da espécie de interesse quando esta é irreversível (SKOOG e colab., 2007; WANG, 2000).

**Figura 2** - Sinal de excitação em voltametria cíclica.

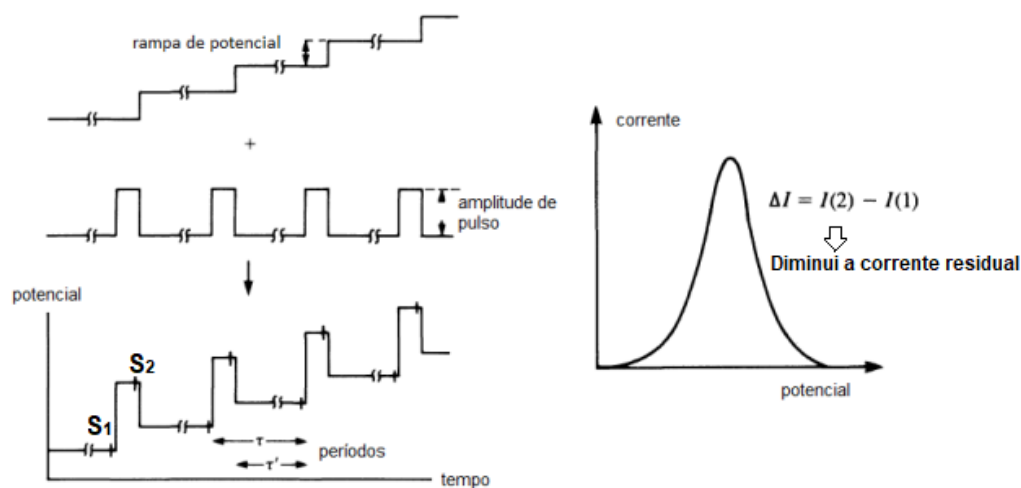


**Fonte:** Adaptado de Skoog *colab.*(2013)

Na técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial em intervalos de tempo e velocidade constantes. A corrente é medida antes ( $S_1$ ) e próximo ao final do tempo de aplicação do pulso ( $S_2$ ), e então, essas correntes são subtraídas ( $\Delta_i$ ), como mostrado na Figura 3. O resultado é uma melhora na

sensibilidade da técnica voltamétrica, bem como dos valores de limite de detecção (LD) das medidas. Dessa forma, é plotado a diferença entre essas correntes medidas versus o potencial aplicado, gerando um voltamograma de pulso diferencial, corrente vs, potencial, como a forma de uma curva gaussiana (SKOOG e colab., 2007; WANG, 2000). O sinal pode apresentar relação linear com a concentração da espécie de interesse e, assim, possibilitar a quantificação de analitos de interesse. Abbar e Nandibewoor (2013) descreveram o uso da VPD, utilizando o eletrodo de pasta de carbono (EPC), para a determinação de atorvastatina, fármaco este prescrito para diminuir os níveis de colesterol no sangue. Empregando esta técnica, obteve-se picos de oxidação mais definidos e com menor corrente de fundo, o que possibilitou a quantificação de menores concentrações de atorvastatina (LD de  $0,00408 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Para a determinação de HCTZ e MTP em amostras individuais e combinadas, essa técnica também possibilitou a obtenção de valores menores de LD, de  $0,376$  e  $0,077 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (SALAMANCA-NETO et al., 2016).

**Figura 3** - Sinais de excitação para a voltametria de pulso diferencial.

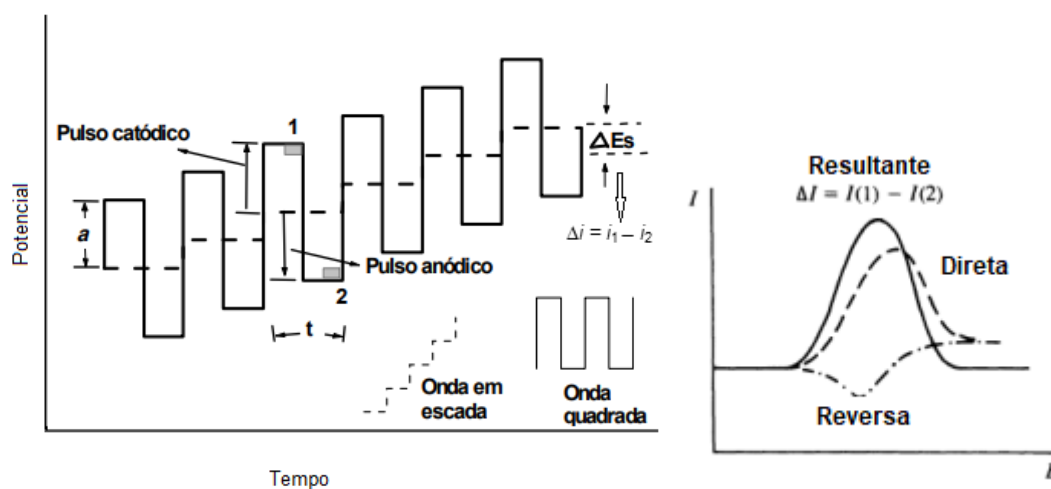


**Fonte:** Adaptado de Pacheco e colab. (2013).

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas (DE SOUZA e MACHADO e AVACA, 2003a). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos (direto e reverso) (Figura 4), e o sinal é obtido como a intensidade da corrente resultante onde a magnitude da corrente capacitiva já está minimizada. Geralmente, esta

metodologia possibilita uma melhora na sensibilidade da técnica, podendo os valores de LD serem comparáveis aos de outras técnicas tais como, espectroscópicas, cromatográficas (DE SOUZA e MACHADO e AVACA, 2003b; SKOOG e colab., 2007) e muitas vezes, pode ocorrer a comparação entre as técnicas de pulso diferencial e varredura linear. Por exemplo, alguns autores como. Chomisteková e colab. (2016), Santos e colab. (2014) e Stanković e colab. (2016) compararam a técnica de VOQ com as técnicas de varredura linear e pulso diferencial no desenvolvimento de procedimentos para a determinação de diferentes fármacos em diferentes tipos de amostras. Os resultados mostraram que a VOQ apresentou maior sensibilidade, menor LD e apresentou rapidez na análise. Com isso, uma das maiores vantagens da VOQ é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados geralmente em alta velocidade de varredura, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica ( DE SOUZA e MACHADO e AVACA, 2003b).

**Figura 4** - Geração de um sinal de excitação em voltametria de onda quadrada.



**Fonte:** Adaptado de DANTAS (2007).

Entre as técnicas de VOQ e VPD são observadas sensibilidade semelhantes (ALEIXO, 2003), sendo a velocidade de varredura a principal diferença entre elas. Na VOQ a velocidade de varredura pode variar de 100 a 1000  $\text{mV s}^{-1}$ , e na VPD esta velocidade pode variar de 1 a 10  $\text{mV s}^{-1}$ , e isso pode aumentar o tempo de análise de alguns poucos segundos para até alguns minutos para a VPD (ALEIXO, 2003; DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003a).

## 1.6 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E DIFERENTES ELETRODOS DE TRABALHO EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE AML, AMI, HCTZ, ATN E RMP

Nos últimos anos, há uma crescente procura por métodos analíticos ambientalmente favoráveis, pois existe à preocupação na redução da poluição ambiental causada por substâncias tóxicas e perigosas empregadas nas análises (ALBISHRI; ABD EL-HADY; TAYEB, 2015). Além disso, acredita-se que o uso de métodos analíticos ambientalmente favoráveis para o controle de qualidade de drogas proporcionará novos desafios e avanços na indústria farmacêutica. Com isso, os métodos eletroquímicos, em particular os voltamétricos, que são considerados simples, rápidos, sensíveis, ambientalmente favoráveis e de custo relativamente baixo, podem ser aplicados na rotina do controle de qualidade desses fármacos.

Vários trabalhos na literatura reportam a utilização de métodos voltamétricos e amperométricos para a determinação individual de AML, AMI, HCTZ, ATN e RMP empregando diferentes eletrodos de trabalho. Dentre eles, podemos citar o EDDB (SANTOS e colab., 2013; SARTORI e colab., 2010), eletrodo de carbono vítreo (ECV) (ALGHAMDI, 2014), EPC (ALGHAMDI, 2014; KAZEMIPOUR e colab., 2009; PATIL e colab., 2009), eletrodo de grafite-poliuretana (CERVINI; RAMOS; CAVALHEIRO, 2007), ECV modificado com nanopartículas de ouro (NPsAu)/nanotubos de carbono (NTC) (SHAMSIPUR; SABER; EMAMI, 2014), eletrodo de ouro (STOILJKOVIĆ et al., 2012), ECV modificado com NPsAu-poli-L-metionina e NTC (EMAMI; SHAMSIPUR; SABER, 2014), ECV modificado Nafion-NTC (DESAI; SRIVASTAVA, 2012), eletrodo de níquel modificado com hidróxido de níquel (MACHINI; DAVID-PARRA; TEIXEIRA, 2015), eletrodo de fio de platina (AL-MAJED et al., 2000), ECV modificado com *carbon black* (SILVA e FATIBELLO-FILHO, 2017) e eletrodo gotejante de mercúrio (PRIETO; JIMÉNEZ; ALONSO, 2003).

Além das determinações individuais dos anti-hipertensivos aqui citados, outros trabalhos da literatura descrevem a determinação simultânea de alguns destes com fármacos de diferentes classes terapêuticas, uma vez que esses fármacos possuem distintos potenciais de oxidação, o que possibilita a aplicação de técnicas voltamétricas ou amperométricas para tal finalidade.

Algumas determinações voltamétricas simultâneas de anti-hipertensivos foram anteriormente realizadas no grupo de pesquisa LAES (Laboratório de Eletroanalítica e Sensores), que é coordenado pela professora Dr<sup>a</sup> Elen R. Sartori Braz. O trabalho de Mansano e Sartori (2015) utilizou o EDDB pré-tratado catodicamente (EDDB-PC) e VOQ em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 5,0) para a determinação simultânea de uma mistura binária de AML e HCTZ em amostra de urina sintética, obtendo-se linearidade no intervalo de concentração de 0,10 – 2,1 e 2,0 – 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com LD de 0,056 e 0,16  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Em outro trabalho, AML e valsartana (VAL) foram determinados simultaneamente em formulações farmacêuticas comerciais e urina sintética empregando o EDDB e tampão BR (pH 5,0) (MANSANO e colab., 2015). Nessas condições, observou-se linearidade para AML e VAL no intervalo de concentração de 0,49 – 28  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 19 – 280  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com valores de LD de 0,076  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Uma mistura ternária contendo os anti-hipertensivos AML, HCTZ e VAL também foi determinada com o EDDB em tampão BR (pH 5,0), obtendo linearidade de 0,49 – 7,2, 2,9 – 45, e 9,7–130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com LD de 0,2, 0,8, e 6,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (MANSANO; EISELE; SARTORI, 2015). Adicionalmente, os autores Salamanca-neto e colab. (2016) descrevem a determinação simultânea de metoprolol (MTP) e HCTZ em formulações farmacêuticas comerciais, utilizando como eletrólito suporte o tampão lactato (pH 4,0) e EDDB-PC, obtendo linearidade de 0,51 – 18 e 1,2 – 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com LD de 0,38 e 0,08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para HCTZ e MTP, respectivamente. E por fim, Mattos e colab. (2017) determinaram simultaneamente RMP e HCTZ em formulações farmacêuticas comerciais empregando o EDDB e tampão BR (pH 2,0). Nessas condições, obteve-se linearidade de 2,5 – 37  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 1,9 – 37  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com valores de LD 18 e 27  $\text{nmol L}^{-1}$  para HCTZ e RMP, respectivamente.

Na literatura, outros trabalhos que mostram o emprego de diferentes eletrodos para a determinação simultânea de diversos anti-hipertensivos e outros compostos de interesse farmacêutico são descritos, podendo-se citar, a determinação simultânea de nifedipino e ATN em formulações farmacêuticas comerciais (KHAIRY et al., 2017), utilizando como eletrólito suporte tampão BR (pH 9,0) e eletrodo impresso modificado com MgO, como eletrodo de trabalho. Os resultados, mostraram uma linearidade de 0,2 – 104  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 6,7 - 909

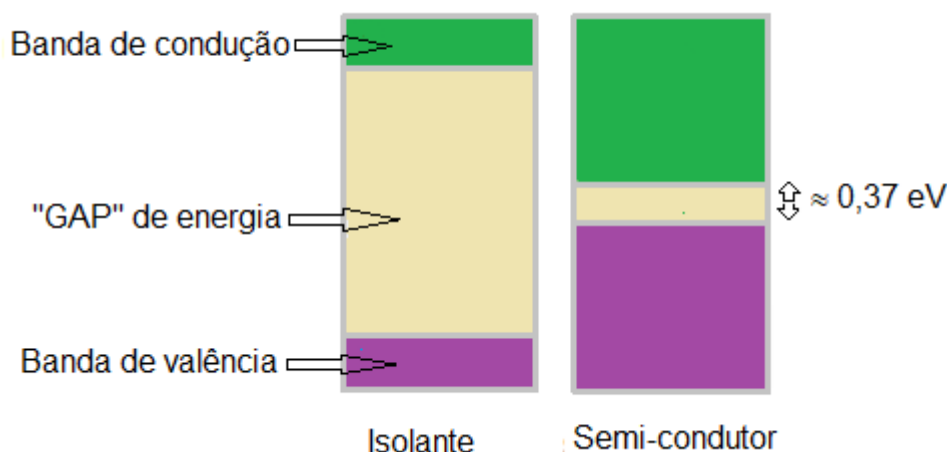
$\mu\text{mol L}^{-1}$  com LD de 0,032 e 1,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para nifedipino e ATN, respectivamente. Tian e colab. (2017) determinaram dopamina, ácido úrico e L-tirosina em soro humano e HCTZ em formulação farmacêutica, utilizando como eletrólito suporte tampão BR (pH 7,0) empregando como eletrodo de trabalho o grafeno depositado em um substrato de tântalo. Os resultados mostraram LD de 0,04, 0,1, 0,6 e 0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para dopamina, ácido úrico, L-Tirosina e HCTZ, respectivamente. Com isso, outros eletrodos de trabalho podem ser empregados para a determinação simultânea dos mais variados compostos. Porém, estes eletrodos não apresentam tantas vantagens como as do EDDB, podendo-se citar a não necessidade de modificação da sua superfície, fraca adsorção e elevada reprodutibilidade. Sendo assim, o EDDB é um excelente material para o emprego nas determinações simultâneas de diferentes compostos, podendo ser empregado na determinação simultânea de compostos presentes em misturas binárias, sendo AML e ATN, e AML e RMP e também presentes em uma mistura quaternária constituída por AML, AMI, HCTZ e ATN, pois, ainda não há descrito na literatura procedimentos voltamétricos relacionados a essas determinações.

## 1.7 ELETRODO DE TRABALHO - ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Uma das formas alotrópicas de carbono mais conhecidas é o diamante. O diamante sintético possui quase as mesmas propriedades físico-químicas do diamante natural. Dentre as diversas propriedades, pode-se citar, alta dureza, alto ponto de fusão, estabilidade química e alta energia de band-gap de aproximadamente 5,45 eV (FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; KRAFT, 2007), e esta última propriedade pode estar relacionada com a capacidade da transferência eletrônica do material. Este pode se tornar um semicondutor pela dopagem com alguns elementos, pois, pode ocorrer a diminuição considerável da energia de band-gap citada inicialmente (Figura 5). Após o primeiro artigo publicado por Pleskov e colab. (1987) mostrando a aplicação eletroquímica dos filmes de diamantes dopados, aumentou-se significativamente o interesse pela utilização deste material em aplicações eletroanalíticas. Isto deve-se principalmente as excelentes propriedades dos filmes de diamante dopado, que são

significativamente diferentes de outros eletrodos convencionais, tal como o ECV (ALFARO et al., 2006).

**Figura 5** – Diferenças do “GAP” de energia entre um material isolante e um material semi-condutor.



Fonte: Adptado de Kraft (2007)

A síntese mais empregada para obtenção do diamante é a deposição química a partir da fase vapor (Chemical Vapor Deposition – CVD). Esse método foi desenvolvido por William Eversole (SPEAR; DISMUKES, 1994), na década de 50 e baseia-se no crescimento do diamante sintético utilizando a decomposição térmica dos gases, contendo carbono (por exemplo metano) e hidrogênio. Para este processo, utiliza-se um reator, onde a deposição do filme de diamante ocorre sobre um substrato formando uma rede cristalina de carbono. Diferentes tipos de substratos como silício, tungstênio, molibdênio, titânio, grafite e carbono vítreo podem ser empregados (ALFARO e colab., 2006; DE CÁSSIA e colab., 2005; SILVA e colab., 1999). Esta síntese apresenta viabilidade econômica, sendo o principal método para a obtenção dos filmes de diamantes em série (FERRO e colab., 2002; PANIZZA e CERISOLA, 2005; PEDROSA e colab., 2004; PLESKOV, 2000, 2002).

Quanto ao dopante, diferentes elementos podem ser utilizados, tais como silício, tungstênio e molibdênio; estes podem ser injetados no reator simultaneamente com os gases hidrogênio e metano (FERRO et al., 2002). Outros elementos como fósforo e nitrogênio se forem utilizados como elementos de dopagem, apesar de causar uma mudança em algumas

propriedades físico-químicas, não fornecem condutividade necessária, apresentando valores abaixo da banda de condução de 1,4 e 0,5 eV, respectivamente (DE CÁSSIA e colab., 2005; KRAFT, 2007; SWAIN e colab., 1998). Na maioria dos casos, utiliza-se como dopante o elemento boro, visto que, possui três elétrons na sua camada de valência, atua como receptor de elétrons ao carbono do diamante. Com isso, o material resultante adquire propriedades semicondutoras do tipo p, reduzindo a energia de band-gap para aproximadamente 0,35 eV (MASSARANI; BOURGOIN; CHRENKO, 1978), acima da banda de valência, que é a energia necessária para que o elétron migre da banda de valência para a banda de condução (COMPTON; FOORD; MARKEN, 2003; LUONG; MALE; GLENNON, 2009).

Algumas fontes de boro utilizadas para a obtenção dos filmes de diamantes em CVD, estão descritas, tais como, hidreto de boro ( $B_2H_6$ ), trimetilboro ( $B(OCH_3)_3$ ) e trióxido de diboro ( $B_2O_3$ ) (ALFARO e colab., 2006; FUJIMORI; IMAI; DOI, 1986; SILVA e colab., 1999). O  $B_2H_6$  é um material facilmente encontrado e por não conter carbono ou oxigênio em sua estrutura, apresenta a vantagem de evitar a inclusão de elementos extras no reator, possibilitando um controle da concentração de boro, porém, apresenta as desvantagens de ser altamente tóxico, explosivo e reativo (MORT et al., 1989; SILVA et al., 1999). O  $B(OCH_3)_3$  e o  $B_2O_3$  não são tóxicos, porém, para sua utilização devem ser solubilizados em acetona ou metanol implicando em uma fonte adicional de carbono e oxigênio, o que pode alterar a estrutura final do filme (SWAIN; RAMESHAM, 1993; KATSUKI et al., 1998; GRANGER; SWAIN, 1999; HUPERT et al., 2003; BARROS et al., 2005). Em geral, são utilizadas para a dopagem concentrações de boro que variam de 10 a 20000 ppm, fornecendo um material com propriedades semicondutoras ou semimetálicas, dependendo do teor de boro utilizado (ALFARO e colab., 2006; PLESKOV, 2002).

Os filmes de diamantes obtidos pela dopagem com boro (Figura 6) adquirem inúmeras propriedades vantajosas frente aos demais eletrodos comumente utilizados em eletroanálise. Os autores Swain e Ramesham (1993), sintetizaram um filme de diamante empregando como substrato o silício. Para a caracterização do filme de DDB obtido, empregou a técnica de microscopia eletrônica de varredura, que possibilitou a observação do tamanho médio dos

cristais de 1 - 10  $\mu\text{m}$ . Já a técnica de espectroscopia Raman, apresentou uma banda intensa e estreita, que é característica da forte ligação do diamante com o dopante. Ademais, empregando as técnicas de voltametria cíclica, cronoamperometria e impedância, os autores puderam observar algumas propriedades eletroquímicas como, baixa capacitância da dupla camada, inércia química da superfície e uma resposta estável dos três filmes testados. Além destas propriedades citadas, outros estudos destacam a facilidade de modificação, boa resposta a alguns analitos em soluções aquosas e não-aquosas com pré-tratamento convencional, adsorção fraca de moléculas polares, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento, além de um amplo intervalo eletroquímico de potencial de trabalho em meio aquoso e não aquoso com o desprendimento de hidrogênio começando em  $-1,5\text{ V}$  e o desprendimento de oxigênio em  $+2,5\text{ V}$  vs. Ag/AgCl (KCl  $3,0\text{ mol L}^{-1}$ ) (PECKOVÁ; MUSILOVÁ; BAREK, 2009; PLESKOV, 2002; SALAZAR-BANDA e colab., 2006). Com isso, os filmes de DDB estão sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de procedimentos eletroquímicos para determinação individual ou simultânea de diversas substâncias orgânicas (FIGUEIREDO-FILHO e colab., 2015; GIMENES e colab., 2015; LIMA e colab., 2013; SANTOS e colab., 2013; SANTOS e colab., 2014; SCREMIN e colab., 2015; ŠVORC e colab., 2014) e inorgânicas (DINIZ et al., 2002), em diferentes matrizes.

**Figura 6** – Eletrodo de diamante dopado com boro



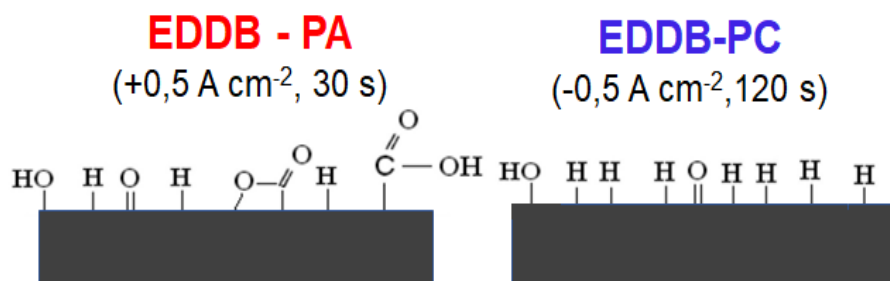
**Fonte:** O próprio autor.

Os autores Fujishima e colaboradores (1999) sintetizaram um filme de DDB a partir do substrato de silício, empregando para a dopagem acetona e metanol como fonte de carbono, e  $\text{B}_2\text{O}_3$  dissolvido como fonte de boro. Na caracterização do filme, a partir da técnica de espectroscopia Raman, os resultados mostraram uma forte banda característica de diamantes fortemente ligados ao boro. Com a técnica de microscopia eletrônica de varredura, foram

observados cristais bem definidos com tamanhos de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . Este filme foi empregado na determinação de dopamina e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, cujas respostas eletroquímicas apresentaram alta sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade por um longo período. Sarada e colaboradores (2000) empregaram o silício como substrato para a síntese do filme de DDB. Eles utilizaram uma mistura de acetona e metanol 9:1 (v/v) como fonte de carbono, e como fonte de boro o  $\text{B}_2\text{O}_3$  que foi dissolvido na acetona-metanol a uma razão molar B/C de  $10^4$  ppm. A qualidade do filme obtido foi confirmada por espectroscopia Raman. Este filme foi aplicado para a determinação de histamina e cloridrato de serotonina onde as respostas eletroquímicas apresentaram alta reprodutibilidade. Švorc e colaboradores (2014) sintetizaram um filme de DDB para a determinação de AML em formulações farmacêuticas e urina humana. Eles caracterizaram o filme obtido por meio da microscopia eletrônica de varredura e o tamanho médio dos cristais de diamante dopado com boro foi de 0,5 – 1  $\mu\text{m}$ , e também utilizaram a espectroscopia Raman para a observação de bandas características à incorporação do boro no filme, onde foi possível observar bandas tipicamente características para filmes de diamantes fortemente dopados com boro. O eletrodo construído foi excelente para a determinação da AML.

