



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME ROBERTO MANSANO

**POTENCIALIDADE ANALÍTICA DO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO NA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE ANTI-HIPERTENSIVOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS COM DOSAGENS
COMBINADAS**

Londrina
2017

GUILHERME ROBERTO MANSANO

**POTENCIALIDADE ANALÍTICA DO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO NA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE ANTI-HIPERTENSIVOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS COM DOSAGENS
COMBINADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

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

Londrina
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M286p Mansano, Guilherme Roberto.
Potencialidade analítica do eletrodo de diamante dopado com boro na
determinação simultânea de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas
com dosagens combinadas / Guilherme Roberto Mansano. – Londrina, 2015.
71 f. : il.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Boro – Teses. 3. Eletrodo de carbono –
Teses. 4. Medicamentos – Formas farmacêuticas – Teses. 5. Voltametria –
Teses. 6. Agentes hipotensores – Teses. I. Braz, Elen Julciléia Romão Sartori.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

GUILHERME ROBERTO MANSANO

**POTENCIALIDADE ANALÍTICA DO ELETRODO DE DIAMANTE
DOPADO COM BORO NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTI-
HIPERTENSIVOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS COM
DOSAGENS COMBINADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química, com ênfase em Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elen Julciléia Romão
Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Cesar Ricardo Teixeira Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de janeiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elen J. R. Sartori pela oportunidade, ensinamentos, paciência e amizade.

Agradeço muito aos meus pais, Silvia Elena Bernardes da Silva e William Roberto Mansano, pela ajuda incondicional, por estarem sempre ao meu lado durante as adversidades e me dando força e suporte para continuar lutando independente das dificuldades.

Agradeço a Fernanda pelo companheirismo, carinho, paciência e compreensão durante minha vida acadêmica.

Agradeço a todos os professores que tive durante minha vida, desde o ensino fundamental a graduação e pós-graduação, pois todos contribuíram de alguma forma para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer aos amigos de laboratório (Carlos, Camila, Jéssica) em especial a Ana Paula que me ensinou a trabalhar com os equipamentos, na rotina do laboratório e no auxílio do preparo de amostras.

Agradeço aos amigos do curso de química, de longa data, pelo companheirismo até os dias de hoje, como o Vanildo (Geva), Victor (Barba), Lincoln, Giovanni (Giow), Vitor (Phelps), Humberto (Física), Eduardo, Fer (Japa), Paulo César (Vacão).

Agradeço o pessoal do laboratório LEMA e LQCN pela convivência e pelas “festinhas” de aniversário no laboratório.

Por fim agradeço aos meus eternos amigos de república em que vivi uma das melhores épocas da minha vida (Gabriel, Morão, Valdir, Heric e Bigola).

É necessário sempre acreditar que um sonho é possível, que o céu é o limite e que você, truta, é imbatível (Mano Brown)

MANSANO, Guilherme Roberto. **Potencialidade analítica do eletrodo de diamante dopado com boro na determinação simultânea de anti-hipertensivos em formulações farmacêuticas com dosagens combinadas** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois novos métodos voltamétricos, simples e rápidos, para a determinação simultânea, de forma binária e ternária, dos anti-hipertensivos besilato de anlodipino (ANL), hidroclorotiazida (HCZ) e valsartana (VAL) em formulações farmacêuticas. Ambos os métodos utilizam um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) juntamente com técnicas voltamétricas com parâmetros experimentais e instrumentais otimizados, para investigar o comportamento eletroanalítico de cada anti-hipertensivo. Em voltametria cíclica foram observados picos de oxidação do ANL, HCZ e VAL em 0,780 V, 1,15 V e 1,40 V (vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl)), respectivamente, em solução tampão BR (pH 5,0). A relação linear I_{pa} vs $v^{1/2}$, mostrou que o processo de oxidação dos três fármacos, ANL, HCZ e VAL, é controlado por um processo difusional das espécies (transporte de massa). A voltametria de onda quadrada foi utilizada para construção das curvas analíticas, obtendo faixa linear de $4,9 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ANL e $1,9 \times 10^{-5} - 2,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL, em mistura binária, com limite de detecção de $7,6 \times 10^{-8}$ e $6,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ANL e VAL, respectivamente. Para a mistura ternária foi obtida faixa linear no intervalo de concentração de ANL $4,9 \times 10^{-7} - 7,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; HCZ $2,9 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e VAL $9,7 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $7,3 \times 10^{-8}$, $4,5 \times 10^{-7}$ e $7,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ANL, HCZ e VAL, respectivamente. Foram realizados estudos de interferentes, em que não foi observado interferência de matriz. Os resultados obtidos foram comparados com um método cromatográfico (CLAE) descrito na literatura, em que não houve diferença significativa entre os métodos. Os métodos propostos foram aplicados com sucesso em amostras farmacêuticas, apresentando resultados precisos e de preparo simples de amostras.