No processo de produção dos filmes de DDB a atmosfera contendo hidrogênio possibilita que as terminações dos filmes de DDB sejam preferencialmente em hidrogênio, com características hidrofóbicas (BAIRU; STEFAN; VAN STADEN, 2003; HUPERT et al., 2003; SALAZAR-BANDA et al., 2006), porém, estas terminações podem ser facilmente modificadas para terminações em oxigênio, ou seja, com características hidrofílicas. Estas diferentes terminações (Figura 7) podem ser obtidas a partir de pré-tratamentos eletroquímicos adequados, onde emprega-se a redução da água para obter terminações em hidrogênio (EDDB-PC) e a oxidação para obter terminações em oxigênio (EDDB-PA) (SUFFREDINI et al., 2004; GIRARD et al., 2007). Uma superfície terminada em oxigênio pode ser alterada para uma terminação em hidrogênio por tratamento catódico em meio ácido e vice-versa (KRAFT, 2007).

**Figura 7** - Terminações superficiais dos filmes de diamantes dopados com boro. Em vermelho eletrodo de diamante dopado com boro com pré tratamento anódico (EDDB – PA), em azul eletrodo de diamante dopado com boro com pré-tratamento catodico (EDDB – PC).



**Fonte:** O próprio autor.

Com o passar dos anos, diferentes densidades de corrente para os tratamentos eletroquímicos foram testadas. Estudos demonstraram a influência dos pré-tratamentos eletroquímicos catódico e anódico quando se aplica diferentes densidade de corrente. Os autores Girard e colaboradores (2007) utilizaram filmes de DDB os quais aplicaram duas diferentes densidade de corrente, uma mais baixa ( $\pm 100 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) e uma outra mais alta ( $\pm 100 \text{mA cm}^{-2}$ ). Os resultados mostraram que o uso do pré-tratamento com maior densidade de corrente, apresentou um desgaste maior da superfície do eletrodo. Muitos pesquisadores ainda estudam os tratamentos eletroquímicos para avaliar os desgastes nos filmes e ainda, suas influências nas determinações de moléculas orgânicas e inorgânicas. Até o momento, tratamentos eletroquímicos empregando densidade de corrente mais baixas são preferidas, por causarem menores desgastes na superfície dos filmes e aumentar sua vida útil (BROCENSCHI et al., 2016).

Neste contexto, muitos trabalhos da literatura (MANSANO e colab., 2015; MANSANO; EISELE; SARTORI, 2015; MANSANO e SARTORI, 2015; SALAMANCA-NETO e colab., 2016; SIANGPROH e colab., 2003) mostram que as propriedades eletroquímicas dos EDDB são sensíveis ao tipo das terminações superficiais, tanto para potenciais catódicos (FERRAZ e colab., 2016; ŠVORC e colab., 2013) quanto anódicos (EISELE et al., 2013a; SARTORI et al., 2013; EISELE; SARTORI, 2015), fornecendo precisão e LD relativamente baixos. Em um trabalho pioneiro, Suffredini e colaboradores

(2004) estudaram a influência das terminações na superfície do EDDB empregando os pré-tratamentos catódicos e anódicos (terminações em hidrogênio e oxigênio, respectivamente) a partir do processo redox do par ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Observaram que o pré-tratamento catódico facilitou a interação do par redox com a superfície do eletrodo, podendo ser observada uma alta condutividade. Sendo assim, as superfícies, anódica ou catódica, podem causar impacto significativo no desempenho analítico (SUFFREDINI et al., 2004; BROCCENSCHI et al., 2016), principalmente quando se trata de determinações simultâneas de compostos (DEROCO et al., 2015; SALAMANCA-NETO et al., 2016). Por exemplo, o pré-tratamento catódico mostrou melhor definição dos picos de oxidação na determinação simultânea de MTP e HCTZ (SALAMANCA-NETO et al., 2016), na determinação simultânea ternária de AML, HCTZ e VAL (MANSANO; EISELE; SARTORI, 2015) e na binária de AML e VAL (MANSANO et al., 2015). Por outro lado, o pré-tratamento anódico foi empregado na determinação individual de imatinib em urina (BRYCHT et al., 2016) e na determinação simultânea de baunilha e cafeína em amostras comerciais de alimentos e bebidas (ALI et al., 2017), com excelente definição dos picos de oxidação.

Além da melhora de definição dos picos, o tipo de pré-tratamento empregado pode influenciar na intensidade de corrente e na separação dos potenciais de oxidação, quando a determinação é feita em amostras com mais de um composto. Na determinação simultânea de losartana (LOS) e HCTZ em medicamentos empregou-se o EDDB-PA (SANTOS e colab., 2013). Os resultados mostraram que o emprego do EDDB-PC proporcionou um aumento da intensidade de corrente da HCTZ e menor para a LOS. Quando empregou-se o EDDB-PA a HCTZ apresentou menor intensidade de corrente e a LOS maior intensidade de corrente. Porém, foi possível observar que, quando o pré-tratamento catódico foi empregado, a corrente de oxidação para LOS diminuiu significativamente com o aumento do número de varreduras, indicando que o produto de oxidação pode ser adsorvido na superfície do EDDB-PC, enquanto que empregando-se o EDDB-PA este comportamento não foi observado, obtendo-se maior repetibilidade dos sinais analíticos para obtenção de LOS. Na determinação de aspartame e acesulfame-K em alimentos (DEROCO et al., 2015), o pré-tratamento anódico apresentou maior intensidade de corrente e

excelente separação entre os potenciais de oxidação para os dois edulcorantes, indicando que uma superfície predominantemente terminada em oxigênio aumenta a atividade eletroquímica do EDDB para os processos de oxidação de aspartame e acessulfame. Eisele e colaboradores (2013a) determinaram paracetamol, cafeína e orfenadrina em formulações farmacêuticas utilizando o EDDB-PC, pois, observaram uma melhor separação entre os picos e uma maior intensidade de corrente. Em outro trabalho, a determinação de dopamina na presença do ácido ascórbico foi realizada com EDDB após a obtenção do filme (sem nenhum tipo de pré-tratamento) e o EDDB-PA (FUJISHIMA et al., 1999). Os resultados mostraram que o EDDB sem pré-tratamento não apresentou a separação do pico anódico dos dois compostos, já o EDDB-PA apresentou adequada separação da dopamina e ácido ascórbico. A determinação de ácido úrico na presença de altas concentrações de ácido ascórbico também foi verificada por Popa e colaboradores (2000). Para isso, utilizou um EDDB sem nenhum tipo de pré-tratamento e depois o EDDB-PA. Os resultados demonstraram que no EDDB-PA, quando empregou-se as mesmas concentrações dos dois compostos, o ácido úrico apresentou maior intensidade de corrente do que o ácido ascórbico, sendo assim, o EDDP-PA foi aplicado com sucesso para a detecção de ácido úrico na presença de ácido ascórbico com excelente sensibilidade e seletividade.

Desta forma, para garantir a mesma superfície em todas as análises, assegurando assim uma análise reprodutível, o EDDB deve ser submetido ao pré-tratamento anódico e/ou catódico, dependendo de qual terminação foi selecionada para o estudo, diariamente, previamente às análises.

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver métodos analíticos para a determinação voltamétrica de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas comerciais utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter voltamogramas cíclicos para AML, HCTZ, ATN, AMI e RMP, a fim de verificar processos de oxidação/redução no EDDB;

Avaliar o pH ideal para a determinação simultânea dos fármacos e, a partir disso, avaliar qual o melhor eletrólito suporte no valor de pH selecionado;

Comparar experimentalmente a resposta voltamétrica obtida para os fármacos utilizando o EDDB com aquelas obtidas com outros eletrodos;

Estudar os parâmetros das técnicas de VOQ e VPD para a obtenção da curva analítica para posterior determinação simultânea dos fármacos;

Determinar os fármacos simultaneamente (mistura binária de AML e ATN e de AML e RMP e da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN) utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro nas condições otimizadas;

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras comerciais analisadas e determinar as concentrações dos anti-hipertensivos empregando voltametria de onda quadrada e/ou de pulso diferencial eletrodo de diamante dopado com boro;

Avaliar a exatidão do método proposto, comparando os resultados obtidos com aqueles obtidos empregando-se métodos cromatográficos simultâneos descrito na literatura;

Analisar estatisticamente os resultados obtidos.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água ultrapura (resistividade  $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) fornecida por um sistema Milli-Q (Millipore®). Para o ajuste do pH das soluções, empregou-se um pHmetro Hanna Instruments, modelo HI-221 com um eletrodo combinado de vidro com Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), como eletrodo de referência externa.

Os padrões utilizados de AML, AMI, HCTZ, ATN e RMP apresentavam uma pureza  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich. O cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), hidrogenocarbonato de sódio, os ácidos acético, bórico, fosfórico, sulfúrico e orto-fosfórico, bem como hidróxidos de sódio e amônia, fosfatos de potássio monobásico e dibásico e cloreto de amônio foram adquiridos da Synth.

As soluções estoque de todos os anti-hipertensivos foram preparadas na concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . ATN foi dissolvido diretamente em água. AML e RMP foram preparados em metanol:água, na proporção 1: 2 (v/v). AMI e HCTZ foram preparados em metanol puro.

As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoque de AML, AMI, HCTZ, ATN e RMP com as respectivas soluções selecionadas como eletrólito suporte. A solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) foi empregada na determinação da mistura binária de AML e ATN. Para a determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN, utilizou a solução tampão de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0). Finalmente, a solução tampão Britton-Robinson (BR)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) foi empregada na determinação na mistura binária de AML e RMP. As soluções estoque, bem como, as soluções de trabalho foram preparadas nos dias dos experimentos.

A solução tampão BR foi escolhida como eletrólito suporte para estudo de pH. Esta solução foi preparada misturando  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  em ácidos acético, bórico e fosfórico, com pH ajustado de 2,0 a 12,0 com uma solução de NaOH  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

A solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela mistura das soluções de fosfato de potássio monobásico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e fosfato de potássio dibásico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , ajustando o pH para 7,0.

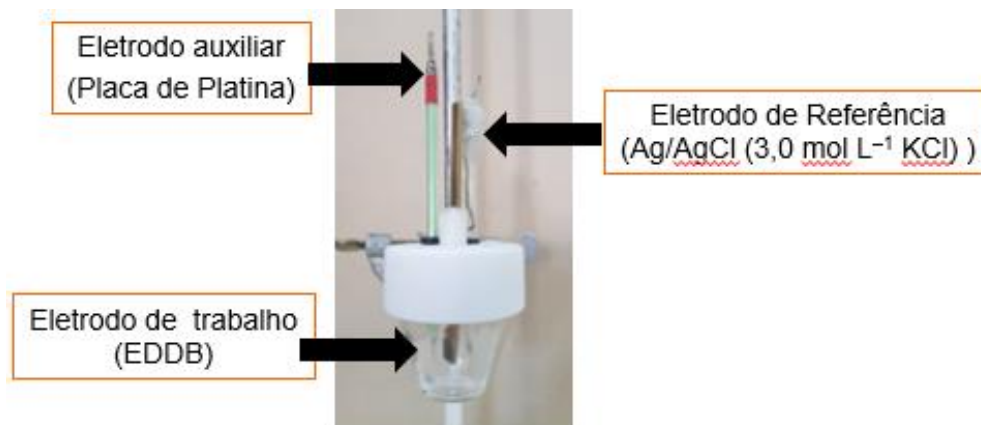
A solução tampão amônia foi preparada pela mistura das soluções de hidróxido de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e cloreto de amônio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH ajustado para 9,0.

As amostras farmacêuticas (comprimidos) analisadas neste trabalho, foram adquiridas em uma farmácia local, na cidade de Londrina – PR. Para a determinação das misturas binárias, foram utilizadas amostras combinadas dos fármacos com quantidade declarada nos rótulos de AML:ATN (5:25 e 5:50 mg) e AML:RMP (5:5 e 5:10 mg), onde 5 mg de AML (MM:  $408,9 \text{ g mol}^{-1}$ ) correspondente a 6,9 mg de besilato de anlodipino. Para a determinação da mistura quaternária, empregou-se amostras individuais de AML e ATN com quantidade declarada de 10 e 25 mg, respectivamente e também uma amostra combinada de AML:HCTZ (5:50 mg).

### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em uma célula de vidro com capacidade para 15 mL de solução, equipada com uma tampa de Teflon<sup>®</sup>, contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (Figura 8). O eletrodo de referência utilizado foi de Ag/AgCl (KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), o eletrodo auxiliar foi uma placa de platina e, como eletrodo de trabalho, foi empregado o EDDB (8000 ppm de boro, área exposta de  $0,25 \text{ cm}^2$ ; produzido pela Adamant, Suíça).

**Figura 8** - Esquema da célula eletroquímica com indicação dos os eletrodos de trabalho (filme de DDB), auxiliar (placa de Pt) e de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>)).



**Fonte:** O próprio autor.

Para as medidas voltamétricas foi empregado dois tipos de equipamentos: o potenciostato/galvanostato FRA2  $\mu$ Autolab tipo III (Metrohm Autolab B.V., Holanda) gerenciado pelo software GPES, foi utilizado na determinação simultânea da mistura binária do AML e ATN e para a mistura quaternária do AML, AMI, HCTZ e ATN. Para a determinação simultânea da mistura binária de AML e RMP, as medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT101 AUTOLAB (Metrohm Autolab B.V., Holanda) gerenciado pelo software NOVA 2.1.

Para o pré-tratamento eletroquímico do EDDB utilizou solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. O pré-tratamento eletroquímico do EDDB, foi realizado em diferentes equipamentos. Na determinação simultânea da mistura binária do AML e ATN e para a mistura quaternária do AML, AMI, HCTZ e ATN, o pré-tratamento foi realizado num potenciostato/galvanostato MQPG-01 (Microquímica, Brasil). Para a determinação simultânea de AML e ATN foi utilizado o EDDB pré-tratado catodicamente (-0,5 A cm<sup>-2</sup>, 120 s), com sua superfície predominantemente terminada em hidrogênio (SUFFREDINI et al., 2004), e para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN, o EDDB foi pré-tratado anodiamente (+0,5 A cm<sup>-2</sup>, 30 s), com sua superfície predominantemente terminada em oxigênio (SUFFREDINI et al., 2004). Para a determinação simultânea da mistura binária do AML e RMP, o pré-tratamento foi realizado num potenciostato/galvanostato PGSTAT101 AUTOLAB (Metrohm

Autolab B.V., Holanda). O EDDB foi pré-tratado catodicamente ( $-0,25 \text{ A cm}^{-2}$ , 240 s), com sua superfície predominantemente terminada em hidrogênio (SUFFREDINI et al., 2004).

Para a comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea do AML e ATN empregando o EDDB foi utilizado um ECV (3 mm de diâmetro, Tokay, Japão), eletrodo de pasta de carbono EPC e eletrodo de pasta de nanotubos de carbono EPNTC. Na determinação simultânea da mistura quaternária do AML, AMI, HCTZ e ATN e da mistura binária do AML e RMP utilizou-se um ECV para comparação com os resultados obtidos pelo EDDB. Antes de ser utilizado, o ECV (3 mm de diâmetro, Tokay, Japão), foi mecanicamente polido com alumina em pó de 0,05 mm, limpo com água destilada, sonicado durante 5 minutos em etanol absoluto e limpo em água ultrapura. Depois de polido e seco à temperatura ambiente, o ECV foi utilizado na determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN e da mistura binária de AML e RMP. Para o EPNTC misturou-se NTC já funcionalizados com óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>) na proporção de 30:70% (m/m), conforme descrito por Salamanca-neto e colaboradores (2015). Para a funcionalização do NTC utilizou-se uma mistura de  $\text{HNO}_3$ :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3: 1, v/v) à temperatura ambiente. O EPC foi preparado homogeneizando cuidadosamente o grafite com óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>) em uma placa de Petri com uma espátula de aço inoxidável por 10 min. Finalmente, a pasta de grafite foi cuidadosamente acomodada na cavidade de um tubo de Teflon<sup>®</sup> suportado por uma placa de carbono e foi compactada com a espátula resultando em uma superfície lisa. A área geométrica dos eletrodos de trabalho, EPNTC e EPC, foi de  $0,0707 \text{ cm}^2$  para ambos eletrodos.

### 3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS DETERMINAÇÕES VOLTAMÉTRICAS

Para a quantificação simultânea dos anti-hipertensivos AML e ATN (5:25 ou 5:50 mg), foram adquiridas duas amostras farmacêuticas comerciais de dosagem combinada contendo ambos fármacos, dez comprimidos de cada embalagem foram pesados individualmente para a determinação do peso médio dos comprimidos, e em seguida foram reduzidos com o auxílio de um

almofariz e pistilo, até um pó fino e homogêneo. Este pó foi pesado em balança analítica (Shimadzu, ATY224, 0,0001g) até uma massa correspondente a um comprimido, para cada uma das amostras, e foi transferido para dois balões volumétricos de 25,0 mL contendo 10 mL de metanol. Após 5 minutos de sonicação, o volume dos balões foi completado até a marca do menisco com solução tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Em seguida, as amostras foram quantificadas, transferindo diretamente uma alíquota de 170 µL do sobrenadante de cada solução amostra para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), e então os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. As concentrações desses anti-hipertensivos, em cada amostra, foram determinadas diretamente por interpolação nas respectivas curvas analíticas previamente obtidas.

Para a quantificação simultânea dos anti-hipertensivos AML, AMI, HCTZ e ATN empregou a preparação das amostras farmacêuticas comerciais de dosagens individuais para AML (10 mg) e ATN (25 mg) e de dosagens combinadas para AMI e HCTZ (5:50 mg), onde dez comprimidos de cada formulação foram reduzidos a um pó fino e homogêneo. Uma quantidade equivalente a massa de um comprimido para cada amostra em pó foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL contendo metanol, sendo o volume do balão completado com solução tampão amônio 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0), ou seja, a massa das três amostras (AML e ATN – individuais e AMI e HCTZ – combinados) foram transferidas para o mesmo balão volumétrico. Posteriormente, uma alíquota de 190 µL do sobrenadante da solução da amostra foi transferida diretamente para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão amônio 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0), após, foram obtidos os voltamogramas de onda quadrada desta mistura quaternária. As concentrações dos anti-hipertensivos foram determinadas diretamente por interpolação nas respectivas curvas analíticas previamente obtidas.

Duas amostras farmacêuticas comerciais de dosagem combinadas dos anti-hipertensivos AML e RMP foram empregadas para a quantificação simultânea. Tanto para as dosagens de 5:5 ou 5:10 mg AML e RMP respectivamente, as soluções foram preparadas a partir da cominuição de 10 comprimidos de cada embalagem, até um pó fino e homogêneo. Em seguida, uma quantidade deste pó, equivalente a massa de um comprimido, para cada

uma das amostras, foi pesada e transferida a dois balões volumétricos calibrados de 25,0 mL contendo metanol. Os balões volumétricos foram avolumados, até a marca do menisco, com solução tampão BR 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0). Posteriormente, alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada solução amostra, foram diretamente transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão Br 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0). Na sequência, foram obtidos os voltamogramas de pulso diferencial para as misturas binárias. As concentrações para cada analito presentes nas amostras, foram determinadas diretamente por interpolação nas curvas analíticas previamente obtidas.

### 3.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS: MÉTODOS COMPARATIVOS

Para avaliar a exatidão dos métodos propostos, comparou-se os resultados obtidos na determinação voltamétrica com aqueles obtidos por CLAE. A coluna cromatográfica empregada em todas as metodologias foi a ACE 5 C18 (250 mm × 4,6 Mm id, tamanho de partícula: 5 µm) mantida a 25 ± 1,0 °C.

Para a determinação das amostras farmacêuticas com AML e ATN foi empregado um equipamento de cromatografia líquida da Alliance<sup>®</sup> e2695 da Waters (EUA), acoplado a um detector de arranjo de diodos DAD da Waters 2998. As condições de separação cromatográfica que foram empregadas para esta determinação estão de acordo com (BARMAN et al., 2007), na qual a fase móvel consistiu-se numa mistura de solução tampão acetato de amônio (o pH foi ajustado para 4,5 com ácido acético glacial), acetonitrila e metanol (35:30:35 v/v/v), com fluxo constante de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 40 °C e o volume de injeção foi de 10 µL, sendo a detecção realizada em 237 nm. No preparo das amostras, dez comprimidos de cada formulação farmacêutica foram reduzidos a um pó fino homogêneo com o auxílio de um almofariz e pistilo. Foi pesada a massa deste pó correspondente a um comprimido e, então, foi transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando-se o volume do balão até a marca do menisco com a fase móvel. As soluções das amostras foram filtradas usando filtros de membrana de nylon de PTFE 0,20

$\mu\text{m}$  e  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore®), respectivamente. Após a diluição apropriada com a fase móvel, foram obtidos os cromatogramas para ambos anti-hipertensivos.

Para a determinação das amostras farmacêuticas da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN e da mistura binária de AML e RMP, foi utilizado um sistema LC Shimadzu acoplado a uma bomba LC-20AT, um injetor automático SIL-20AC e um detector SPD-M20A PDA.

Considerando que não há na literatura, a descrição de algum método que possibilitasse a determinação simultânea dos quatro anti-hipertensivos, houve a necessidade do emprego de três diferentes métodos cromatográficos para a determinação dos mesmos. Como já descrito anteriormente, foram utilizadas três diferentes amostras farmacêuticas para a determinação dos quatro anti-hipertensivos. Com isso, para cada amostra farmacêutica foi empregado um método cromatográfico diferente. As condições de separação cromatográfica foram empregadas de acordo com Basavaiah e colaboradores (2005) para a determinação do AML, Zecevic e colaboradores (2000) para a determinação simultânea de AMI e HCTZ e finalmente, a metodologia descrita por Kumar e colaboradores (2010) para a determinação do ATN, todas as metodologias adotadas tiveram pequenas modificações. Para a determinação individual do AML, o método descrito empregou como fase móvel uma mistura de solução de acetonitrila e ácido ortofosfórico (pH 3,0) 80:20 (v/v), o fluxo foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , sendo a detecção realizada em 238 nm. A segunda amostra, foi empregada para a determinação simultânea de AMI e HCTZ, a fase móvel foi composta por uma mistura de água e metanol 60:40 (v/v) com pH ajustado para 3,2 com ácido acético, o fluxo foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e o detector foi ajustado em 280 nm. E por fim, para a determinação da terceira amostra, que estava presente apenas o ATN, a fase móvel consistiu de uma mistura de solução de acetonitrila e tampão fosfato (pH 7,0) 50:50 (v/v), o fluxo foi de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  e a detecção foi realizada em 230 nm.

Para o preparo das amostras, dez comprimidos de cada respectiva formulação farmacêutica foram reduzidos a um pó fino e homogêneo com o auxílio de um almofariz e pistilo. Para o AML, 30 mg do pó foi transferido para um balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou-se 60 mL de fase móvel, agitou-se por aproximadamente 20 min e então o volume do balão foi completado até a marca do menisco com a fase móvel. Um volume de 10 mL desta solução foi

filtrado usando filtros de membrana de nylon de PTFE 0,20  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>). A solução filtrada foi adequadamente diluída com a fase móvel e então foram obtidos os cromatogramas. Para o preparo da amostra de AMI e HCTZ (formulação combinada), a massa equivalente a um comprimido foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL e diluído com solução padrão interno (solução de cafeína 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A mistura foi sonicada durante 5 min à temperatura ambiente. O volume de 1 mL desta solução foi diluído para 10 mL com solução de padrão interno e então, esta solução foi adequadamente diluída, após a filtração com membrana de PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>), obtendo-se os cromatogramas. Para o ATN a massa correspondente a um comprimido foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando o volume do balão com a fase móvel para obter a concentração de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em seguida, filtrou esta solução em uma membrana de PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>). Esta solução filtrada foi adequadamente diluída com a fase móvel, e então, foram obtidos os cromatogramas.

O método comparativo empregado para a determinação das amostras farmacêuticas contendo AML e RMP está de acordo com Maste e colaboradores (2011), com pequenas modificações. Para isso, a fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato pH 4,0 (60:40 v/v), o fluxo foi constante de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , a temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o volume da injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ , a detecção foi realizada em 222 nm. No preparo das amostras, dez comprimidos de cada formulação farmacêutica foram reduzidos a um pó fino e homogêneo com o auxílio de um almofariz e pistilo. Este pó, foi pesado até a massa correspondente a um comprimido, e então transferido para um balão volumétrico calibrado de 100,0 mL contendo 50,0 mL de fase móvel, sonicou-se por aproximadamente 10 minutos e então, o volume do balão foi completado até a marca do menisco com a fase móvel. Posteriormente, estas soluções foram filtradas em uma membrana de PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>). Após a filtração, estas soluções foram adequadamente diluídas com a fase móvel, e então, foram obtidos os cromatogramas.

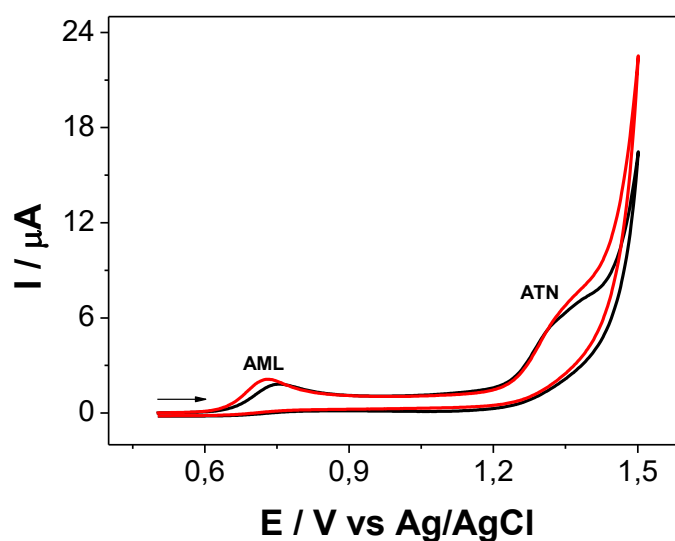
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML E ATN

#### 4.1.1 Estudo Eletroquímico do AML e ATN sobre o EDDB

Para avaliar o comportamento eletroquímico do AML e ATN empregou-se a VC. Inicialmente, o efeito do pré-tratamento, anódico e catódico, no EDDB na mistura contendo AML e ATN foi investigado em meio a solução tampão fosfato (pH 7,0). Como pode ser observado na Figura 9, que mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para AML  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o comportamento eletroquímico do AML e ATN nesses dois tipos de pré-tratamento foram muito semelhantes. No entanto, os melhores resultados foram obtidos usando um EDDB-PC, que apresentou maior magnitude de corrente e melhor repetibilidade do pico de oxidação de ambos os anti-hipertensivos. Assim, os experimentos seguintes foram realizados utilizando o EDDB com sua superfície predominantemente terminada em hidrogênio. Cabe ressaltar que o pré-tratamento da superfície do eletrodo foi realizado apenas uma vez ao dia, no início do trabalho, o que permitiu o uso do eletrodo durante um longo período de tempo com a mesma resposta.

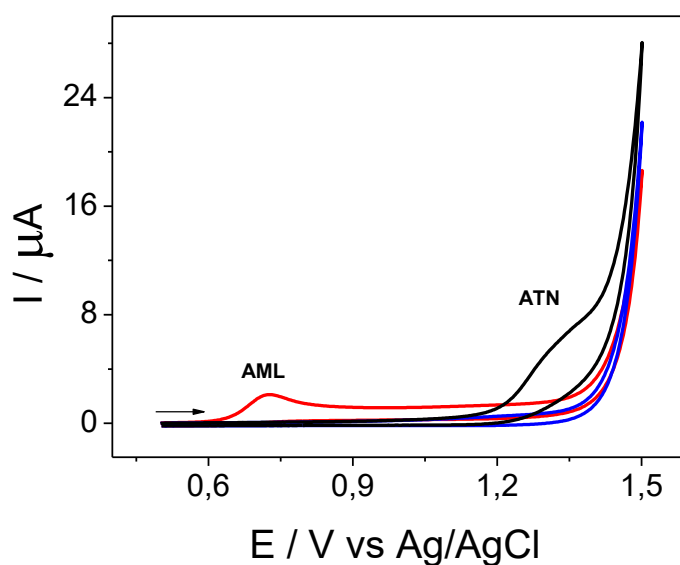
**Figura 9** - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB com diferentes pré-tratamentos usando AML  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato (pH 7,0): (—) pré-tratamento catódico, (—) pré-tratamento anódico.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: o próprio autor

A Figura 10 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos individualmente para AML 49,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 49,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato (pH 7,0) sobre o EDDB-PC. Como pode ser visto, para ambos os analitos, um processo de oxidação foi observado, o primeiro correspondendo à oxidação do AML (0,727 V) e o segundo, à oxidação do ATN (1,32 V). Nenhum pico na varredura reversa foi observado, indicando que o processo de oxidação de ambos anti-hipertensivos no EDDB é irreversível (GOYAL et al., 2006; GOYAL; BISHNOI, 2010). A diferença dos valores dos potenciais entre os picos de oxidação de ambos anti-hipertensivos ( $\Delta E_{pa}$ ) é de 0,590 V, mostrando que a determinação simultânea dessas drogas é viável neste eletrodo e nessas condições.

**Figura 10** - Voltamogramas cíclicos individuais dos analitos obtidos empregando EDDB-PC utilizando: (—) solução tampão fosfato (pH 7,0), (—) AML 49,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (—) ATN 49,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** o próprio autor

O número de elétrons transferidos ( $n$ ) na oxidação de AML e ATN no EDDB-PC foi estimado empregando os voltamogramas obtidos para AML e ATN em solução tampão fosfato (pH 7,0) (Figura 10) e a Equação 1 (BARD; FAULKNER, 2001):

$$E_p - \frac{E_p}{2} = \frac{47,7 \text{ mV}}{an} \quad \text{Eq. 1}$$

sendo:

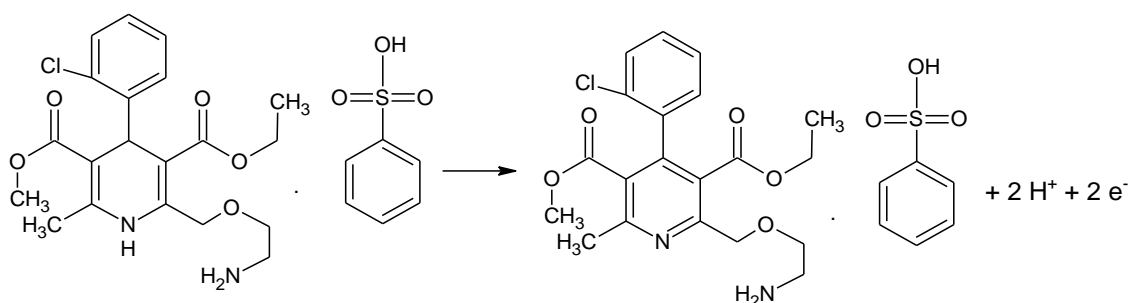
$E_p$  : Potencial de oxidação;

$E_{\frac{p}{2}}$  : Potencial de meia onda;

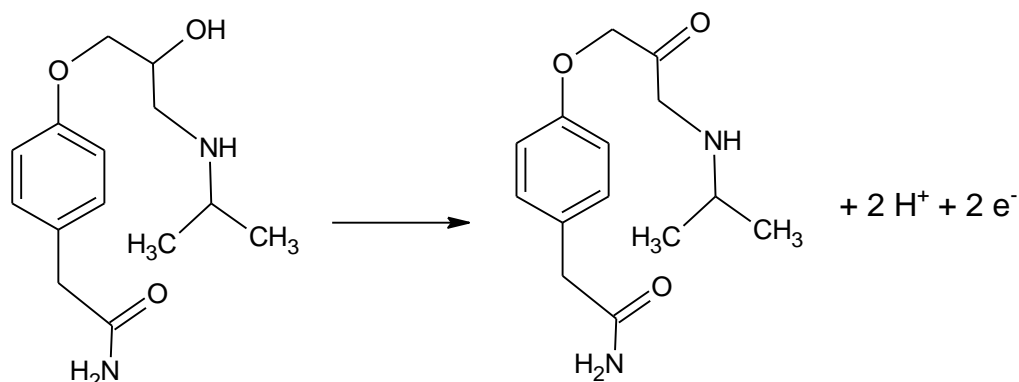
$\alpha$  : Coeficiente de transferência de elétrons (0,5 para sistemas irreversíveis) (LI, 2007).

Para AML,  $E_p$  é 0,727 V e  $E_{\frac{p}{2}}$  é 0,677 V. Para ATN,  $E_p$  é 1,32 V e  $E_{\frac{p}{2}}$  é 1,27 mV. Considerando o valor do coeficiente de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) como 0,5, o  $n$  foi calculado igual a 2 para ambos os anti-hipertensivos. Esses resultados demonstram que dois elétrons estão envolvidos, tanto na oxidação de AML, como na oxidação de ATN em solução tampão fosfato (pH 7,0). De acordo com outros trabalhos da literatura, acredita-se que a oxidação eletroquímica de AML (Figura 11) ocorre no anel de 1,4-dihidropiridina, envolvendo dois prótons e dois elétrons (GOYAL; BISHNOI, 2010); já para o ATN (Figura 12), o pico anódico aqui observado corresponde à oxidação do grupo alcoólico secundário desta molécula, como sugerido por Goyal e colab. (2006) com base nos resultados relatados por Hiremath e colab.(2005) da oxidação do ATN com permanganato em meio alcalino.

**Figura 11** - Reação de oxidação do besilato de anlodipino (AML).



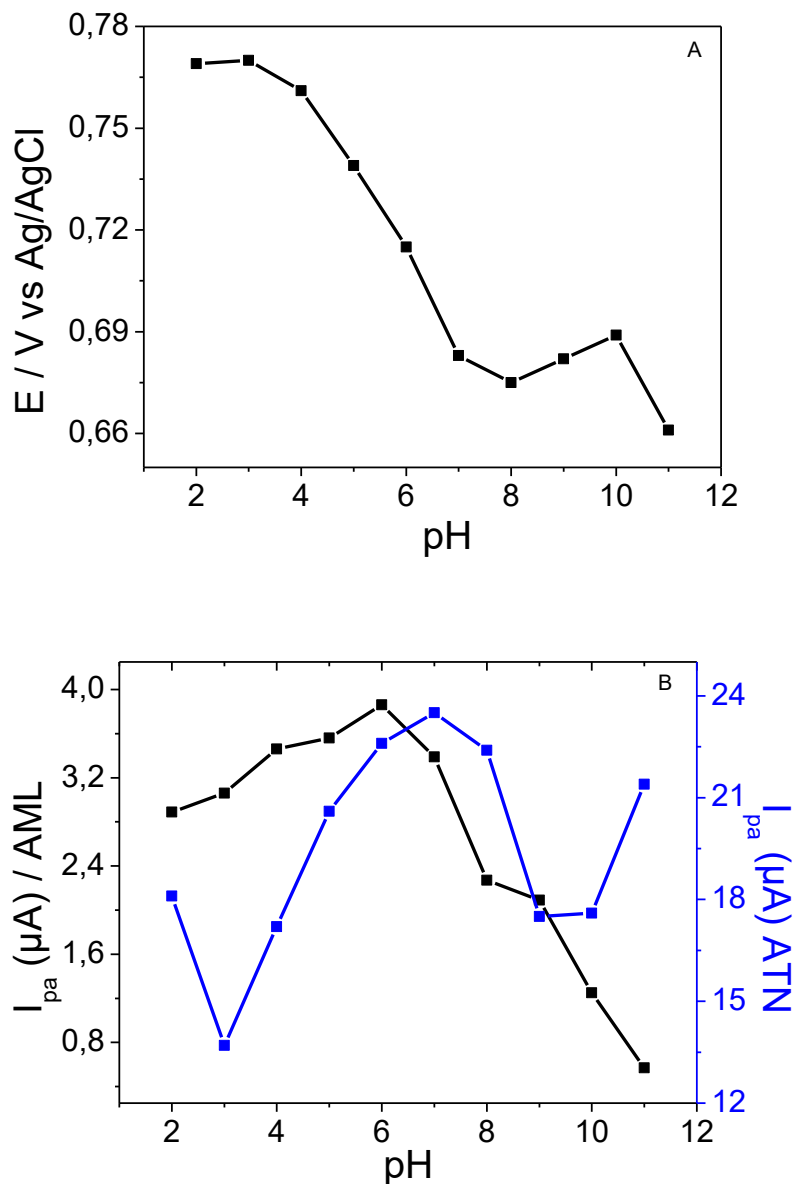
**Figura 12** - Reação de oxidação do atenolol (ATN).



#### 4.1.2 Efeito da Concentração Hidrogeniônica do Meio e Eletrólito Suporte

O comportamento eletroquímico de AML  $46 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $550 \mu\text{mol L}^{-1}$  no EDDB-PC foi explorado em soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 – 11,0) usando VOQ com frequência ( $f$ ) = 30 Hz, amplitude do pulso ( $a$ ) = 50 mV e incremento de varredura ( $\Delta E_S$ ) = 2 mV. Foi observada a influência da concentração hidrogeniônica do meio no  $\Delta E_{pa}$  (Figura 13 A) e na corrente do pico ( $I_{pa}$ ) (Figura 13 B) de AML e ATN, respectivamente. Com o aumento na concentração hidrogeniônica do meio há um deslocamento do pico de oxidação para valores menores de potencial para ambos os anti-hipertensivos e o  $\Delta E_{pa}$  torna-se menor. Os valores de intensidade de corrente mais altos para AML e ATN foram obtidos em pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Considerando a repetibilidade da corrente de pico obtida para a oxidação de ambos anti-hipertensivos, foi selecionado o pH 7,0 para a determinação simultânea de AML e ATN.

**Figura 13** - Influência da concentração hidrogeniônica do meio na separação do potencial dos picos anódicos (A) e nas correntes dos picos (B) de AML 46  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 550  $\mu\text{mol L}^{-1}$  usando soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 - 11,0) e a VOQ. Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .

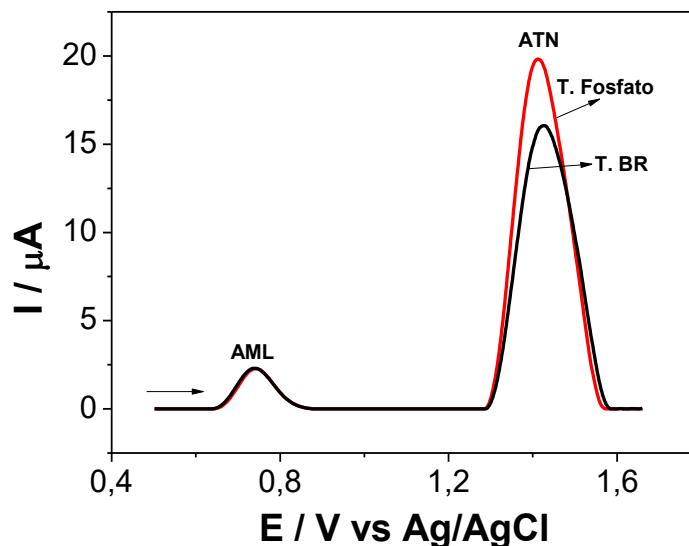


**Fonte:** o próprio autor

A resposta obtida em solução tampão BR foi comparada com aquela obtida em solução tampão fosfato, ambas no mesmo valor de pH 7,0 (Figura 14). Os resultados foram muito semelhantes para AML e uma maior magnitude de corrente de oxidação para ATN foi obtida em solução tampão fosfato, com

uma melhor repetibilidade do sinal. Portanto, a solução tampão fosfato (pH 7,0) foi escolhida como eletrólito suporte para posteriores estudos.

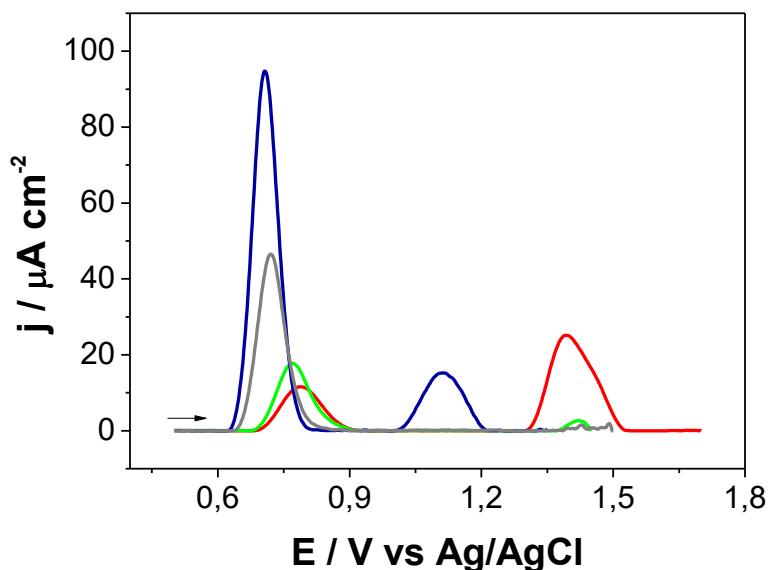
**Figura 14** - Voltamogramas de onda quadrada de AML  $46 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $550 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando um EDDB-PC em soluções tampão BR (—) e fosfato (—), ambos em pH 7,0. Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .



**Fonte:** o próprio autor

O desempenho eletroanalítico do EDDB-PC na oxidação da AML e ATN foi comparado com aqueles obtidos empregando-se ECV, EPC e EPNTC, utilizando a VOQ para AML  $49 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $97 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato (pH 7,0) (Figura 15). Como apresentado na Figura 8, maiores correntes dos picos de ambos fármacos foram obtidas com EPC e EDDB-PC. Nenhum pico foi observado para ATN usando ECV e EPNTC, sob condições experimentais idênticas. Não foi observado repetibilidade dos sinais analíticos para ambos os anti-hipertensivos usando o EPC; no entanto, foi observado uma repetibilidade dos sinais de oxidação para AML e ATN (desvio padrão relativo (DPR)  $< 1,0\%$ , para  $N = 6$ ) no EDDB-PC. Este eletrodo mostrou-se superior frente ao EPC e as determinações simultâneas do AML e ATN foram realizados apenas com o EDDB-PC.

**Figura 15** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para AML  $49 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $97 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato (pH 7,0) usando EPC (—), EPNTC (—), ECV (—) e EDDB-PC (—). Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .



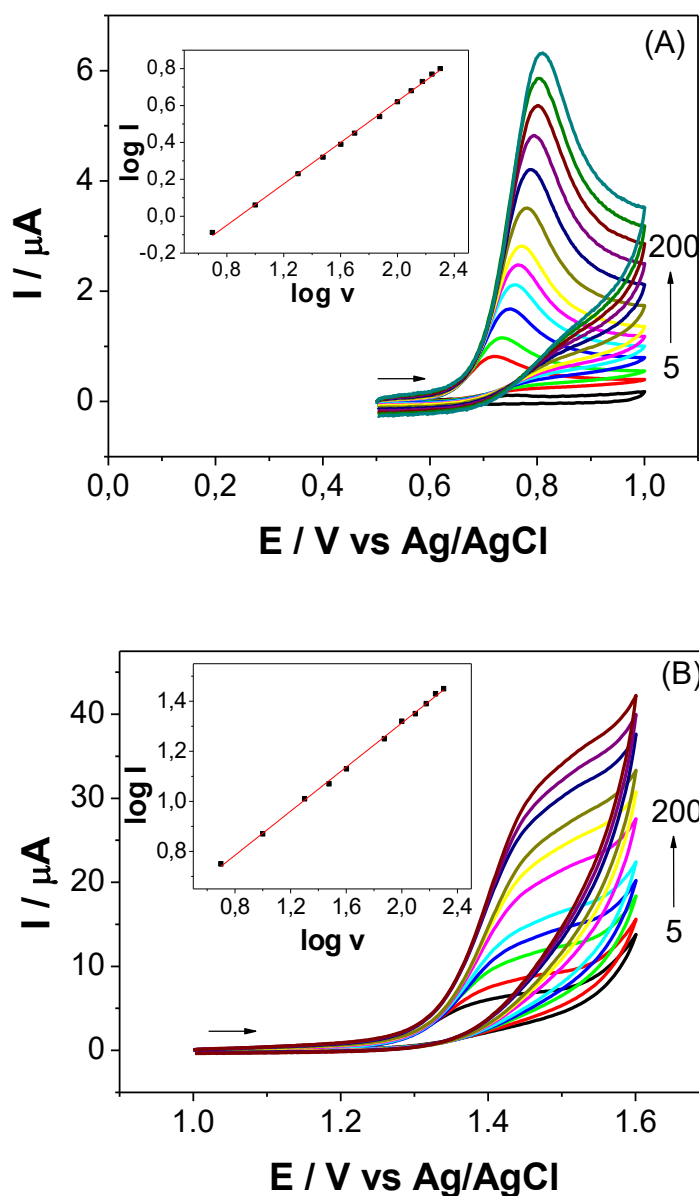
**Fonte:** o próprio autor

#### 4.1.3 Influência da Velocidade de Varredura no Processo de Oxidação do AML e ATN

O estudo da velocidade de varredura foi realizado para obter informações úteis sobre o comportamento do AML e ATN no EDDB-PC. Usando AML  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato (pH 7,0), os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura ( $5\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$ ). Os voltamogramas correspondentes ao AML são mostrados na Figura 16A e ao ATN na Figura 16B. O potencial dos picos para ambos os anti-hipertensivos foram ligeiramente deslocados para valores mais positivos conforme o aumento da velocidade de varredura, uma característica típica de uma reação eletroquímica irreversível (GOSSER, 1993). Pode-se observar também que a intensidade de pico anódico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura para ambos os anti-hipertensivos ( $r = 0,999$  para o AML e  $r = 0,998$  para o ATN), sugerindo que o mecanismo de oxidação destes anti-hipertensivos é difusional (GOSSER, 1993a). Para confirmar esses resultados, pode-se observar nas Figuras 9A e 9B, que o gráfico do  $\log I_{pa}$  vs.  $\log v$  foi linear, com uma inclinação de 0,56 para o AML e

0,44 para o ATN, estes valores estão próximos do estimado pela literatura (0,50) para um processo controlado por difusão (GOSSER, 1993).

**Figura 16** - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) para (A) AML  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) ATN  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes velocidades de varredura, de 5 - 200  $\text{mV s}^{-1}$ . Inserido: dependência linear de  $\log I_{pa}$  com  $\log v$ .



**Fonte:** o próprio autor

#### 4.1.4 Escolha da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea de AML e ATN

Para a construção da curva analítica na determinação simultânea de AML e ATN, o efeito dos parâmetros instrumentais das técnicas de VOQ sobre a intensidade de corrente e potencial de oxidação dos AML e ATN foram

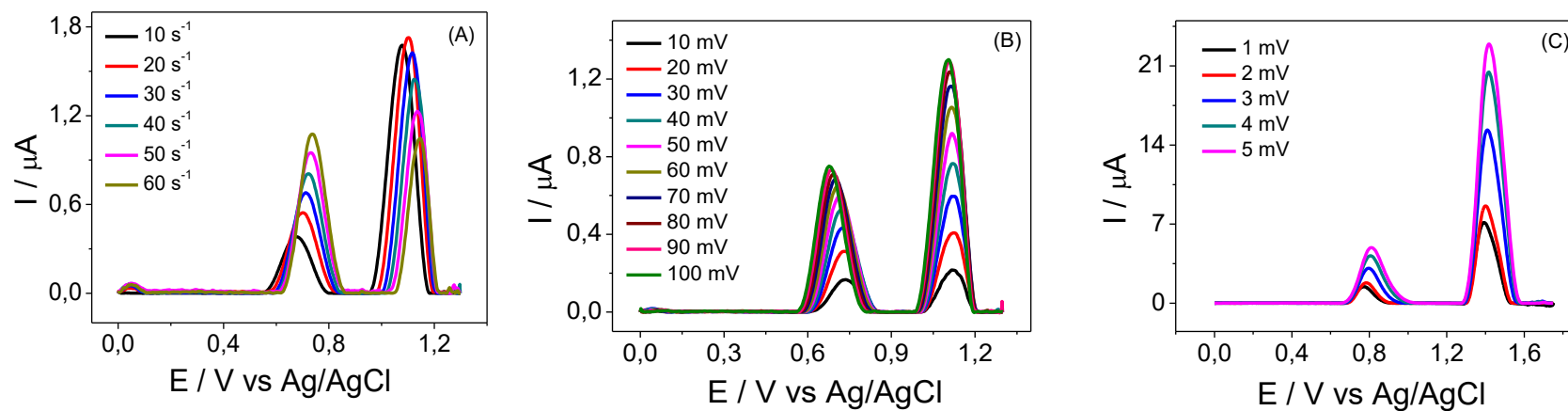
investigados. Esses parâmetros instrumentais são estudados, pois, quando bem empregados, podem melhorar muito a sensibilidade dos analitos. Cabe ressaltar que cada parâmetro foi avaliado individualmente, mantendo os outros dois constantes.

As Figuras 17A–C mostram os voltamogramas de onda quadrada obtidos para 46 e 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e ATN, respectivamente, em solução tampão fosfato (pH 7,0), em função da variação da frequência (Figura 17A), da amplitude (Figura 17B) e do incremento de varredura (Figura 17C). Observa-se que para o AML, com o aumento no valor da frequência ocorre um aumento na intensidade de corrente de pico; para o ATN é possível observar que com o aumento no valor da frequência, ocorreu a diminuição na intensidade de corrente de pico, exceto para o valor de frequência de 20  $\text{s}^{-1}$ . Considerando que o AML apresenta maior aumento de corrente que o ATN, selecionar uma condição instrumental que favoreça um aumento na corrente de pico para o ATN é desejado. Por este motivo, a frequência de trabalho selecionada para o desenvolvimento do trabalho foi a de 20  $\text{s}^{-1}$ , onde obteve-se um voltamograma bem definido com maior intensidade de corrente para o ATN.

Na Figura 17B estão apresentados os voltamogramas obtidos para o AML e ATN em função da variação da amplitude de onda quadrada. É possível observar que para o AML, ocorre um aumento dos valores da intensidade de corrente até o valor da amplitude de 40 mV e para o ATN até um valor de 70 mV. Valores de amplitude maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade dos analitos para o propósito analítico deste trabalho. Sendo assim, como já mencionado, o valor selecionado da amplitude foi de 70 mV com o objetivo de proporcionar melhor sensibilidade para o ATN.

O último parâmetro estudado na VOQ foi o incremento de varredura. Os valores deste parâmetro também estão relacionados com a intensidade do sinal obtido e assim, diretamente relacionado com a sensibilidade do método. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão apresentados na Figura 17C. Observa-se que a variação nos valores do incremento de varredura proporcionou variações nas intensidades de corrente para ambos analitos e que o valor de 3 mV foi selecionado para dar continuidade no trabalho.

**Figura 17** - Influência da variação dos parâmetros da técnica de VOQ no aspecto geral dos voltamogramas do AML  $47 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  empregando o EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0). (A) Variação da frequência da onda quadrada ( $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (B) Variação da amplitude de onda quadrada ( $f = 20 \text{ s}^{-1}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ ). (C) Variação do incremento de varredura ( $a = 70 \text{ mV}$ ,  $f = 20 \text{ s}^{-1}$ ).



Fonte: o próprio autor

A Tabela 1 apresenta o intervalo de estudo e os valores selecionados para cada um dos parâmetros da VOQ, em comparação com os resultados obtidos pela VPD (voltamogramas não apresentados). Essa comparação foi realizada, uma vez que em ambas as técnicas foram observadas uma boa separação dos potenciais de pico, o que permite a determinação simultânea desses anti-hipertensivos. Os parâmetros estudados na VPD foram: amplitude do pulso ( $a$ ), velocidade de varredura ( $v$ ) e tempo de modulação ( $t$ ).

Os parâmetros selecionados foram utilizados para a construção das curvas analíticas para ambos os anti-hipertensivos, usando o EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0). As curvas analíticas foram construídas pelo método de adição de padrão externo. Para isso, adições sucessivas de alíquotas das soluções de trabalho dos anti-hipertensivos, foram transferidas para a célula eletroquímica, onde a intensidade de corrente foi aumentada linearmente e simultaneamente com as suas concentrações. Os resultados do desempenho analítico para ambas as técnicas VPD e VOQ estão reunidos na Tabela 2. Os melhores valores para os parâmetros analíticos, como sensibilidade e linearidade, foram obtidos pela VPD. No entanto, a VOQ apresenta melhor coeficiente de correlação e precisão, portanto, foi a técnica escolhida para a determinação simultânea de AML e ATN. A Figura 18-A mostra os voltamogramas de pulso diferencial e a Figura 18-B mostra os voltamogramas da onda quadrada obtidos para a solução contendo ambos os anti-hipertensivos em diversas concentrações.

**Tabela 1** - Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais para a determinação simultânea de AML e ATN no EDDB-PC empregando-se VPD e VOQ.

<b>Técnica</b>	<b>Parâmetros instrumentais</b>	<b>Intervalo de estudo</b>	<b>Valores selecionados</b>
<b>VPD</b>	$a$ (mV)	10 – 100	75
	$v$ (mV s <sup>-1</sup> )	3 – 7,5	5
	$t$ (ms)	2 – 7	3
<b>VOQ</b>	$f$ (s <sup>-1</sup> )	10 – 60	20
	$a$ (mV)	10 – 100	70
	$\Delta E_s$ (mV)	1 – 5	3

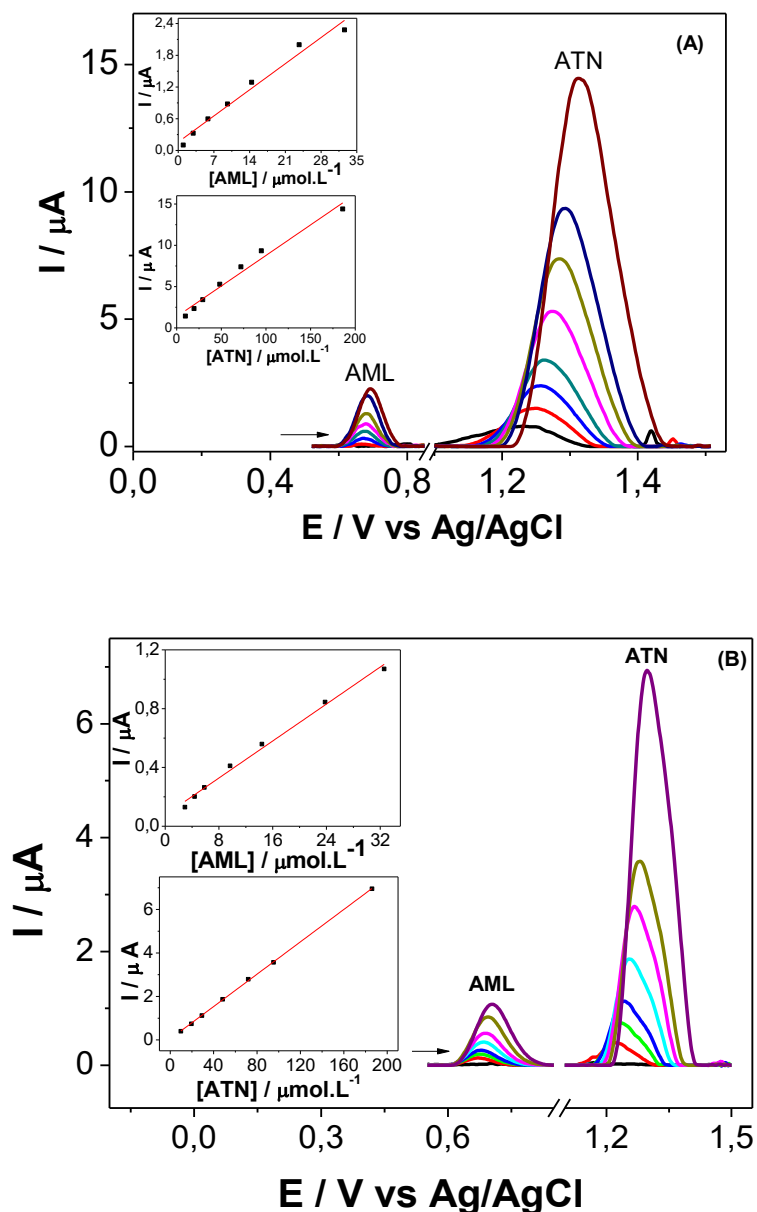
**Fonte:** o próprio autor

**Tabela 2** - Parâmetros analíticos obtidos na determinação voltamétrica de AML e ATN por VPD e VOQ em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando um EDDB-PC.

	AML		ATN	
	VOQ	VPD	VOQ	VPD
<b>Potencial de pico (V)</b>	0,68	0,68	1,24	1,27
<b>Intervalo linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	2,9 – 33	0,98 – 33	9,8 – 190	1,4 – 14
<b>Coeficiente angular (<math>\mu\text{A mol L}^{-1}</math>)</b>	$3,1 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$3,72 \times 10^4$	$7,40 \times 10^4$
<b>Coeficiente linear (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	0,08	0,16	0,05	1,37
<b>Coeficiente de correlação (<i>r</i>)</b>	0,992	0,973	0,999	0,974
<b>Limite de detecção (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,17	0,16	0,22	0,19
<b>Repetitividade (DPR %)</b>	2,95	5,71	1,02	4,14
<b>Precisão intermediária (DPR %)</b>	4,21	9,35	3,62	8,70

Fonte: o próprio autor

**Figura 18** - Voltamogramas de (A) pulso diferencial e de (B) onda quadrada em EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) na faixa de concentração para AML 2,9-33  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para ATN 9,8-190  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . *Inserido:* curvas analíticas de AML e ATN para o processo de oxidação. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ,  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $t = 3 \text{ ms}$ , e da VOQ:  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 3 \text{ mV}$ .

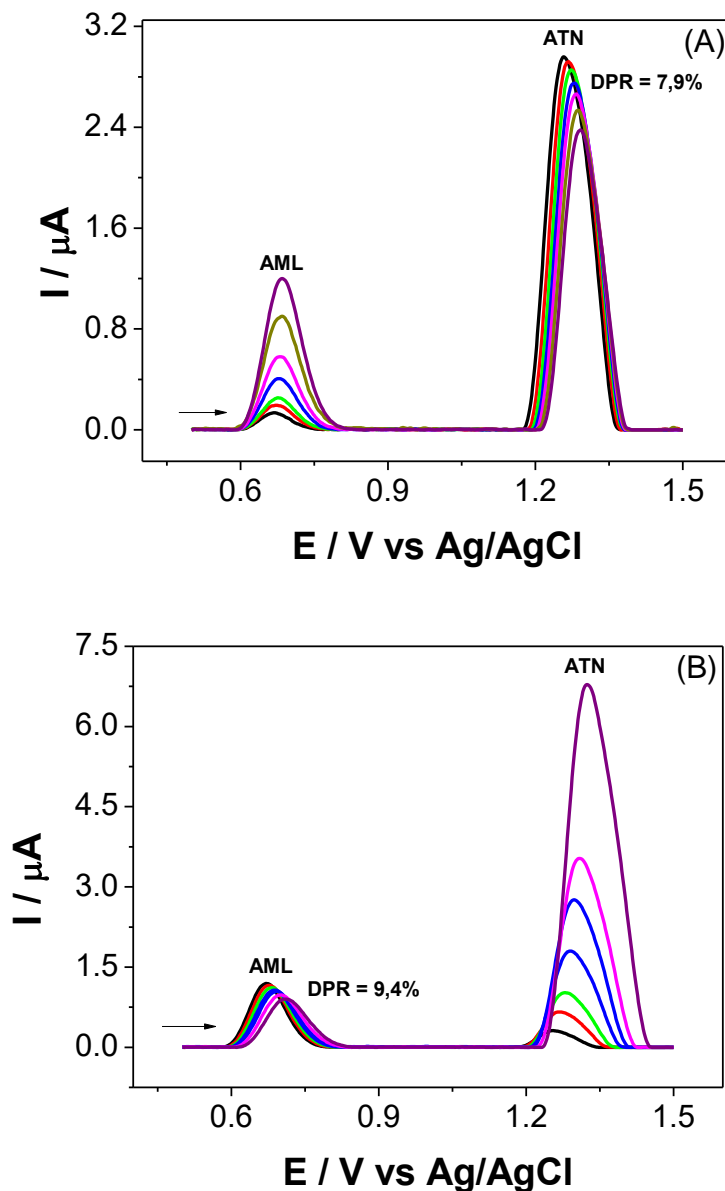


**Fonte:** o próprio autor

A repetitividade foi determinada por medidas sucessivas ( $N = 10$ ) de AML  $9,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A precisão intermediária foi avaliada medindo-se a corrente do pico para soluções recém preparadas por um período de 5 dias. Como pode ser visto na Tabela 2, os baixos valores de DPR indicam que o método proposto é preciso.

Em seguida, a interferência de cada analito na determinação simultânea de seu par foi avaliada (Figura 19A e 19B) empregando o EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0). Para isso, uma curva analítica individual de um analito foi construída mantendo a concentração do outro analito constante.

**Figura 19** - Voltamogramas de onda quadrada com EDDB-PC em solução tampão fosfato (pH 7,0) para (A) AML 2,9 - 34  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para e concentração fixa de ATN 71  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) concentração fixa para AML 24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para ATN 9,6 - 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



Fonte: o próprio autor

Sendo assim, uma curva analítica individual para o AML foi construída na faixa de concentração de 2,9 a 34  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de 71  $\mu\text{mol L}^{-1}$

do ATN foi mantida fixa (a corrente do pico de oxidação para o ATN permaneceu constante - DPR = 7,9%). De acordo com a análise, a equação da reta obtida para o AML foi  $I_{\text{AML}} / \mu\text{A} = 0,060 + 3,5 \cdot 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,993$ ). Já para a determinação do ATN na faixa de concentração de 9,6 a 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a determinação foi realizada em soluções contendo AML na concentração fixa de 24  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (a corrente de oxidação do AML permaneceu constante - DPR = 9,4%), obtendo uma equação da reta de  $I_{\text{ATN}} / \mu\text{A} = 0,017 + 3,6 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,998$ ). Dessa maneira, quando comparado os valores de coeficiente angular obtidos na curva analítica simultânea, com os obtidos na curva analítica da seletividade, estes são muito próximos, isto, somados aos baixos valores de DPR, obtidos na curva de seletividade, pode-se concluir que a mudança da concentração de um fármaco estudado não teve influência significativa na determinação do outro. Em vista disto, os processos de oxidação de AML e ATN no EDDB-PC são considerados independentes.

#### 4.1.5 Comparação com Métodos Analíticos Descritos na Literatura

Uma comparação entre os parâmetros analíticos do método proposto e de alguns métodos anteriores relatados na literatura para a determinação simultânea de AML e ATN são apresentados na Tabela 3. A partir desses dados, pode-se observar que os parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica simultânea de AML e ATN são satisfatórios. Além disso, a preparação das amostras para a análise voltamétrica é simples, não demandando de filtrações ou outros tratamentos. O procedimento não envolve o uso de produtos químicos perigosos para o analista e para o ambiente. Devido às vantagens citadas, este método pode ser utilizado para a determinação simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas.

**Tabela 3** - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos deste trabalho com diferentes técnicas analíticas para a determinação de AML e ATN.

<b>Analito</b>	<b>Técnica</b>	<b>Intervalo linear de concentração (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referências</b>
<b>AML</b>	CLAE - UV	18 – 880	3,5	(ARYAL; ŠKALKO-BASNET, 2008)
	UV	98 – 150	8,9	(PAWAR et al., 2013)
	UV	7,1 – 35	0,09	(RATHEE et al., 2010)
	UV	7,1 – 56	0,51	(BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013)
	VOQ	2,9 – 33	0,17	Este trabalho
<b>ATN</b>	CLAE - UV	38 – 1900	3,8	(ARYAL; ŠKALKO-BASNET, 2008)
	UV	1500 – 2300	20	(PAWAR et al., 2013)
	UV	15 – 90	0,31	(RATHEE et al., 2010)

---

UV	75 – 750	5,7	(BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2013)
VOQ	9,8 – 190	0,22	Este trabalho

---

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.1.6 Aplicação do Método Voltamétrico Desenvolvido na Determinação Simultânea de AML e ATN em Formulações Farmacêuticas Combinadas

Previamente à análise das amostras selecionadas, a seletividade do método proposto foi avaliada pela adição de possíveis interferentes (presentes nas formulações farmacêuticas selecionadas), tais como amido, povidona, celulose microcristalina, dióxido de titânio, carbonato de magnésio e estearato de magnésio. Para isso, uma solução padrão contendo AML e ATN, nas proporções de concentrações (solução padrão:composto interferente) de 1:1 e 1:10 (m/m) foram analisadas. Nenhum dos excipientes avaliados apresentou eletroatividade no EDDB-PC na janela de potencial de trabalho, mesmo em concentrações 10 vezes maiores que a dos anti-hipertensivos. Além disso, as correntes de pico obtidas para as soluções dos anti-hipertensivos contendo os possíveis interferentes foram comparadas com as obtidas na ausência de cada interferente. A análise das respostas obtidas permitiu concluir que esses compostos não interferem significativamente, apresentando DPR menores que 5%, na determinação de AML e ATN nas condições de trabalho usadas, revelando a seletividade do método para aplicação em formulação farmacêutica contendo AML e ATN.

O método aqui proposto foi empregado para analisar duas amostras farmacêuticas comerciais diferentes (A e B) contendo AML e ATN em formulações combinadas. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos das análises para as amostras empregando o método proposto em comparação ao método comparativo (CLAE). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores encontrados para os teores de AML e ATN nas amostras farmacêuticas comerciais utilizando o método proposto e o comparativo. De acordo com o teste  $F$  (ANDERSON, 1987), a um nível de confiança de 95%, os dois métodos fornecem um nível de precisão equivalente. Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram inferiores ao valor de  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{critico}} = 19,0$ ). Além disso, o teste  $t$  pareado (ANDERSON, 1987) foi aplicado e os resultados obtidos foram estatisticamente iguais, pois, os valores de  $t$  calculados foram menores que o valor tabelado ( $t_{\text{AML}} = 2,00$ ,  $t_{\text{ATN}} = 3,25$  e  $t_{\text{crit}} = 12,7$  a um nível de confiança de 95%), indicando que não há diferenças entre o método proposto e o método comparativo.

**Tabela 4** - Resultados obtidos na determinação simultânea de AML e ATN em formulações farmacêuticas combinadas por VOQ empregando o EDDB-PC e pelo método comparativo (CLAE).

Amostras	Analito	Quantidade (mg por comprimido) <sup>a</sup>			E (%) <sup>b</sup>	F <sub>calc</sub> <sup>c</sup>
		Rótulo	CLAE	VOQ		
A	AML	6,9	6,9 ± 0,2	6,8 ± 0,2	-1,4	1,0
	ATN	25	24,5 ± 0,7	25,4 ± 0,3	3,7	5,4
B	AML	6,9	6,8 ± 0,1	7,1 ± 0,3	4,4	9,0
	ATN	50	50,7 ± 0,6	49,0 ± 0,3	-3,4	4,0

<sup>a</sup>Média de 3 medidas; <sup>b</sup>100 × (VOQ - CLAE/CLAE); <sup>c</sup>Valor  $F_{\text{crítico}} = 19$  (nível de confiança de 95%).

**Fonte:** o próprio autor

O estudo de recuperação foi realizado por adição de volumes conhecidos de soluções padrão de AML e ATN à uma determinada amostra, seguida da análise usando VOQ. Foram obtidas boas recuperações para análise dos comprimidos comerciais, os valores obtidos nas recuperações variaram de 93,7 a 102 e 95,3 a 104% para AML e ATN, respectivamente; claramente o método proposto não sofre de quaisquer efeitos significativos da interferência da matriz.

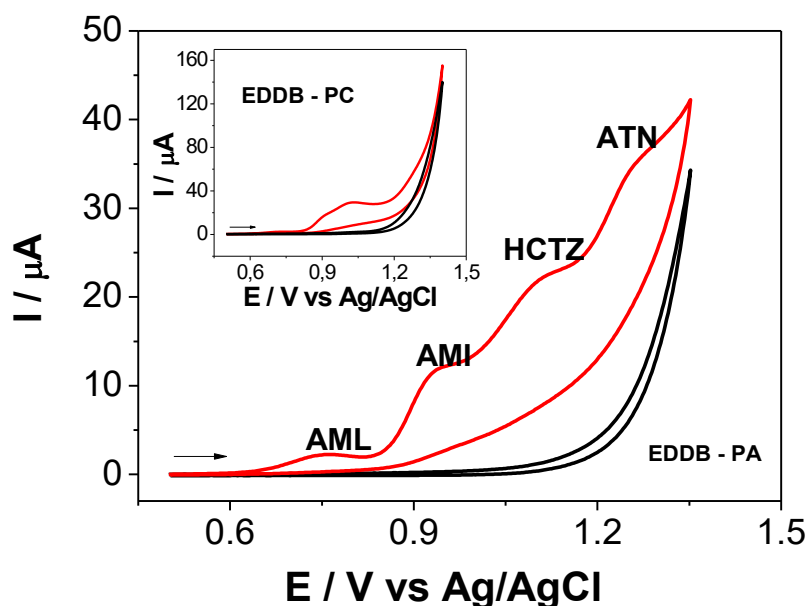
No início deste estudo, foi possível observar que a determinação simultânea de AML e ATN usando EDDB-PC apresentou uma grande separação entre os valores dos potenciais de oxidação ( $\Delta E_{pa}$ ) dos dois fármacos, cerca de 0,59 V. Isto indicou a viabilidade da análise simultânea de outros fármacos, que apresentassem potenciais distintos em relação ao AML e ATN, e que pudessem se oxidar dentro da janela de potencial do eletrodo de trabalho. Com isso, considerou-se a possibilidade de determinação simultânea de quatro anti-hipertensivos AML, AMI, HCTZ e ATN usando o EDDB. Deve-se enfatizar que, de acordo com pesquisa na literatura, não há ainda descrito um método eletroquímico para a determinação simultânea de uma mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. Portanto, pela primeira vez, foi investigado o comportamento voltamétrico dessa mistura quaternária, bem como a sua determinação em amostras reais.

## 4.2 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML, AMI, HCTZ E ATN

### 4.2.1 Estudo do Comportamento Eletroquímico do AML, AMI, HCTZ e ATN sobre o EDDB

No sentido de verificar a presença de processos de oxidação e redução dos quatro anti-hipertensivos, foram realizados experimentos preliminares de VC sobre a superfície do EDDB em solução tampão amônio (pH 9,0). A Figura 20 mostra voltamogramas cíclicos obtidos para a mistura quaternária destes anti-hipertensivos empregando o EDDB pré-tratado anódica e catodicamente. Como pode ser visto, quatro picos de oxidação distintos são encontrados utilizando um EDDB pré-tratado anodicamente (EDDB-PA), correspondente à oxidação de AML em 0,76 V, AMI em 0,93 V, HCTZ em 1,10 V e ATN em 1,26 V. Quando o EDDB foi pré-tratado catodicamente (inserido na Figura 20), pode-se notar uma sobreposição dos picos de oxidação, o que dificulta a determinação simultânea destes quatro anti-hipertensivos. Devido à separação entre os picos de oxidação dos anti-hipertensivos no EDDB-PA, este pré-tratamento foi escolhido para dar continuidade nos experimentos.

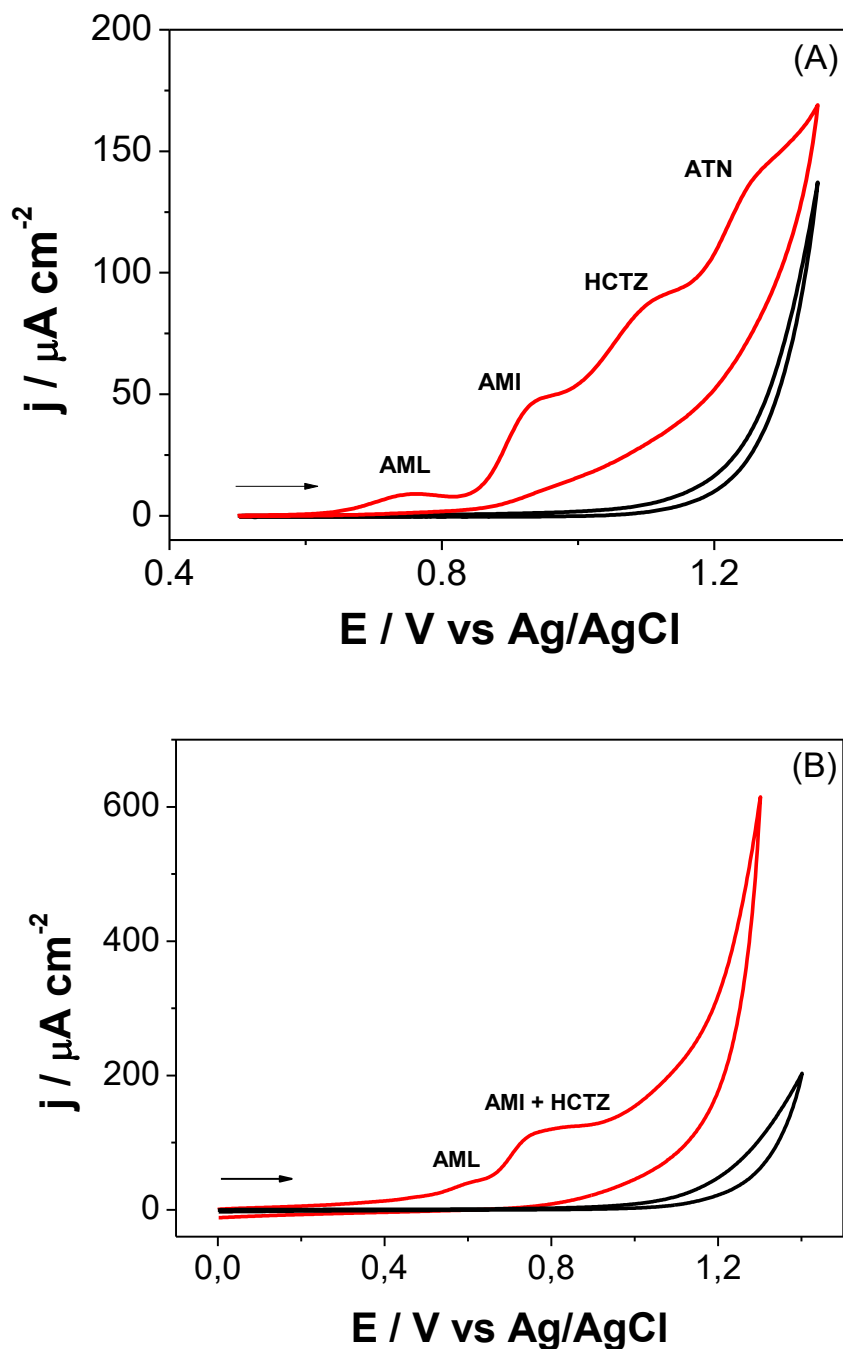
**Figura 20** - Voltamograma cíclico correspondente ao EDDB-PA na solução tampão amônio (pH 9,0), a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Solução branco (—) e mistura de AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  (—). *Inserido*: Voltamogramas cíclicos correspondentes obtidos empregando o EDDB-PC.



**Fonte:** o próprio autor

Em seguida, o desempenho do EDDB-PA que foi empregado como eletrodo de trabalho para determinar a mistura quaternária de anti-hipertensivos, foi comparado com o ECV, conforme apresentado na Figura 21. Utilizou a VC para AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0). Os resultados obtidos mostraram que usando o EDDB-PA, quatro picos de oxidação bem definidos puderam ser observados (Figura 21A). Já, usando o ECV como eletrodo de trabalho (Figura 21B), apenas dois picos foram observados, o primeiro, em torno de 0,60 V, correspondente à oxidação de AML e o segundo, em torno de 0,75 V, correspondendo à sobreposição dos picos de oxidação de AMI e HCTZ. Nenhum pico foi observado para a oxidação do ATN no ECV, nestas condições. Assim, levando em consideração a separação dos quatro fármacos e boa definição dos picos, os estudos posteriores foram realizados apenas com o EDDB-PA.

**Figura 21** - Voltamogramas cíclicos obtidos para AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) empregando (A) EDDB-PA e (B) ECV;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



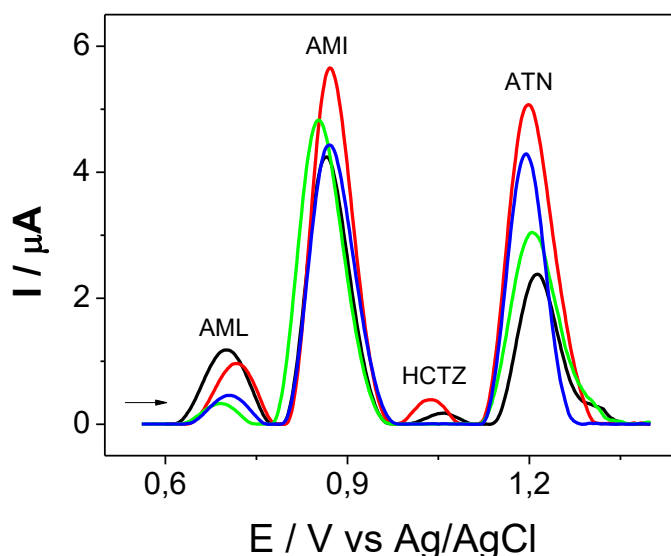
Fonte: o próprio autor

#### 4.2.2 Efeito do pH e Eletrólito Suporte

A influência do valor de pH (2,0 a 11,0) nas correntes de picos para AML  $24,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $137 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $182 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $91,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  no

EDDB-PA foi avaliada usando a solução tampão BR. Os melhores resultados obtidos foram para o pH 9,0 (melhor  $\Delta E_{pa}$  e repetibilidade dos valores das correntes), portanto, este pH foi selecionado. Em seguida, a influência de diferentes eletrólitos suporte com pH 9,0 foram avaliados. Além da solução tampão BR, avaliou-se também as soluções tampão amônio, carbonato e TRIS na oxidação eletroquímica dos quatro anti-hipertensivos no EDDB-PA (Figura 22). Para estas condições, foi observado um pico de oxidação para a HCTZ apenas nas soluções tampão BR e amônio. Ademais, usando a solução tampão amônio, os valores da corrente dos picos para AMI, HCTZ e ATN foram maiores que os observados usando soluções tampão BR, carbonato e TRIS. Assim, a solução tampão amônio (pH 9,0) foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN usando um EDDB-PA.

**Figura 22** - Voltamogramas de onda quadrada de AML  $24,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $137 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $182 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $91,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando um EDDB-PA empregando como eletrólito suporte a pH 9,0 as soluções tampão amônio (—), BR (—), carbonato (—) e TRIS (—). Condições da VOQ:  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .



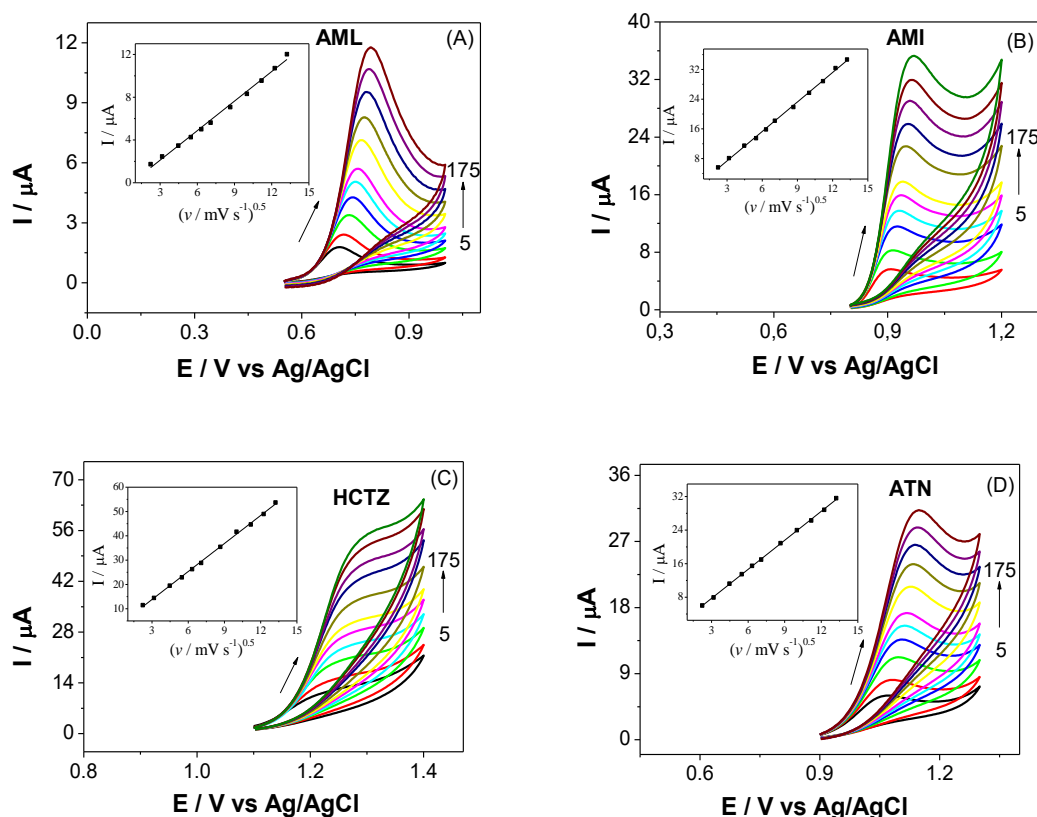
**Fonte:** o próprio autor

#### 4.2.3 Influência da Velocidade de Varredura no Processo Oxidação do AML, AMI, HCTZ e ATN

O efeito da velocidade de varredura na resposta voltamétrica do EDDB-PA foi explorado no intervalo de 5 a  $175 \text{ mV s}^{-1}$  para concentrações de AML 98

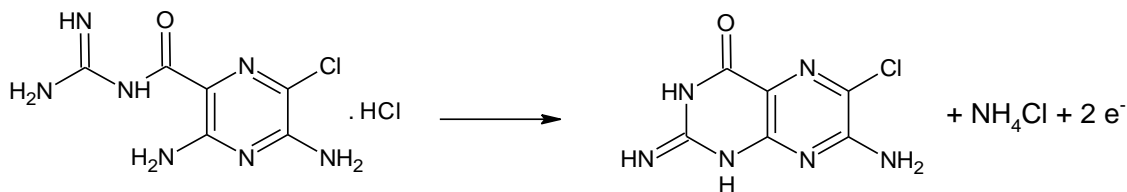
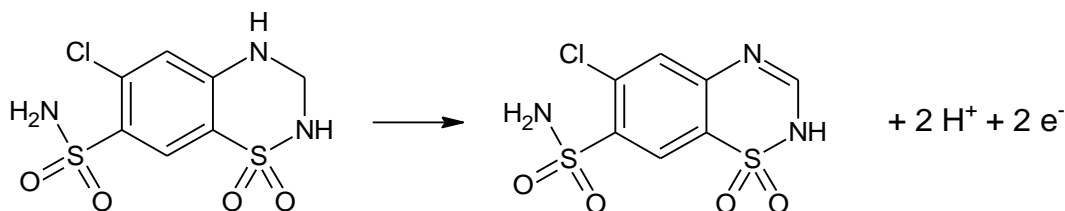
$\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $294 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $392 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $196 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) (Figura 23 A-D). Como pode ser visto, com o aumento da velocidade de varredura, ocorreu um deslocamento dos picos para valores de potenciais mais positivos, acompanhada por um aumento dos valores das correntes máximas, para todos os anti-hipertensivos. Não foram observados picos de redução na varredura reversa, caracterizando processos irreversíveis para todos os fármacos anti-hipertensivos (GREEF et al., 1985). Estes comportamentos também foram observados em estudos anteriores com diferentes valores de pH (GOYAL et al., 2006; SARTORI et al., 2010; SANTOS et al., 2013; MORAES et al., 2016; SALAMANCA-NETO et al., 2016). Os valores obtidos da inclinação a partir das dependências lineares de  $\log I_{pa}$  e  $\log v$  foram 0,54 ( $r = 0,998$ ) para AML, 0,51 ( $r = 0,999$ ) para AMI, 0,47 ( $r = 0,999$ ) para HCTZ e 0,44 ( $r = 0,996$ ) para ATN. Esses valores (próximo de 0,50) indicam que os mecanismos das reações de oxidação de todos os medicamentos anti-hipertensivos estudados na superfície EDDB-PA são controladas por difusão (GOSSER, 1993). Além disso, as dependências lineares de  $I_{pa}$  e a raiz quadrada da velocidade de varredura (Inserido na Figura 16) confirmam que as reações são controladas majoritariamente pela difusão dos analitos para a superfície do EDDB-PA (GOSSER, 1993a; KISSINGER; HEINEMAN, 1996).

**Figura 23** - Voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura (5 - 175  $\text{mV s}^{-1}$ ) obtidos para (A) AML 98,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) AMI 294  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (C) HCTZ 392  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (D) ATN 196  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) usando um EDDB-PA. *Inserido:* dependência linear da  $I_{pa}$  e raiz quadrada da velocidade de varredura.



Fonte: o próprio autor

A Equação 1 foi utilizada para estimar o valor de  $n$  da oxidação de AML, AMI, HCTZ e ATN em solução tampão amônio (pH 9,0) usando um EDDB-PA. Os valores obtidos de  $E_p - E_p/2$  para cada anti-hipertensivo foram AML 48 mV, para AMI 47 mV, para HCTZ 50 mV, e para ATN 51 mV. Assumindo o valor de  $\alpha$  como 0,5 (empregado para processos totalmente irreversíveis (GOSSER, 1993)), os valores de  $n$  envolvidos na eletro-oxidação de todos os anti-hipertensivos em EDDB-PA são próximos de 2 (1,97, 2,03, 1,92 e 1,88, respectivamente). De acordo com a literatura, a oxidação da AML (Figura 11) ocorre no anel de 1,4-diidropiridina (GOYAL; BISHNOI, 2010), a oxidação do AMI (Figura 24) se dá no grupo da amina formando um anel heterocíclico de seis átomos (DESAI; SRIVASTAVA, 2012), oxidação de HCTZ para a clorotiazida (Figura 25) (RAZAK, 2004) e a oxidação do ATN (Figura 12) ocorre no grupo alcoólico secundário (GOYAL; SINGH, 2006).

**Figura 24** - Reação de oxidação da amilorida (AMI).**Figura 25** - Reação de oxidação da hidroclorotiazida (HCTZ).

#### 4.2.4 Seleção da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea da Mistura Quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN no EDDB-PA

Apenas a VOQ foi aplicada para a determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. A VPD não foi testada neste trabalho, pois, na determinação da mistura binária de AML e ATN esta técnica apresentou menor coeficiente de correlação e precisão quando comparado com a VOQ. Deste modo, a influência dos valores dos parâmetros operacionais associados apenas a VOQ foi investigada usando o EDDB-PA na mistura quaternária. A concentração empregada de cada fármaco foi AML 24,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 136  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 272  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 90,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em solução tampão amônio (pH 9,0).

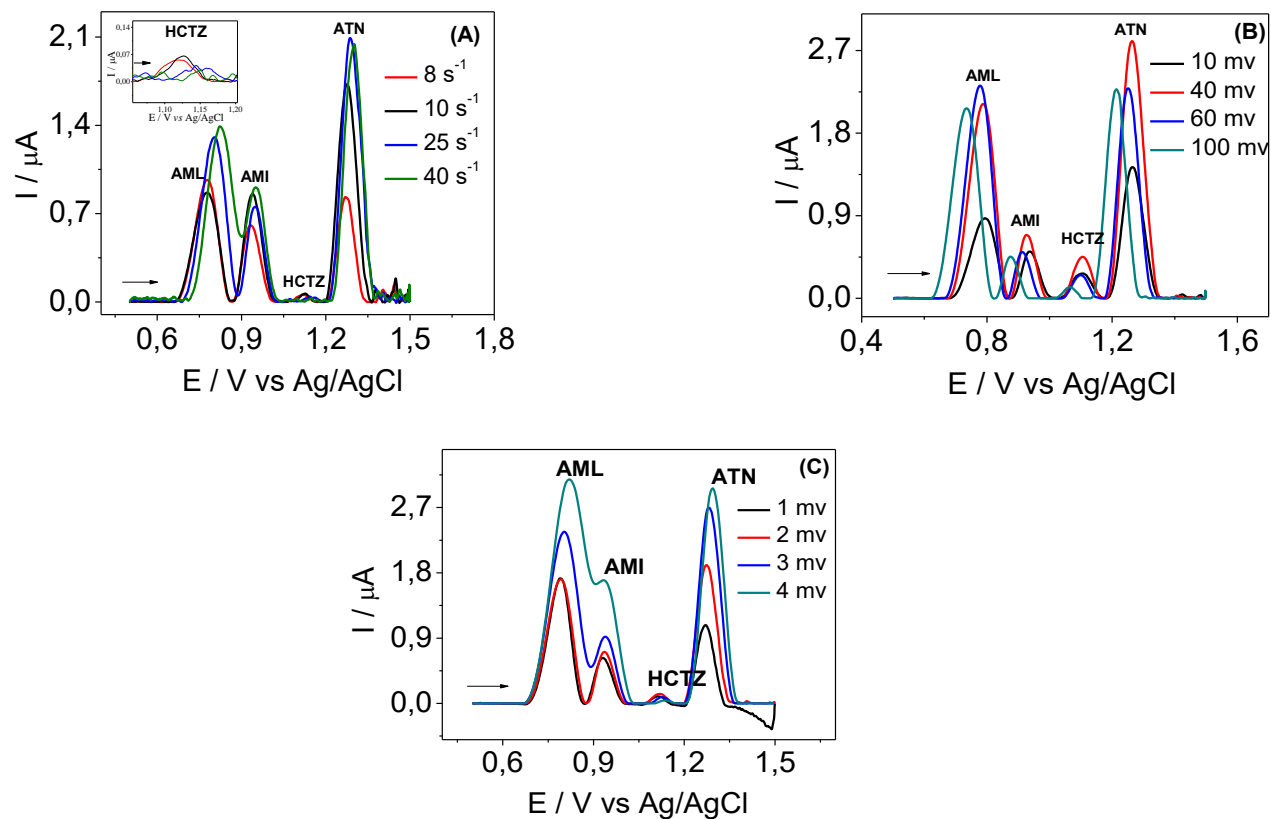
A variação da frequência (Figura 26A), da amplitude (Figura 26B) e do incremento de varredura (Figura 26C) foi avaliada individualmente mantendo os outros dois constantes. De um modo geral, quando os valores desses três parâmetros são alterados é possível observar que ocorre variações nas intensidades dos sinais e, também, deslocamento dos potenciais de oxidação. Dentre os quatro anti-hipertensivos testados é possível observar que a HCTZ, mesmo em maior concentração que os demais, é o anti-hipertensivo que apresentou menor intensidade de corrente. Sendo assim, os parâmetros foram avaliados no intuito de proporcionar maiores intensidades de corrente para a

HCTZ. Na Figura 26A observa-se que o valor da frequência de  $10 \text{ s}^{-1}$  foi o que apresentou melhor resposta para a maioria dos anti-hipertensivos, apenas o AML apresentou uma pequena diminuição na intensidade de corrente, é possível observar também, que com o aumento nos valores da frequência, ocorre um leve deslocamento nos valores dos potenciais de oxidação para valores mais positivos. Por estes motivos, a frequência de trabalho selecionada para o desenvolvimento do trabalho foi de  $10 \text{ s}^{-1}$ , onde obteve-se um voltamograma com maior intensidade de corrente para a HCTZ.

Na Figura 26B estão apresentados os voltamogramas obtidos para o AML, AMI, HCTZ e ATN em função da variação da amplitude de onda quadrada. É possível observar que para todos os anti-hipertensivos, ocorre um aumento dos valores da intensidade de corrente até o valor da amplitude de 40 mV. Valores de amplitude maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade de medida dos sinais analíticos dos analitos para o propósito deste trabalho. Sendo assim, como já mencionado, o valor selecionado da amplitude foi de 40 mV com o objetivo de proporcionar melhor sensibilidade para a HCTZ.

O último parâmetro estudado na VOQ foi o incremento de varredura. Os valores deste parâmetro também estão relacionados com a intensidade do sinal obtido e, assim, diretamente relacionado com a sensibilidade do método. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão apresentados na Figura 26C. Observa-se que a variação nos valores do incremento de varredura proporcionou variações nas intensidades de corrente e nos potenciais de oxidação para valores mais positivos. Também é possível observar, que ocorre o alargamento dos picos, o que geralmente não é desejado, pois, principalmente em uma determinação de misturas de analitos, o processo de oxidação pode não ter terminado antes de iniciar o outro, o que pode comprometer a seletividade. Com isso, o valor de 2 mV foi selecionado para dar continuidade no trabalho. Os respectivos intervalos dos parâmetros e os parâmetros selecionados estão descritos na Tabela 5.

**Figura 26** - Influência da variação dos parâmetros da técnica de voltmetria de onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas do AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão amônio (pH 9,0) empregando EDDB-PA. (A) Variação da frequência da onda quadrada ( $a = 70 \text{ mV}$ ,  $\Delta\text{ES} = 2 \text{ mV}$ ). (B) Variação da amplitude de onda quadrada ( $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta\text{ES} = 2 \text{ mV}$ ). (C) Variação do incremento de varredura ( $a = 40 \text{ mV}$ ,  $f = 10 \text{ s}^{-1}$ ).



Fonte: o próprio autor

**Tabela 5** - Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais da técnica de VOQ para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN no EDDB-PA.

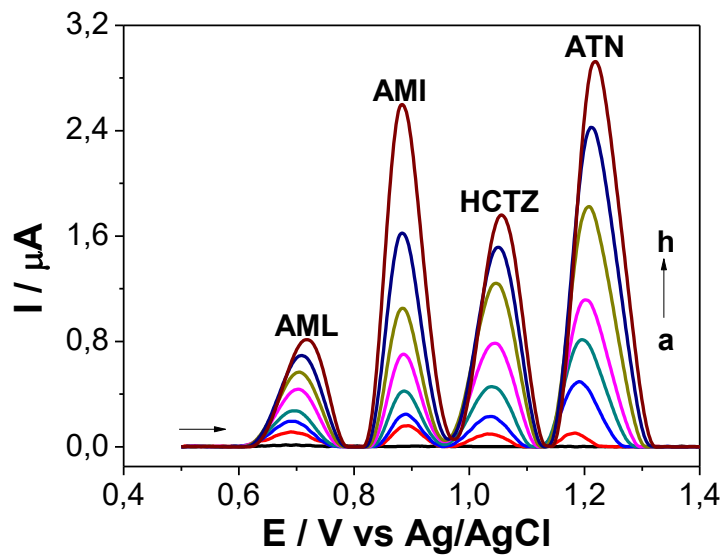
<b>Parâmetros instrumentais</b>	<b>Intervalo de estudo</b>	<b>Valores selecionados</b>
$f / s^{-1}$	8 – 40	10
$a / mV$	10 – 100	40
$\Delta E_s / mV$	1 – 4	2

**Fonte:** o próprio autor

Após a escolha dos melhores parâmetros da VOQ, as curvas analíticas foram construídas pela adição de padrão externo dos anti-hipertensivos na célula eletroquímica contendo uma solução tampão amônio (pH 9,0), empregando como eletrodo de trabalho um EDDB-PA. A Figura 27 exibe os voltamogramas da VOQ registrados para a solução contendo faixas de concentrações para AML 0,9 - 31  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para AMI 8,7 - 125  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para HCTZ 29 - 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para ATN e 11 - 91  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os parâmetros analíticos obtidos para esta determinação da mistura quaternária estão resumidos na Tabela 6. A linearidade obtida para cada anti-hipertensivo é um parâmetro importante para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN, pois permite a aplicação do método em todas as dosagens comerciais de qualquer combinação destes anti-hipertensivos.

As correntes máximas de oxidação de AML 9,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 38,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 115  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 39,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram avaliadas em termos de repetitividade. Para a repetitividade, a magnitude das correntes dos picos de oxidação foi avaliada por meio de dez medidas sucessivas que foram realizadas no mesmo dia, e para a precisão intermediária, a magnitude das correntes dos picos de oxidação foram avaliadas ao longo de cinco dias diferentes. Os resultados estão resumidos na Tabela 6.

**Figura 27** - Voltamogramas de onda quadrada empregando um EDDB-PA de (a) solução tampão amônio (pH 9,0) e (b - h) AML 0,9 - 31  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI 8,7 - 125  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ 29 - 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN 11 - 91  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 10 \text{ Hz}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .



Fonte: o próprio autor

**Tabela 6** - Parâmetros analíticos obtidos na determinação voltamétrica simultânea da mistura de AML, AMI, HCTZ e ATN em solução tampão amônio (pH 9,0) por VOQ empregando um EDDB-PA.

Parâmetros	Anti-hipertensivos			
	AML	AMI	HCTZ	ATN
Potencial de pico (V)	0,68	0,89	1,04	1,21
Intervalo linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,90 – 31	8,7 – 125	29 – 260	11 – 91
Coeficiente angular ( $\mu\text{A L mol}^{-1}$ )	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$0,75 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
Coeficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,16	-0,72	-0,11	-0,27
Coeficiente de correlação (r)	0,951	0,997	0,992	0,999
Limite de detecção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,30	0,09	0,08	0,06
Repetitividade (DPR %)	3,52	0,89	0,91	2,30
Precisão intermediária (DPR %)	5,97	4,29	3,11	5,08

Fonte: o próprio autor

Para avaliar a possível interferência entre os anti-hipertensivos, o método proposto foi empregado para a determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. Para isso, uma série de medidas na VOQ foram registradas (Tabela 7), mantendo a concentração de três componentes constantes e variando a concentração de um deles. No primeiro caso, construiu uma curva de calibração do AML na presença de concentrações fixas de 55,3, 114 e 58,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AMI, HCTZ e ATN, respectivamente. A corrente do pico do AML aumentou proporcionalmente ao intervalo de concentração de 0,9 a 32  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , cuja equação de regressão correspondente é  $I_{\text{AML}}/\mu\text{A} = 0,067 + 2,2 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,982$ ), onde  $I_{\text{AML}}$  é a corrente de pico anódico para AML. Logo depois, as concentrações de AML, HCTZ e ATN foram fixadas em 9,43, 114 e 58,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, e a concentração de AMI variou no intervalo de 8,53 a 131  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A equação correspondente é  $I_{\text{AMI}}/\mu\text{A} = -0,193 + 2,3 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,998$ ). Em seguida, a concentração de HCTZ foi variada no intervalo de concentração de 28,8 a 271  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução contendo concentrações fixas de 9,43, 55,3 e 58,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AML, AMI e ATN, respectivamente. A equação obtida é  $I_{\text{HCTZ}}/\mu\text{A} = -0,471 + 1,1 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,991$ ). Por fim, a concentração do ATN foi aumentada linearmente na presença de concentrações fixas de AML 9,43  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , de AMI 55,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de HCTZ 114  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A corrente aumentou proporcionalmente no intervalo de concentração de 11,5 a 97,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , cuja equação de regressão correspondente é  $I_{\text{ATN}}/\mu\text{A} = -0,722 + 4,1 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,995$ ). Os picos de oxidação para as concentrações fixas dos anti-hipertensivos permaneceram constantes em termos de corrente e potencial, com o desvio padrão relativo (DPR) das magnitudes inferiores a 6,3%. Assim, a determinação de um anti-hipertensivo não sofre interferência da presença dos outros e seus processos oxidativos no EDDB-PA são considerados independentes.

**Tabela 7** – Avaliação da interferência entre os picos de oxidação dos anti-hipertensivos na determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. Uma série de medidas na VOQ foram registradas mantendo a concentração de três componentes constantes e variando a concentração de um deles.

Anti-hipertensivos	Concentrações fixas ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Intervalo de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Equação de regressão correspondente
AML	–	0,9 – 32	$I_{\text{AML}/\mu\text{A}} = 0,067 + 2,2 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$ ( $r = 0,982$ )
AMI	55,3	–	
HCTZ	114	–	
ATN	58,5	–	
AML	9,43	–	$I_{\text{AMI}/\mu\text{A}} = -0,193 + 2,3 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$ ( $r = 0,998$ )
AMI	–	8,53 – 131	
HCTZ	114	–	
ATN	58,5	–	
AML	9,43	–	$I_{\text{HCTZ}/\mu\text{A}} = -0,471 + 1,1 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$ ( $r = 0,991$ )
AMI	55,3	–	
HCTZ	–	28,8 – 271	
ATN	58,5	–	
AML	9,43	–	$I_{\text{ATN}/\mu\text{A}} = -0,722 + 4,1 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})]$ ( $r = 0,995$ )
AMI	55,3	–	
HCTZ	114	–	
ATN	–	11,5 – 97,0	

Fonte: o próprio autor

#### 4.2.5 Comparação com outros Métodos Analíticos Descritos na Literatura

A Tabela 8 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos pelo presente método com os obtidos por métodos de determinação simultânea empregando espectrofotometria e CLAE, já relatados anteriormente na literatura (FERRARO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2004; ELSHANAWANE; MOSTAFA; ELGAWISH, 2009; PACHAURI et al., 2010; PHANI R S CH et al., 2013; VISHNUVARDHAN et al., 2014). A partir desses dados, pode-se observar que os parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN aqui propostos são mais vantajosos do que aqueles obtidos para outros métodos. A linearidade obtida para cada anti-hipertensivo é adequada para a determinação simultânea da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN em todas as dosagens comerciais de qualquer combinação destes anti-hipertensivos. Além disso, para essa metodologia não é necessário aplicações de técnicas quimiométricas (FERRARO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2004), como descrito em Ferraro colab., 2004, porque estes anti-hipertensivos possuem potenciais de oxidação distintos com uma suficiente separação de potencial entre os picos. Ademais, considerando as vantagens dos métodos voltamétricos como preparação mínima da amostra, não demandando filtrações ou outros tratamentos, o uso mínimo de reagentes orgânicos que são tóxicos, a metodologia aqui proposta, usando um EDDB-PA com VOQ, pode ser uma alternativa a esses outros métodos, economizando tempo na análise. A metodologia desenvolvida permite a determinação dos quatro fármacos anti-hipertensivos simultaneamente em apenas uma análise, com possibilidade de analisar AML, AMI, HCTZ e ATN em suas formas de dosagem individuais e/ou combinadas.

**Tabela 8** - Comparação das faixas de concentração linear para a determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN usando diferentes métodos analíticos com este trabalho.

Métodos	Faixa linear de concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )				Ref.
	AML	AMI	HCTZ	ATN	
CLAE – DAD	141 – 212	–	134 – 202	451 – 676	(VISHNUVARDHAN et al., 2014)
CLAE – UV	1,76 – 10,6	–	33,6 – 202	–	(PHANI R S CH et al., 2013)
CLAE – UV	–	7,52 – 37,6	33,6 – 336	75,1 – 751	(ELSHANAWANE; MOSTAFA; ELGAWISH, 2009)
CLAE – DAD	–	–	10,5 – 63,0	–	(PACHAURI et al., 2010)
UV	–	3,91 – 7,33	35,5 – 65,3	79,3 – 146	(FERRARO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2004)
VOQ	0,9 – 31	8,7 – 125	29 – 260	11 – 91	Este trabalho

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.2.6 Aplicação do Método Voltamétrico em Formulações Farmacêuticas Combinadas

O método proposto foi aplicado na determinação dos quatro anti-hipertensivos em três amostras comerciais, sendo AML 10 mg, HCTZ:AML 50:5 mg, e ATN 25 mg. Antes da aplicação, a seletividade do método desenvolvido foi verificada por análise de possíveis interferentes que estão presentes em formulações farmacêuticas, tais como amido, povidona, celulose microcristalina, dióxido de titânio, óxido de ferro(III), carbonato de magnésio e estearato de magnésio. As medidas foram realizadas utilizando-se AML  $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , AMI  $136 \mu\text{mol L}^{-1}$ , HCTZ  $272 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ATN  $90,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  com possíveis interferentes em concentrações molares na proporção de 1:1 e 1:10 (solução padrão: composto interferente). As magnitudes das correntes para os anti-hipertensivos não sofreram interferência de nenhum desses compostos, com DPR inferior a 3,9%.

Como os excipientes farmacêuticos não apresentaram nenhuma interferência, o método proposto e os métodos comparativos (CLAE) (ZECEVIC et al., 2000; BASAVAI AH; CHANDRASHEKAR; NAGEGOWDA, 2005; KUMAR et al., 2010), foram aplicados em amostras farmacêuticas. Os resultados da análise de todas as amostras estão apresentados na Tabela 9, onde o conteúdo nominal dos analitos e todos dados obtidos pelos métodos proposto e comparativos (CLAE) são apresentados.

O teste *t*-pareado foi aplicado nos resultados para verificar a semelhança entre os métodos. O valor de *t* calculado na determinação da mistura quaternária foi de 1,48 para AML, 3,21 para AMI, 2,59 para HCTZ e 1,96 para ATN. Sendo o valor crítico de *t* tabelado 4,30 (ANDERSON, 1987); considera-se que os métodos propostos não são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95%. A análise das variâncias, para os dois métodos, o proposto e o comparativo, foi verificada com a aplicação do teste *F* (ANDERSON, 1987). Como pode ser visto na Tabela 9, os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram inferiores ao valor do  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{critico}} = 19,0$ ), sendo assim, não há diferença significativa e os métodos possuem o mesmo nível equivalente de exatidão a 95% de confiança.

**Tabela 9** - Resultados obtidos na determinação da mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN em formulações farmacêuticas comerciais utilizando o método proposto comparado com CLAE.

Analito	Quantidade (mg por comprimido) <sup>a</sup>			E (%) <sup>b</sup>	F <sub>calc</sub> <sup>c</sup>
	Rótulo	CLAE	VOQ		
HCTZ	50	46,5 ± 0,8	47,1 ± 0,6	1,3	1,8
AMI	5	5,3 ± 0,2	4,8 ± 0,1	-9,4	4,0
AML	10	9,8 ± 0,5	9,2 ± 0,3	-6,1	2,8
ATN	25	23,6 ± 0,3	23,9 ± 0,2	1,3	2,3

<sup>a</sup>Média de 3 medidas; <sup>b</sup>100 × (método VOQ - método comparativo/método comparativo); <sup>c</sup>Valor F<sub>crítico</sub> = 19 (nível de confiança de 95%).

**Fonte:** o próprio autor

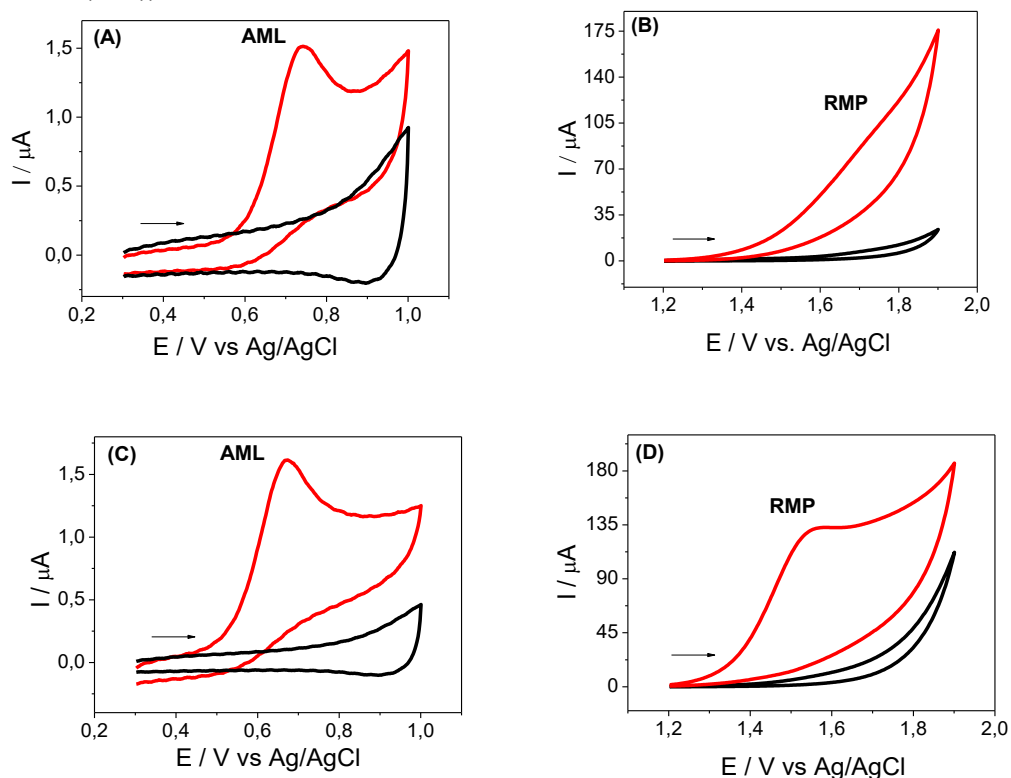
Os estudos de recuperação foram realizados para avaliar os efeitos da matriz após adições de solução padrão, obtendo as respectivas recuperações médias para todos os anti-hipertensivos estudados 105% para AML, 95,7% para AMI, 91,9% para HCTZ e 103% para ATN. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa das matrizes das amostras farmacêuticas analisadas na determinação de AML, AMI, HCTZ e ATN. Portanto, o método aqui proposto é preciso, ambientalmente favorável e pode ser usado em análises de rotina para a determinação simultânea de AML, AMI, HCTZ e ATN em amostras de medicamentos farmacêuticos comerciais.

### 4.3 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AML E RMP

#### 4.3.1 Estudo Eletroquímico do AML e RMP sobre o EDDB

A VC foi empregada para avaliar o comportamento eletroquímico do AML e RMP. A Figura 28 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para AML  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão Britton-Robinson (BR)  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 10,0) sobre o EDDB-PA (a-b) e sobre o EDDB-PC (c-d). Como pode ser observado, quando foi empregado o EDDB-PA (a-b) o AML apresentou um processo de oxidação em  $0,744 \text{ V}$ , e o RMP não apresentou um processo de oxidação bem definido, o que dificultou a obtenção do valor do potencial de oxidação do mesmo. Um processo de oxidação foi observado para cada analito sobre o EDDB-PC (c-d), sendo a oxidação do AML foi em  $0,675 \text{ V}$  e a oxidação do RMP foi observada em  $1,54 \text{ V}$ . Estes resultados indicam que o processo de oxidação de ambos os anti-hipertensivos no EDDB é irreversível (AL-MAJED et al., 2000; GOYAL; BISHNOI, 2010). O filme de DDB-PC apresentou os melhores resultados em termos de definição de pico e deslocamento de potencial de pico para menores valores. Assim, todos os experimentos seguintes foram realizados utilizando o EDDB-PC.

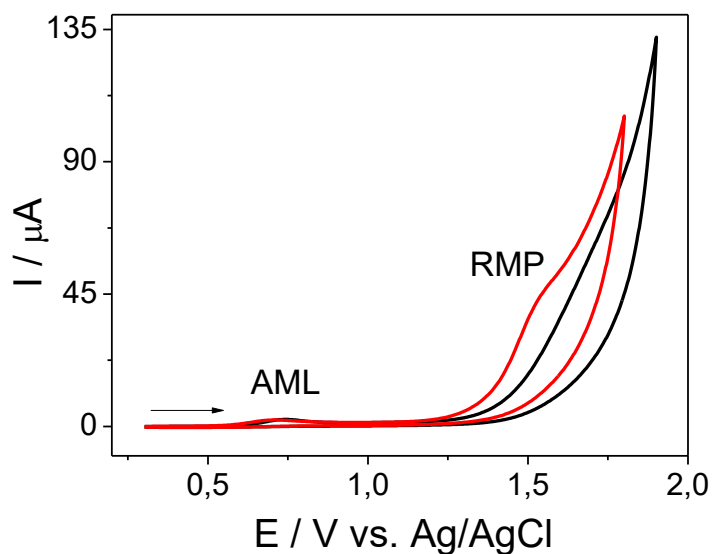
**Figura 28** - Voltamogramas cíclicos em velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  obtidos em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 10,0) contendo  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  de RMP, para as duas superfícies do filme de DDB realizadas neste estudo (anódica (A-B) e catódica (C-D)).



**Fonte:** o próprio autor

A Figura 29 mostra o comportamento voltamétrico do EDDB-PC na mistura contendo o AML e o RMP. Como pode ser observado, a diferença dos valores dos potenciais entre os picos de oxidação ( $\Delta E_{pa}$ ) é de 0,867 V, mostrando que a determinação simultânea desses analitos é viável utilizando-se este eletrodo.

**Figura 29** - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando EDDB-PC em solução tampão Britton-Robinson (BR) (pH 10,0) contendo  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  de RMP.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fonte:** o próprio autor

#### 4.3.2 Efeito do pH e Eletrólito Suporte

O comportamento eletroquímico de AML  $49,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $98,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  no EDDB-PC foi explorado em soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 - 11,0) usando VOQ com  $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ . A Tabela 10 mostra a influência da concentração hidrogeniônica do meio no  $\Delta E_{pa}$  e na  $I_{pa}$  de AML e RMP, respectivamente. O  $\Delta E_{pa}$  é maior nas soluções com valores de pH 5,0 e 6,0. Os valores de intensidade de corrente mais altos para AML foi obtido em pH 5,0 e 6,0 e para o RMP foi obtido em pH 6,0 e 11,0. Considerando as respostas obtidas, melhor  $\Delta E_{pa}$  e maior intensidade de corrente, juntamente com a repetibilidade de ambos anti-hipertensivos, o pH 6,0 foi selecionado para a determinação simultânea de AML e RMP.

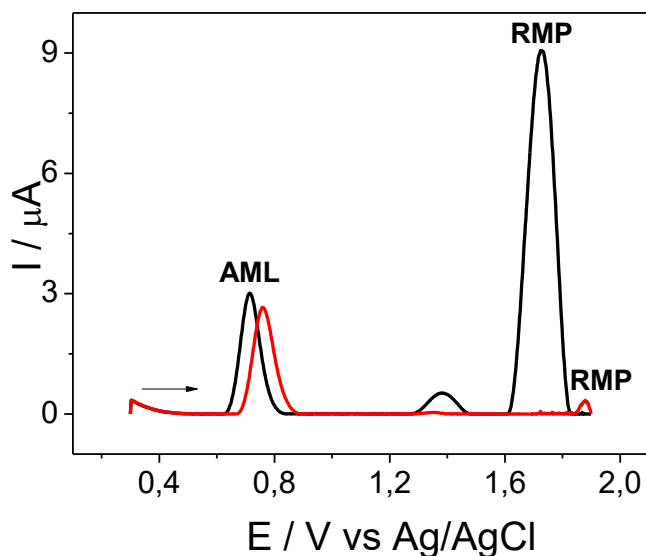
**Tabela 10** - Influência do pH na separação e nas correntes dos picos de AML e RMP usando soluções tampão BR em diferentes valores de pH (2,0 - 11,0) e a VOQ. Condições da VOQ:  $f = 30$  Hz,  $a = 50$  mV e  $\Delta E_S = 2$  mV.

Valores pH	$\Delta E_{pa}$ (V)	$I_{pa}$ ( $\mu$ A)	
		AML	RMP
2,0	0,914	3,79	3,54
3,0	0,832	3,32	3,39
4,0	0,789	3,98	1,41
5,0	1,032	4,45	1,58
6,0	1,005	4,03	8,17
7,0	0,983	2,58	7,53
8,0	0,909	2,24	4,89
9,0	0,851	1,64	7,24
10,0	0,830	1,23	7,24
11,0	0,803	0,75	15,2

**Fonte:** o próprio autor

A Figura 30 compara os voltamogramas das respostas obtidas em solução tampão BR (pH 6,0) com aquela obtida em solução tampão fosfato (pH 6,0). Os resultados mostraram, que usando a solução tampão fosfato, as correntes dos picos de oxidação para o AML e RMP foram menores que o observado usando a solução tampão BR. Ademais, o RMP apresentou deslocamento de potencial do pico de oxidação para valores mais positivos. Assim, a solução tampão BR (pH 6,0) foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação simultânea de AML e RMP usando um EDDB-PC.

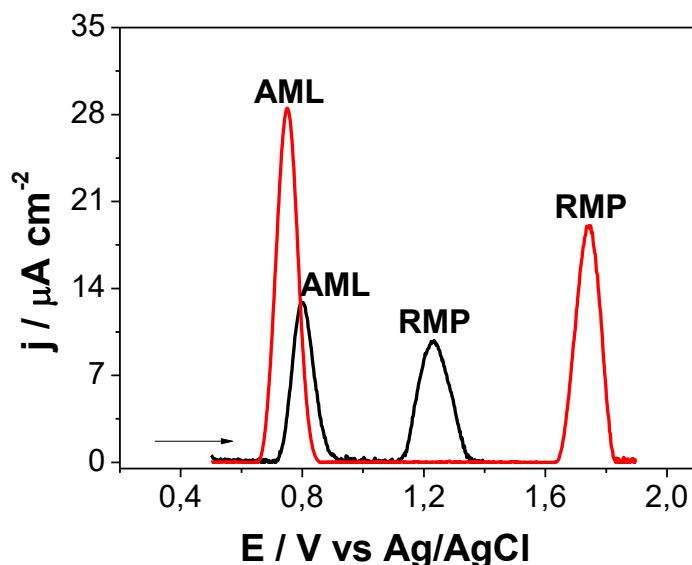
**Figura 30** - Voltamogramas de onda quadrada de AML  $49,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando um EDDB-PC em soluções tampão BR (—) e fosfato (—), ambos em pH 6,0. Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .



**Fonte:** o próprio autor

O desempenho eletroanalítico do EDDB-PC na oxidação de AML e RMP foi comparado com aquele obtido empregando o ECV utilizando a VOQ para AML  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em solução tampão BR (pH 6,0). Como apresentado na Figura 31, picos de oxidação de ambos fármacos foram obtidos com os dois eletrodos testados, no qual, as maiores correntes dos picos para AML e RMP podem ser observadas com o emprego do EDDB-PC, sob condições experimentais idênticas. Os resultados dos sinais analíticos para ambos os anti-hipertensivos apresentaram uma maior repetitividade dos sinais de oxidação para AML e RMP quando empregou o EDDB-PC (DPR < 2,7%, para N = 6) do que o ECV (DPR < 12%, para N = 6). O ECV, além de apresentar um maior DPR, também apresenta problemas de adsorção em sua superfície, tanto dos analitos quanto dos produtos das reações redox, provocando envenenamento da superfície eletródica o que limita a região potencial de trabalho (BRETT e BRETT, 1993; SKOOG e colab., 2002). Sendo assim, o EDDB-PC mostrou-se superior frente ao ECV e as determinações simultâneas do AML e RMP foram realizadas apenas com o EDDB-PC.

**Figura 31** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para AML  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão BR (pH 6,0) usando ECV (—) e EDDB-PC (—). Condições da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ .



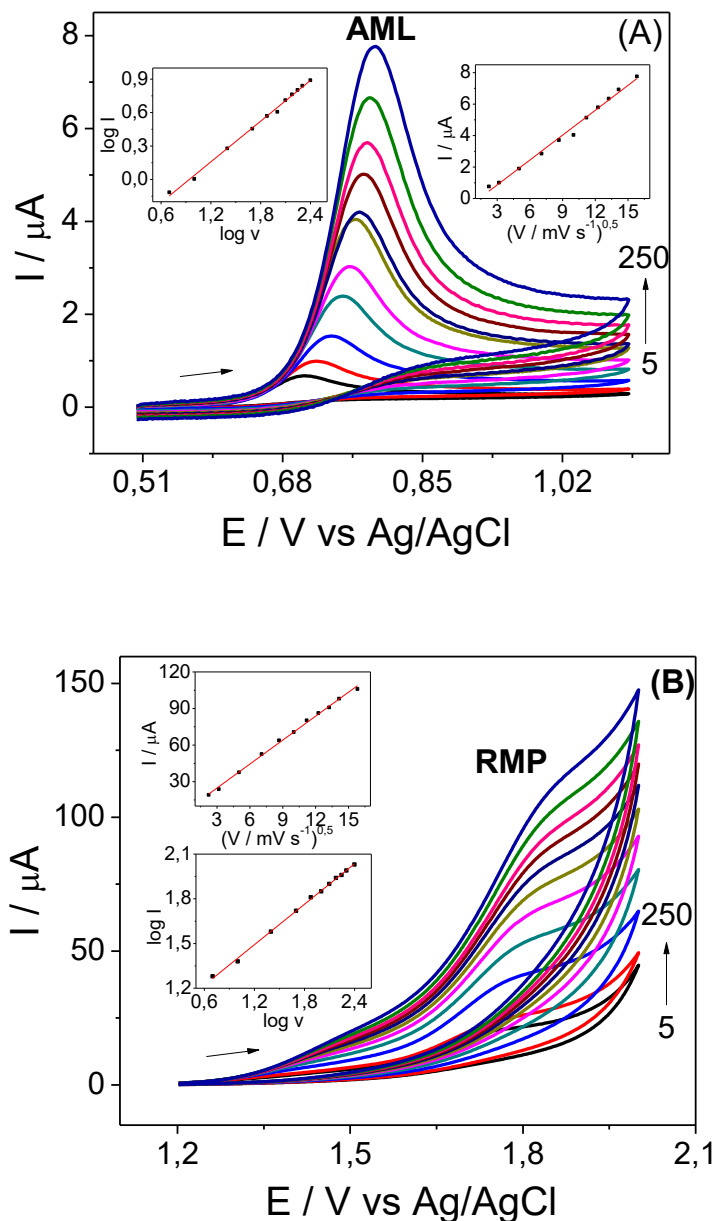
**Fonte:** o próprio autor

#### 4.3.3 Influência da Velocidade de Varredura no Processo de Oxidação do AML e RMP

O estudo da velocidade de varredura foi realizado para obter informações úteis sobre o comportamento do AML e RMP no EDDB-PC. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura de  $5$  a  $250 \text{ mV s}^{-1}$ , em solução tampão BR (pH 6,0) e concentração dos analitos de  $97,1$  e  $194,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AML e RMP, respectivamente. Os voltamogramas correspondentes ao AML são mostrados na Figura 32A e ao RMP na Figura 32B. Foi possível observar que com o aumento da velocidade de varredura, o potencial dos picos, para ambos os anti-hipertensivos, foram ligeiramente deslocados para valores mais positivos, isto é uma característica típica de uma reação eletroquímica irreversível (GOSSER, 1993). Pode-se observar também que a intensidade do pico anódico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura para ambos os anti-hipertensivos ( $r = 0,991$  para o AML e  $r = 0,997$  para RMP). Os valores obtidos da inclinação da reta a partir das dependências lineares de  $\log I_{pa}$  e  $\log v$  foram  $0,61$  ( $r = 0,996$ ) para AML e  $0,45$  ( $r = 0,998$ ) para RMP. Esses valores próximos de  $0,50$

indicam que os mecanismos das reações de oxidação destes medicamentos anti-hipertensivos são controlados por difusão (GOSSER, 1993).

**Figura 32** - Voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura ( $5 - 250 \text{ mV s}^{-1}$ ) obtidos para (A) AML  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) RMP  $194,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão BR (pH 6,0) usando um EDDB-PC. *Inserido*: dependência linear da  $I_{pa}$  e raiz quadrada da velocidade de varredura; dependência linear de  $\log I_{pa}$  com  $\log v$ .

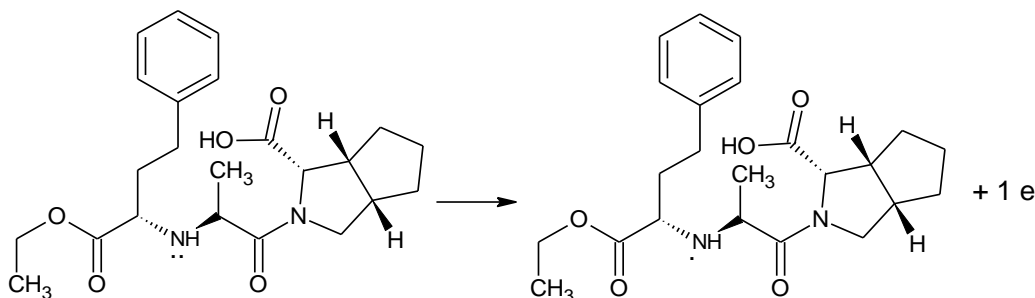


**Fonte:** o próprio autor

O valor de  $n$  envolvidos na oxidação de AML e RMP em um EDDB-PC foi estimado empregando os voltamogramas obtidos para AML e RMP em solução tampão fosfato (pH 6,0) (Figura 32) e a Equação 1. Para AML,  $E_p$  é

0,75 V e  $E_p/2$  é 0,70 V. Para RMP,  $E_p$  é 1,78 V e  $E_p/2$  é 1,69 mV. Considerando o valor de  $\alpha$  como 0,5, o valor de  $n$  calculado foi igual a 2 para o AML e igual a 1 para o RMP. Esses resultados demonstram que dois elétrons estão envolvidos na oxidação de AML, e um elétron está envolvido na oxidação do RMP em solução tampão fosfato (pH 6,0). De acordo com outros trabalhos da literatura, acredita-se que a oxidação eletroquímica de AML (Figura 11) ocorre no anel de 1,4-dihidropiridina, envolvendo dois prótons e dois elétrons (GOYAL; BISHNOI, 2010). Já para o RMP (Figura 33), o pico anódico aqui observado, pode ser atribuído à oxidação do grupo amina secundária presente na molécula (GOTI; NANNELLI, 1996).

**Figura 33** - Reação de oxidação do Ramipril (RMP).



#### 4.3.4 Escolha da Técnica Analítica e Validação do Método Proposto para a Determinação Simultânea da Mistura Binária de AML E RMP no EDDB-PC

As técnicas de VOQ e VPD apresentaram uma boa separação do potencial de oxidação dos picos de AML e RMP, permitindo a determinação simultânea desses anti-hipertensivos. Para a escolha da melhor técnica analítica a ser empregada na determinação desses anti-hipertensivos, o efeito dos parâmetros instrumentais dessas técnicas sobre a intensidade de corrente e potencial de oxidação para o AML e para o RMP foram investigados, pois, estes podem melhorar muito a resposta eletroanalítica dos analitos.

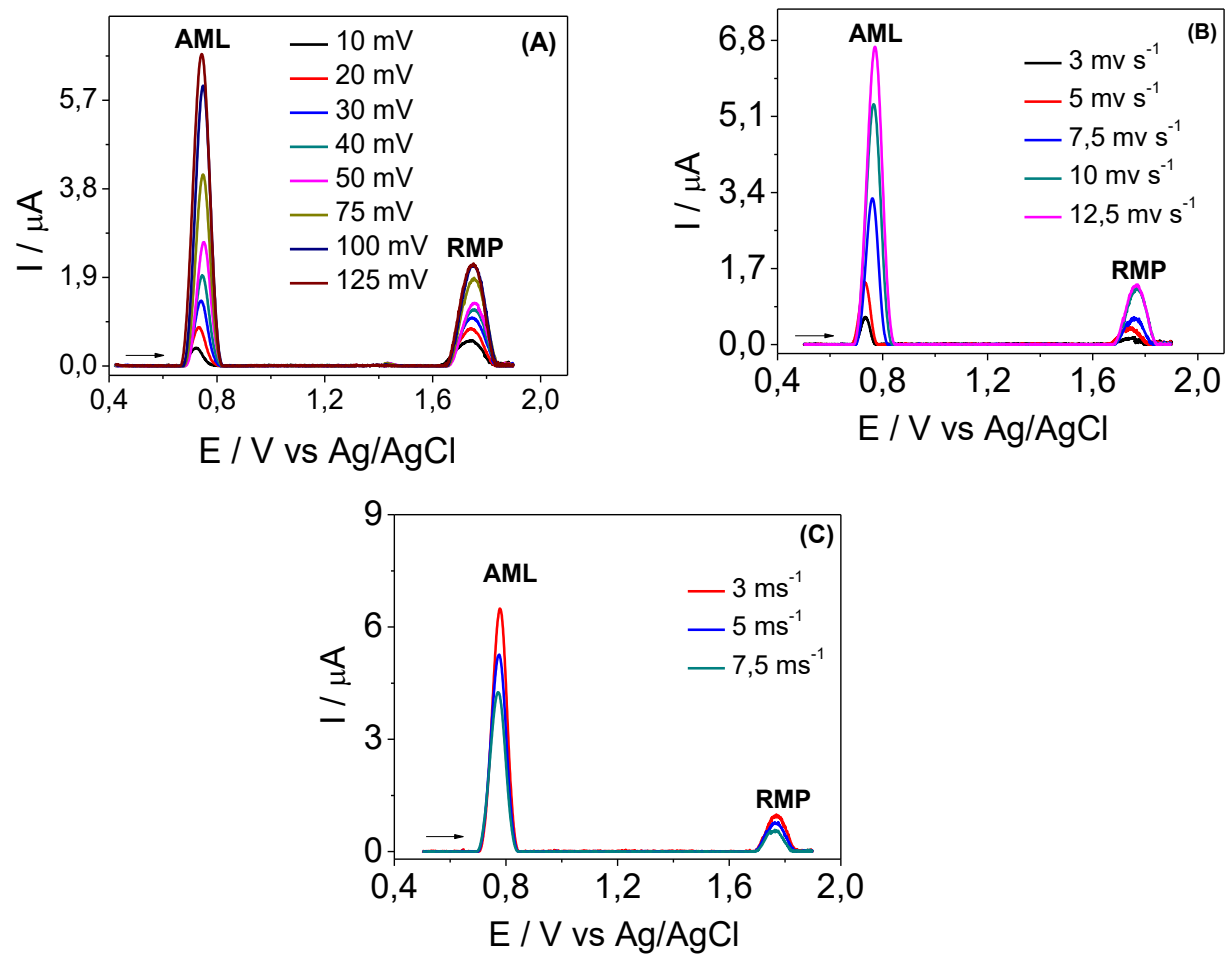
As Figuras 34A–C mostram os voltamogramas de pulso diferencial para o AML  $97,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP  $194 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da variação dos parâmetros da técnica empregando EDDB-PC em solução tampão BR (pH 6,0).

A Figura 34A estão apresentados os voltamogramas de pulso diferencial para os analitos em função da variação da amplitude do pulso no intervalo de 10 a 125 mV. Aumentando-se a amplitude do pulso aumenta-se a magnitude da corrente. No entanto, valores de amplitude acima de 100 mV não influenciam de maneira significativa na intensidade do sinal do RMP. Por este motivo, a amplitude selecionada para o desenvolvimento dos experimentos foi de 100 mV.

Os voltamogramas de pulso diferencial em função da variação da velocidade de varredura no intervalo de 3 a 12,5 mV s<sup>-1</sup> estão apresentados na Figura 34B. Observa-se que com o aumento da velocidade de varredura há um aumento na intensidade da corrente de pico até 10 mV s<sup>-1</sup>. Nota-se que para a velocidade de varredura de 12,5 mV s<sup>-1</sup> a intensidade de corrente não sofre um aumento muito significativo, principalmente para o RMP. Desta forma, foi selecionada uma velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> para dar continuidade no trabalho.

A variação do tempo de modulação também foi estudada no intervalo de 3 a 7,5 ms e está apresentado na Figura 34C. Com o aumento do tempo de modulação observa-se que há um decréscimo na magnitude de corrente de pico, como pode ser visualizado na Figura 34C. Desta forma, foi selecionado um tempo de modulação de 3 ms.

**Figura 34** - Influência da variação dos parâmetros da técnica de VPD na resposta do AML 97,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e RMP 194  $\mu\text{mol L}^{-1}$  empregando EDDB-PC em solução tampão BR (pH 6,0). (A) Variação da amplitude do pulso (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 e 125 mV) ( $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $t = 5 \text{ mV}$ ). (B) variação da velocidade de varredura (3; 5; 7,5; 10; 12,5  $\text{mV s}^{-1}$ ) ( $a = 100 \text{ mV}$ ,  $t = 5 \text{ mV}$ ). (C) variação do tempo de modulação (3; 5 e 7,5  $\text{ms}^{-1}$ ) ( $a = 100 \text{ mV}$ ,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ).



Fonte: o próprio autor

A Tabela 11 apresenta os intervalos e os valores selecionados para cada um dos parâmetros estudados da técnica de pulso diferencial.

**Tabela 11** - Estudo e seleção dos parâmetros instrumentais para a determinação simultânea de AML e RMP no EDDB-PC usando tampão BR (pH 6,0) e 97,1 e 194,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AML e RMP, respectivamente.

<b>Técnica</b>	<b>Parâmetros instrumentais</b>	<b>Intervalo de estudo</b>	<b>Valores selecionados</b>
<b>VPD</b>	$a$ (mV)	10 – 125	100
	$v$ ( $\text{mV s}^{-1}$ )	3 – 12,5	10
	$t$ (ms)	3 – 7,5	3
<b>VOQ</b>	$f$ ( $\text{s}^{-1}$ )	10 – 100	20
	$a$ (mV)	10 – 50	40
	$\Delta E_s$ (mV)	1 – 5	2

**Fonte:** o próprio autor

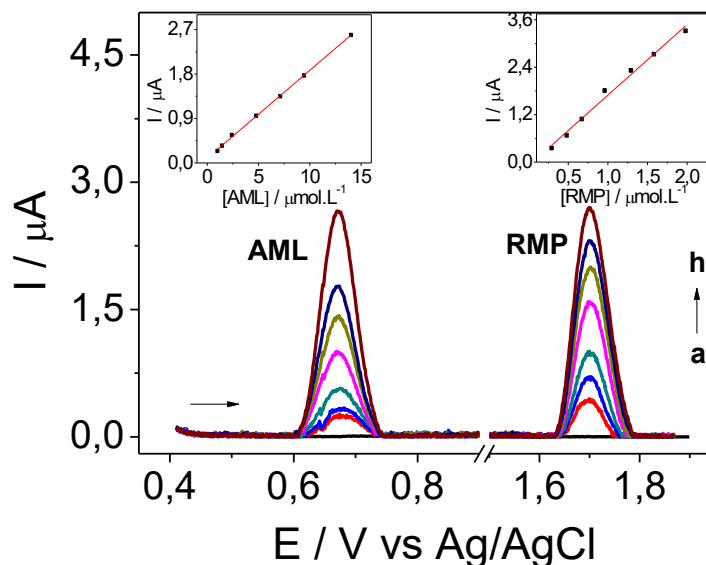
Após os estudos dos parâmetros para as técnicas de VOQ e VPD, os melhores resultados foram utilizados para a obtenção das curvas analíticas. Para a determinação simultânea de AML e RMP em formulações farmacêuticas combinadas empregando o EDDB-PC em solução tampão BR (pH 6,0), as curvas analíticas foram obtidas adicionando-se sucessivas alíquotas das soluções de trabalho dos anti-hipertensivos na célula eletroquímica, aumentando simultaneamente suas concentrações. Os resultados do desempenho analítico para ambas as técnicas estão reunidos na Tabela 12. Os melhores valores para os parâmetros analíticos, como, sensibilidade, repetitividade e precisão intermediária, foram obtidos pela técnica de VPD, portanto, esta foi a técnica escolhida para a determinação simultânea de AML e RMP. A Figura 35 mostra os voltamogramas de pulso diferencial e as curvas analíticas para a solução contendo ambos os anti-hipertensivos em diversas concentrações.

**Tabela 12** - Parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica de AML e RMP por VPD e VOQ em solução tampão BR (pH 6,0) utilizando um EDDB-PC.

	AML		RMP	
	VOQ	VPD	VOQ	VPD
<b>Potencial de pico (V)</b>	0,67	0,68	1,72	1,70
<b>Intervalo linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,99 – 14,02	0,99 – 14,02	0,29 – 1,98	0,29 – 1,98
<b>Coeficiente angular (<math>\mu\text{A mol L}^{-1}</math>)</b>	$1,7 \times 10^4$	$17,8 \times 10^4$	$57,7 \times 10^4$	$178 \times 10^4$
<b>Coeficiente linear (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	-0,001	0,09	-0,19	-0,09
<b>Coeficiente de correlação (<i>r</i>)</b>	0,996	0,999	0,991	0,988
<b>Limite de detecção (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,45	0,26	0,13	0,16
<b>Repetitividade (DPR %)</b>	6,93	2,54	2,39	2,12
<b>Precisão intermediária (DPR %)</b>	6,42	5,79	7,08	5,02

Fonte: o próprio autor

**Figura 35** - Voltamogramas de pulso diferencial empregando um EDDB-PC de (a) solução tampão BR (pH 6,0) e (b - h) AML 0,99 – 14,02  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , RMP 0,29 – 1,98  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Parâmetros da VPD:  $a = 100 \text{ mV}$ ,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  e  $t = 3 \text{ ms}$ .



**Fonte:** o próprio autor

Para avaliar a precisão da metodologia, as correntes máximas de oxidação de AML e RMP foram empregadas nas concentrações 7,1 e 1,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Para a repetitividade, a magnitude das correntes dos picos de oxidação foi avaliada por meio de dez medidas sucessivas que foram realizadas no mesmo dia, e para a precisão intermediária, a magnitude das correntes dos picos de oxidação foram avaliadas ao longo de cinco dias diferentes. Os resultados estão resumidos na Tabela 12. Os baixos valores de DPR indicam que o método proposto é preciso.

Em seguida, para avaliar se um analito interfere na determinação simultânea do seu par, o método proposto foi empregado para a determinação simultânea da mistura binária de AML e RMP, para isso, uma série de medidas foram registradas, mantendo um analito constante e variando a concentração do outro em solução tampão BR (pH 6,0) empregando o EDDB-PC. No primeiro caso a interferência do RMP sobre o AML foi estudada, a concentração do AML aumentou linearmente no intervalo de 0,99 a 14,02  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em soluções contendo o RMP na concentração fixa de 1,28  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A corrente do pico de oxidação para o RMP permaneceu constante com DPR = 11,83%. Para o estudo da interferência do AML sobre o RMP, a corrente do pico do RMP aumentou proporcionalmente ao intervalo de concentração de

0,29 a 1,98  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a determinação do RMP foi realizada em soluções contendo AML na concentração fixa de 7,12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , onde a corrente do pico de oxidação permaneceu constante com  $\text{DPR} = 3,26\%$ . Portanto, pode-se concluir que a mudança da concentração de um fármaco estudado não teve influência significativa sobre a resposta eletroquímica do outro. Com isso, os processos de oxidação de AML e RMP no EDDB-PC são considerados independentes.

#### 4.3.5 Comparação com Outros Métodos Analíticos Descritos na Literatura

Uma comparação entre alguns parâmetros analíticos do método proposto, e de alguns métodos anteriores relatados na literatura, para a determinação simultânea de AML e RMP, são apresentados na Tabela 13. A partir desses dados, pode-se observar, que os parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica simultânea de AML e RMP aqui propostos, são tão bons quanto aqueles obtidos por outros métodos. Além disso, a preparação das amostras para a análise voltamétrica é simples, não demandando de outros tratamentos como a filtração. Adicionalmente, o procedimento faz uso reduzido de solventes orgânicos, gerando menor quantidade de resíduos, atendendo, portanto, aos princípios de química verde, e também, menor contaminação do analista. Sendo assim, a metodologia aqui proposta, usando EDDB-PC em conjunto com a VPD, pode ser uma alternativa a esses outros métodos, podendo ser utilizada para a determinação simultânea de AML e RMP em formulações farmacêuticas de maneira mais ágil.

**Tabela 13** - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos deste trabalho com diferentes técnicas analíticas descritas na literatura para a determinação de AML e RMP.

<b>Analito</b>	<b>Técnica</b>	<b>Intervalo linear de concentração (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referências</b>
<b>AML</b>	CLAE – UV	3,4 – 19	–	(GUPTA et al., 2007)
	CLAE – UV/VIS	24 – 220	11	(MASTE M.M. et al., 2011)
	CLAE – DAD	9,8 – 29	–	(KORALLA et al., 2016)
	UV	12 – 61	–	(PATIL et al., 2009)
	VPD	0,99 – 14,02	0,26	Este trabalho
<b>RMP</b>	CLAE – UV	2,4 – 13	–	(GUPTA et al., 2007)
	CLAE – UV/VIS	12 – 108	11	(MASTE M.M. et

---

				al., 2011)
				(KORALLA et al., 2016)
CLAE – DAD	9,6 – 29	—		(PATIL et al., 2009)
UV	36 – 84	—		
VPD	0,29 – 1,98	0,16		Este trabalho

---

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.3.6 Aplicação do Método Voltamétrico em Formulações Farmacêuticas Combinadas

Previamente à análise das amostras selecionadas, a seletividade do método proposto foi avaliada pela adição de possíveis interferentes presentes nas formulações farmacêuticas selecionadas, tais como amido, povidona, copovidona, sacarose, dióxido de titânio, óxido férrico amarelo e carbonato de sódio. Para isso, uma solução padrão contendo AML e RMP, nas proporções de concentrações (solução padrão:composto interferente) de 1:1 e 1:10 (m/m) foram analisadas. Nenhum dos excipientes avaliados apresentou eletroatividade no EDDB-PC na janela de potencial de trabalho, mesmo em concentrações 10 vezes maiores que a dos anti-hipertensivos. Além disso, as correntes de pico obtidas para as soluções dos anti-hipertensivos contendo os possíveis interferentes foram comparadas com as obtidas na ausência de cada interferente. A análise das respostas obtidas permitiu concluir que esses compostos não interferem significativamente, apresentando DPR menores que 5%, na determinação de AML e RMP nas condições de trabalho usadas, revelando a seletividade do método para aplicação em formulação farmacêutica contendo AML e RMP.

O método aqui proposto foi empregado para analisar duas amostras farmacêuticas comerciais diferentes (A e B) contendo AML e RMP em formulações combinadas. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos das análises para as amostras empregando o método proposto e o método comparativo (CLAE). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores encontrados para os teores de AML e RMP nas amostras farmacêuticas comerciais utilizando o método proposto e o comparativo. A análise das variâncias, para o método proposto e o comparativo, foi verificada com o teste  $F$ , a um nível de confiança de 95% (ANDERSON, 1987). Os valores de  $F_{calculado}$  foram inferiores ao valor de  $F_{tabelado}$  ( $F_{critico} = 19,0$ ). Sendo assim, não há diferença significativa e os métodos fornecem um nível de exatidão equivalente. Além disso, foi aplicado o teste  $t$  pareado (ANDERSON, 1987) e os resultados obtidos foram estatisticamente iguais, pois, os valores de  $t$  calculados foram menores que o valor tabelado ( $t_{AML} = 0,33$ ,  $t_{RMP} = 1,07$  e  $t_{crit}$

= 2,57 a um nível de confiança de 95%), indicando que não há diferenças entre o método proposto e o método comparativo.

**Tabela 14** - Resultados obtidos na determinação simultânea de AML e RMP em formulações farmacêuticas combinadas por VPD empregando o EDDB-PC e pelo método comparativo (CLAE).

Amostras	Analito	Quantidade (mg por comprimido) <sup>a</sup>			E (%) <sup>b</sup>	F <sub>calc</sub> <sup>c</sup>
		Rótulo	CLAE	VPD		
A	AML	6,9	7,4 ± 0,3	7,0 ± 0,2	-4,9	2,4
	RMP	5	5,4 ± 0,2	5,1 ± 0,2	-5,2	1,3
B	AML	6,9	7,1 ± 0,3	7,3 ± 0,5	3,1	2,5
	RMP	10	10,0 ± 0,3	10,2 ± 0,7	1,6	3,8

<sup>a</sup>Média de 3 medidas; <sup>b</sup>100 × (VOQ - CLAE/CLAE); <sup>c</sup>Valor F<sub>crítico</sub>= 19 (nível de confiança de 95%).

**Fonte:** o próprio autor

Os estudos de recuperação foram realizados para avaliar os efeitos da matriz dos medicamentos. Para isso, foi realizado adições de volumes conhecidos de soluções padrão de AML e RMP à uma determinada amostra, seguida da análise usando VPD. Foram obtidas boas recuperações para a análise dos comprimidos comerciais, as recuperações variaram de 92,2 a 121 e 86,8 a 102% para AML e RMP, respectivamente. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência das matrizes das amostras farmacêuticas analisadas na determinação de AML e RMP.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi demonstrado o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos empregando as técnicas voltamétricas para a determinação simultâneas de AML e algumas associações com outras classes de anti-hipertensivos. Na primeira etapa, o uso do EDDB-PC em conjunto com a técnica de VOQ, levou ao desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação voltamétrica simultânea de AML e ATN, apresentando excelente sensibilidade e seletividade. Com o estudo dos parâmetros instrumentais e aplicando as melhores condições dos mesmos, foram obtidas curvas analíticas lineares permitindo a quantificação de diferentes dosagens da mistura binária de AML e ATN em formulações farmacêuticas comerciais, com resultados equivalentes aos obtidos utilizando CLAE, a um nível de confiança de 95%.

Na segunda etapa deste trabalho, foi possível observar que alterando a terminação da superfície do EDDB para anódica e ainda o eletrólito suporte e pH, possibilitou o emprego da técnica de VOQ para o desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação simultânea de uma mistura quaternária de AML, AMI, HCTZ e ATN. Obteve-se uma boa definição e separação de potencial entre os picos de oxidação desses anti-hipertensivos para a determinação da mistura quaternária. Após os estudos dos melhores parâmetros instrumentais, foram obtidas curvas analíticas lineares, permitindo a quantificação simultânea da mistura desses quatro anti-hipertensivos em diferentes dosagens farmacêuticas combinadas com resultados equivalentes aos obtidos utilizando CLAE, a um nível de confiança de 95%.

Na terceira etapa deste trabalho, foi desenvolvido um método para a determinação simultânea da mistura binária de AML e RMP. Os melhores resultados foram obtidos quando foi empregado o EDDB-PC em conjunto com a técnica de VPD. O desenvolvimento deste método, levou à uma boa separação de potencial entre os picos de oxidação desses anti-hipertensivos. Após o estudo dos parâmetros para a técnica de VPD, os melhores resultados foram empregados para a construção das curvas analíticas. Estas, foram lineares em um intervalo de concentração suficiente para a determinação simultânea dos dois anti-hipertensivos em diferentes dosagens de medicamentos farmacêuticos comerciais disponíveis, e os resultados obtidos

foram equivalentes aos obtidos utilizando CLAE, a um nível de confiança de 95%.

Os resultados relatados demonstram que o EDDB, quando comparado com outros eletrodos de trabalho, aqui demonstrados, apresentou melhor desempenho na determinação das misturas dos anti-hipertensivos. O EDDB foi combinado com diferentes técnicas voltamétricas mostrando ser uma alternativa viável para a determinação simultânea de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas com dosagens combinadas sem extensos tratamentos das amostras, necessidade de equipamentos caros e ainda uma diminuição do uso de substâncias tóxicas. O EDDB provou ser um sensor voltamétrico sensível e seletivo, sendo uma alternativa atraente devido à sua alta precisão, simplicidade e rapidez. Ainda assim, foi possível observar que as diferenças nas terminações superficiais do EDDB são determinantes nos processos eletroquímicos de cada anti-hipertensivo, mostrando que empregando a terminação superficial adequada do eletrodo para o tipo de mistura dos compostos, foi possível propor uma metodologia para a determinação dos anti-hipertensivos, a fim de manter uma maior agilidade nas análises simultâneas de medicamentos.

## REFERÊNCIAS

ABBAR, J. C.; NANDIBEWOR, S. T. Voltammetric oxidation and determination of atorvastatin based on the enhancement effect of cetyltrimethyl ammonium bromide at a carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 158–164, 2013.

ABDELLATEF, H. E. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of ramipril in its pure and dosage form. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 3, p. 701–706, 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142506002526>>.

AFIEROHO, O.; OKORIE, O.; OKONKWO, T. A spectrophotometric method for the determination of ramipril in solid dosage forms. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 275–279, 24 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/75889>>. Acesso em: 30 out. 2018.

AL-MAJED, A. A. et al. The voltammetric study and determination of ramipril in dosage forms and biological fluids. **II Farmaco**, v. 55, n. 3, p. 233–238, 2000.

ALAAMA, M. et al. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of amlodipine. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 663–669, 2015.

ALBISHRI, H. M.; ABD EL-HADY, D.; TAYEB, R. A. Eco-friendly simultaneous chromatographic determination of amiloride hydrochloride, atenolol, and hydrochlorothiazide in urine. **Acta Chromatographica**, v. 27, n. 3, p. 461–476, 2015.

ALEIXO, L. M. Voltametria : Conceitos E Técnicas. **Chemkeys**, p. 1–40, 2003. Disponível em: <<http://usuarios.upf.br/~edgardo/Disciplinas/Analise Instrumental/voltametria-vf.pdf>>.

ALFARO, M. A. Q. et al. Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2006.

ALGHAMDI, A. F. Electrochemical oxidation behavior of hydrochlorothiazide on a glassy carbon electrode and its voltammetric determination in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 363–369, 2014.

ALI, H. S. et al. Simultaneous voltammetric determination of vanillin and caffeine in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode: Its comparison with HPLC-DAD. **Talanta**, v. 170, p. 384–391, 2017.

ANDERSON, R. L. **Practical Statistics for Analytical Chemists**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987.

- ARGEKAR, A. P.; POWAR, S. G. Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 6, p. 1137–1142, jan. 2000.
- ARIAS, R. et al. Determination of the  $\beta$ -blocker atenolol in plasma by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 916, n. 1–2, p. 297–304, maio 2001.
- 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.
- ARYAL, S.; ŠKALKO-BASNET, N. Stability of amlodipine besylate and atenolol in multi-component tablets of mono-layer and bi-layer types. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 299–308, 2008. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/acph.2008.58.issue-3/v10007-008-0012-5/v10007-008-0012-5.pdf>>.
- BAIRU, S. G.; STEFAN, R.-I.; VAN STADEN, J. F. Polycrystalline diamond-based electrochemical sensors and their applications in inorganic and organic analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 145–153, 2003.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- BARMAN, R. K. et al. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of atenolol and amlodipine in pharmaceutical-dosage form. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 20, n. 4, p. 274–279, 2007.
- 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.
- BASAVAIHAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; NAGEGOWDA, P. Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of amlodipine besylate in pharmaceuticals. **ScienceAsia**, v. 31, n. 1, p. 13–21, 2005.
- BI, H.; COOPER, S. F.; CÔTÉ, M. G. Determination and identification of amiloride in human urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 582, n. 1–2, p. 93–101, nov. 1992.
- BRASIL. **Brazilian Pharmacopoeia**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL. ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução, assuntos de interesse: lista de medicamentos de referência**. [s.l.: s.n.].
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc, 1993a.

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

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

BROCENSCHI, R. F. et al. Assessments of the effect of increasingly severe cathodic pretreatments on the electrochemical activity of polycrystalline boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5363–5368, maio 2016.

BRYCHT, M. et al. Sensitive determination of anticancer drug imatinib in spiked human urine samples by differential pulse voltammetry on anodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 68, p. 13–22, 2016.

CARVALHO, M. E. M. de M.; ALVES, E. L. M.; MARTINS, M. do C. de C. e. Efeito dos anti-hipertensivos orais sobre dosagens bioquímicas em idosos. **Northeast Network Nursing Journal**, v. 17, n. 6, 13 jun. 2017.

CERVINI, P.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determination of atenolol at a graphite-polyurethane composite electrode. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 206–209, 2007.

CHOMISTEKOVÁ, Z. et al. Oxidation and reduction of omeprazole on boron-doped diamond electrode: Mechanistic, kinetic and sensing performance studies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2016.

CHRYSANT, S. G. et al. The combination of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in controlling high blood pressure: COACH, a randomized, double-blind, placebo-controlled, 8-week factorial efficacy and safety study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 4, p. 587–604, abr. 2008.

COMPTON, R. G.; FOORD, J. S.; MARKEN, F. Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 17, p. 1349–1363, 2003.

DAI, S.-Y. et al. Development and validation of an rp-hplc method for simultaneous determination of ramipril and amlodipine in tablets. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 6, p. 440–446, 1 dez. 2013.

DANTAS, L. M. F. **Determinação de hidrazina por voltametria de onda quadrada sobre eletrodo de grafite modificado com FeTPyPz**. 2007. Universidade Federal do Maranhão, 2007.

DE CÁSSIA MENDES DE BARROS, R. et al. Filmes de diamante CVD dopado com boro. parte I. histórico, produção e caracterização. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n2/23655.pdf>>.

DE LA ROCA, M. F. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de**

**Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 177–180, 2007.

DE SOUZA, D. et al. **Utilização de eletrodos sólidos de amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos** **Quimica Nova**. [s.l.: s.n.].

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

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003b.

DEROCO, P. B. et al. Simultaneous voltammetric determination of aspartame and acesulfame-K in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 2135–2140, 2015.

DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Determination of amiloride at Nafion–CNT-nano-composite film sensor employing adsorptive stripping differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 169, p. 341–348, 2012.

DINIZ, A. V et al. Boron doped diamond thin films on large area Ti6Al4V substrates for electrochemical application. **Materials Research**, v. 6, n. 1, p. 57–61, 2002.

DONIA, A.-R. M. A. et al. Chromatographic stability indicating quantification of ramipril in bulk and dosage forms. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 1651–1658, 2018.

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, jul. 2013a.

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. 2013b.

EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R. Simple and rapid determination of loratadine in pharmaceuticals using square-wave voltammetry and a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 20, p. 8697–8703, 2015.

ELSHANAWANE, A. A.; MOSTAFA, S. M.; ELGAWISH, M. S. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide, and chlorthalidone in their combined mixtures. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 2, p. 404–409, 2009.

EMAMI, M.; SHAMSIPUR, M.; SABER, R. Design of poly-L-methionine-gold

nanocomposit/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for determination of amlodipine in human biological fluids. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 4, p. 985–992, 15 abr. 2014.

ERNST, M. E. et al. Comparative antihypertensive effects of hydrochlorothiazide and chlorthalidone on ambulatory and office blood pressure. **Hypertension**, v. 47, p. 352–358, 2006.

FERRARO, M. C. .; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 305–314, fev. 2004.

FERRAZ, B. R. L. et al. Voltammetric determination of ethionamide in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 677–684, 2016.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158–164, jul. 2013.

FERRO, S. et al. Synthesis of diamond. **Journal of Materials Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2843–2855, 26 set. 2002.

FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; SARTORI, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Electroanalytical determination of the linuron herbicide using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode: comparison with a boron-doped diamond electrode modified with platinum nanoparticles. **Anal. Methods**, v. 7, n. 2, p. 643–649, 2015.

FUJIMORI, N.; IMAI, T.; DOI, A. Characterization of conducting diamond films. **Vacuum**, v. 36, n. 1–3, p. 99–102, 1986.

FUJISHIMA, A. et al. Electroanalysis of dopamine and NADH at conductive diamond electrodes. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 473, n. 1–2, p. 179–185, 1999.

GARG, G.; SARAF, S.; SARAF, S. New spectrophotometric methods for the simultaneous determination of amlodipine and ramipril. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 85, n. 7, p. 769–772, 2008.

GAZY, A. A. K. Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids. **Talanta**, v. 62, n. 3, p. 575–582, 27 fev. 2004.

GIMENES, D. T. et al. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 411–418, 2015.

GIRARD, H. et al. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 2, p. 316–325, fev. 2007.

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

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

GOTI, A.; NANNELLI, L. Synthesis of nitrones by methyltrioxorhenium catalyzed direct oxidation of secondary amines. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 33, p. 6025–6028, 1996.

GOYAL, R. N. et al. Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 1, p. 65–70, 2006.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S. Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 2, p. 234–240, 1 out. 2010.

GOYAL, R. N.; SINGH, S. P. Voltammetric determination of atenolol at C60-modified glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 932–937, 2006.

GRANGER, M. C.; SWAIN, G. M. The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 12, p. 4551–4558, 1999.

GREEF, R. et al. **Instrumental methods in electrochemistry**. 1. ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985.

GUPTA, K. R. et al. Simultaneous determination of amlodipine and ramipril by high performance thin layer chromatography. **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 4177–4182, 2007.

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

HIREMATH, G. C.; KULKARNI, R. M.; NANDIBEWOOR, S. T. Kinetics of oxidative degradation and deamination of atenolol by aqueous alkaline permanganate. **Indian Journal Chemistry - Section A**, v. 44, n. 2, p. 245–250, 2005.

HUPERT, M. et al. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 10, p. 1940–1949, 2003.

INMETRO: DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. [s.l: s.n.].

JEFFERS, B. W.; ROBBINS, J.; BHAMBRI, R. Efficacy of calcium channel

blockers versus other classes of antihypertensive medication in the treatment of hypertensive patients with previous stroke and/or coronary artery disease.

**American journal of therapeutics**, v. 24, n. 0, p. 1–13, 2015.

KALYANARAMU, B.; RAGHUBABU, K.; VAMSIKUMAR, Y. Development of a simple colorimetric determination of ramipril from pharmaceutical formulations. **Journal Chemical Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 863–869, 2011.

KANNAPPAN, V.; MANNEMALA, S. S. Simultaneous enantioseparation and purity determination of chiral switches of amlodipine and atenolol by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 120, p. 221–227, fev. 2016.

KATSUKI, N. et al. Water electrolysis using diamond thin-film electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, n. 7, p. 2358–2362, 1998.

KAZEMIPOUR, M. et al. Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in pharmaceutical preparations. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 65–70, 8 jan. 2009.

KHAIRY, M. . et al. Simultaneous voltammetric determination of antihypertensive drugs nifedipine and atenolol utilizing MgO nanoplatelet modified screen-printed electrodes in pharmaceuticals and human fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 1045–1054, nov. 2017.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. 2. ed. New York: CRC Press, 1996.

KOHLMANN-JR, O. et al. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 4, p. 257–286, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v43n4/11752.pdf>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

KORALLA, S. et al. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of ramipril and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 242–249, 2016.

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

KUMAR, N. et al. Estimation of atenolol by reverse phase high performance liquid chromatography. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 962–966, 2010.

LAPA, R. A. .; LIMA, J. L. F. .; SANTOS, J. L. . Dual-stopped-flow spectrophotometric determination of amiloride hydrochloride in a multicommutated flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 407, n. 1–2, p. 225–231, fev. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267099008314>>.

LI, C. Electrochemical determination of dipyrindamole at a carbon paste

- electrode using cetyltrimethyl ammonium bromide as enhancing element. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 1, p. 77–83, mar. 2007.
- LIMA, A. B. et al. Electrochemical oxidation of ibuprofen and its voltammetric determination at a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1585–1588, jul. 2013.
- LIU, F. et al. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 5, p. 1187–1191, set. 2007.
- 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.
- MACHINI, W. B. S.; DAVID-PARRA, D. N.; TEIXEIRA, M. F. S. Electrochemical investigation of the voltammetric determination of hydrochlorothiazide using a nickel hydroxide modified nickel electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 57, p. 344–348, 2015.
- MAGUREGUI, M. I.; JIMENEZ, R. M.; ALONSO, R. M. Simultaneous determination of the  $\beta$ -blocker atenolol and several complementary antihypertensive agents in pharmaceutical formulations and urine by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 36, n. 10, p. 516–522, out. 1998.
- MANSANO, G. R. et al. Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode: Improving the simultaneous voltammetric determination of amlodipine and valsartan in urine and combined dosage forms. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 188–194, 2015.
- MANSANO, G. R.; EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R. Electrochemical evaluation of a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of an antihypertensive ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan in pharmaceuticals. **Analytical Methods**, v. 7, n. 3, p. 1053–1060, 2015.
- MANSANO, G. R.; SARTORI, E. R. Oxidação eletroquímica de anlodipino e hidroclorotiazida sobre o eletrodo de diamante dopado com boro: potencialidade de determinação simultânea em urina. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 81–86, 2015.
- MASSA, K. H. C. et al. Fatores associados ao uso de anti-hipertensivos em idosos. **Revista saúde pública**, v. 50, n. 75, 2016.
- MASSARANI, B.; BOURGOIN, J. C.; CHRENKO, R. M. Hopping conduction in semiconducting diamond. **Physical Review B**, v. 17, n. 4, p. 1758–1769, fev. 1978.
- MASTE M.M. et al. Development of RP-HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine and ramipril in tablet dosage form. **Asian Journal Research Chem**, v. 4, n. 8, 2011.

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.

MORAES, J. T. et al. Simultaneous voltammetric determination of antihypertensive drugs amlodipine and atenolol in pharmaceuticals using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1264–1272, 2016.

MORALES-OLIVAS, F. J. Papel actual de los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión arterial. **Hipertensión y riesgo Vascular**, v. 25, n. 5, p. 198–204, jan. 2008.

MORT, J. et al. Boron doping of diamond thin films. **Applied Physics Letters**, v. 55, n. 11, p. 1121–1123, 11 set. 1989.

NOBRE, F. et al. **Associações fixas de drogas anti-hipertensivas: vantagens e desvantagens na prática clínica** Revista Brasileira Hipertensão. [s.l.: s.n.].

NOVELLO, M. F. et al. Compliance with the prescription of antihypertensive medications and blood pressure control in primary care. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 108, n. 2, p. 135–142, 2017.

PACHAURI, S. et al. Development & validation of HPLC method for analysis of some antihypertensive agents in their pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 8, p. 459–464, 2010.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: a brief review about concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.

PAIOLA, I. F. ; et al. Miniaturização de uma célula eletroquímica em um experimento didático de voltametria cíclica: economizando reagentes e minimizando a geração de resíduos. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 953–973, 2017.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 2, p. 191–199, out. 2005.

PATIL, P. R. et al. Simultaneous estimation of ramipril and amlodipine by uv spectrophotometric method. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 304–307, 2009.

PATIL, R. H.; HEGDE, R. N.; NANDIBEWOR, S. T. Voltammetric oxidation and determination of atenolol using a carbon paste electrode. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 23, p. 10206–10210, dez. 2009.

PAWAR, P. Y. et al. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and atenolol in combined dosage form by Vierodt's method using U.V. spectroscopy. **Der Pharma Chemica**, v. 5, n. 2, p. 97–102, 2013.

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.

PEDROSA, V. A. et al. Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analyses? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 573, n. 1, p. 11–18, nov. 2004.

PEREZ, M. ângela F. Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante? **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimentos de Embalagens**, v. 22, n. 3, p. 1–9, 2010.

PHANI R S CH et al. High resolution RP-HPLC method for the determination of hypertensive drug products. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 440–454, 2013.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045–1050, nov. 2000.

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

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

POPA, E. et al. Selective voltammetric and amperometric detection of uric acid with oxidized diamond film electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1724–1727, 2000.

PRIETO, J. A.; JIMÉNEZ, R. M.; ALONSO, R. M. Square wave voltammetric determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations. **Il Farmaco**, v. 58, n. 5, p. 343–350, maio 2003.

RAJORIYA, V.; SONI, A.; KASHAW, V. Method development and validation of fast dissolving tablet of ramipril by hplc method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 174–178, 1 mar. 2016.

RATHEE, P. et al. Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Lisinopril Dihydrate as A.P.I. and in Tablet Dosage Forms by Modified Form of Simultaneous Equation Method Using Derivative UV-Spectrophotometry. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 556–562, 2010.

RAZAK, A. O. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 433–440, 2004.

**Resolução - RE N° 899.** . [s.l: s.n.].

ROCHA, C. S.; ZIEMEL, A. C. Análise qualitativa e quantitativa de fármacos anti-hipertensivos dispensados na farmácia do posto médico de Estiva Gerbi-SP. **FOCO: caderno de estudos e pesquisas**, v. 0, n. 8, 2015.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**, v. 21, n. 6, p. 1615–1622, 30 jun. 2015.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 230, p. 630–638, 2016.

SALAZAR-BANDA, G. R. et al. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, 2006.

SANTOS, M. C. G. et al. Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 263–270, 2013.

SANTOS, S. B. et al. A simple square-wave voltammetric method for the determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Quimica Nova**, v. 37, n. 10, p. 1579–1583, 2014.

SARADA, B. V. et al. Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1632–1638, abr. 2000.

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.

SARTORI, E. R. et al. Determination of propylthiouracil in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1504–1511, 2013.

SCREMIN, J.; KARIMI-MALEH, H.; SARTORI, E. R. Electrochemical study of the antiplatelet agent ticlopidine and its voltammetric determination in pharmaceutical and urine samples using a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 3750–3756, 2015.

SHAMSIPUR, M.; SABER, R.; EMAMI, M. A highly sensitive electrochemical sensor based on gold nanoparticles/multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode for selective determination of traces of atenolol. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 7038, 2014.

SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical

determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 91, n. 1, p. 60–66, 2003.

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, L. C. D. J.; RAMOS, M. E. S. P. Interação medicamentosa entre fármacos anti-hipertensivos em usuários de bebida alcoólica. **Revista Enfermagem Contemporânea**, v. 5, n. 2, p. 271–283, 2016. Disponível em: <<https://www5.bahiana.edu.br/index.php/enfermagem/article/view/1005>>.

SILVA, T. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of ramipril using an electrochemical sensor based on nanostructured carbon black. **Analytical Methods**, v. 9, n. 32, p. 4680–4687, ago. 2017.

SKOOG, D. .; HOLLER, F. .; NIEMAN, T. . **Princípios de Análise Instrumental**. 5ed. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, S.; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, S.; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, S. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1–51, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. v. 107, n. 3, 2016.

SOLIMAN, E. Z.; PRINEAS, R. J. Antihypertensive therapies and left ventricular hypertrophy. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 10, p. 79, 2017.

SPEAR, K. E.; DISMUKES, J. P. **Synthetic diamond: emerging CVD science and technology**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

STANKOVIĆ, D. M. et al. Sensitive and selective determination of riboflavin (vitamin B2) based on boron-doped diamond electrode. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 147, n. 6, p. 995–1000, 2016.

STOILJKOVIĆ, Z. Ž. et al. Voltammetric and square-wave anodic stripping determination of amlodipine besylate on gold electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 2288–2303, 2012.

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.

ŠVORC, L. et al. Sensitive electrochemical determination of amlodipine in

pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 728, p. 86–93, 2014.

ŠVORC, L.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 294–300, 2013.

SWAIN, G. M.; ANDERSON, A. B.; ANGUS, J. C. Applications of diamond thin films in electrochemistry. **MRS Bulletin**, v. 23, n. 09, p. 56–60, 29 set. 1998.

SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 345–351, 1993.

TIAN, F. et al. A tantalum electrode coated with graphene nanowalls for simultaneous voltammetric determination of dopamine, uric acid, L-tyrosine, and hydrochlorothiazide. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 6, p. 1611–1619, 2017.

VENKATESH, J. et al. Reverse phase high performance liquid chromatographic estimation of ramipril and amlodipine in pharmaceutical dosage form. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 208–211, 2013.

VISHNUVARDHAN, C. et al. RP-HPLC method for the simultaneous estimation of eight cardiovascular drugs. **Chromatographia**, v. 77, n. 3, p. 265–275, fev. 2014.

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

WANG, J. **Analytical Electrochemistry, Third Edition**. 3rd ed. ed. [s.l.: s.n.]

ZARGHI, A. et al. Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Il Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 789–792, set. 2005.

ZECEVIC, M. et al. Statistical optimization of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 22, n. 1, p. 1–6, fev. 2000.

ZEEB, M.; FARAHANI, H.; PAPAN, M. K. Determination of atenolol in human plasma using ionic-liquid-based ultrasound-assisted in situ solvent formation microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 11, p. 2138–2145, 1 jun. 2016.