Palavras-chave: Eletrodo de diamante dopado com boro. Determinação simultânea. Voltametria. Anti-hipertensivos. Formulações farmacêuticas.

MANSANO, Guilherme Roberto. **Analytical potentiality of the boron-doped diamond electrode in the simultaneous determination of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations with combined dosages**. 2015. 71 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

In this work were developed two new voltammetric methods, simple and fast, for the simultaneous binary and ternary determination of antihypertensive amlodipine besylate (ANL) hydrochlorothiazide (HCZ) and valsartan (VAL) in pharmaceutical formulations. Both methods used a boron-doped diamond electrode (BDDE) along with voltammetric techniques with experimental and instrumental parameters optimized to investigate the electroanalytical behavior of each antihypertensive. By cyclic voltammetric were observed the oxidation processes of ANL, HCZ and VAL in 0.780 V, 1.15 V and 1,40 V (vs. Ag / AgCl (KCl 3.0 mol L⁻¹)), respectively, BR buffer (pH 5.0). The linear relationship I_{ap} vs $v^{1/2}$, showed that the oxidation process of the three drugs, ANL, HCZ and VAL, are controlled by a process of diffusion species (mass transport). The square wave voltammetry was used to construct the calibration curves, obtaining linear range of 4.9×10^{-7} - 2.9×10^{-5} mol L⁻¹ for ANL and 1.9×10^{-5} - 2.8×10^{-4} mol L⁻¹ to VAL in binary mixture, with a detection limit of 7.6×10^{-8} and 6.9×10^{-7} mol L⁻¹ for ANL and VAL, respectively. For the ternary mixture obtained in the linear range concentration range ANL 4.9×10^{-7} - 7.2×10^{-6} mol L⁻¹; HCZ 2.9×10^{-6} - 4.5×10^{-7} mol L⁻¹ and VAL 9.7×10^{-6} - 1.3×10^{-4} mol L⁻¹ with a detection limit of 7.3×10^{-8} , 4.5×10^{-7} and 7.2×10^{-7} mol L⁻¹ to ANL, HCZ and VAL, respectively. Interfering studies were performed, moreover, the results obtained using the proposed methods were compared to a chromatographic method described in literature (HPLC) wherein no significant difference between the proposed method and the comparative method. The proposed method was successfully applied in pharmaceutical samples presenting accurate and simple sample preparation results.

Keywords: boron-doped diamond electrode. Simultaneous determination. Voltammetry. Antihypertensives. Pharmaceutical formulations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fórmula estrutural do Besilato de Anlodipino..... 16
- Figura 2** – Fórmula estrutural da Hidroclorotiazida 23
- Figura 3** – Fórmula estrutural da Valsartana 27
- Figura 4** – Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR (pH 5,0) sem adição e com adição de ANL $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando um EDDB pré-tratado catodicamente a 40 mV s^{-1} 40
- Figura 5** – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 5,0) sem adição e com adição de (A) ANL $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) HCZ $9,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (C) VAL $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando um EDDB pré-tratado catodicamente a 40 mV s^{-1} 41
- Figura 6** – Mecanismo de oxidação proposto para ANL, HCZ e VAL empregando um EDDB pré-tratado catodicamente 42
- Figura 7** – Voltamogramas de onda quadrada obtido com o EDDB em superfície catódica e superfície anódica em solução tampão BR (pH 5,0) contendo ANL $9,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 43
- Figura 8** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR de diferentes valores de pH: 4,0, 5,0 e 6,0 de ANL $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $9,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em um EDDB pré-tratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 44
- Figura 9** – Voltamogramas cíclicos para (A) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ANL, (B) $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ HCZ e (C) $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ VAL em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 30, (e) 40, (f) 75, (g) 100, (h) 125, (i) 150, (j) 175, (k) 200 mV s^{-1} , obtido em solução tampão BR (pH 5,0) com EDDB pré-tratado catodicamente 46
- Figura 10** – Cronoamperogramas de (A) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ANL, (B) $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ HCZ e (C) $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ VAL em diferentes potenciais fixados, obtido em solução tampão BR (pH 5,0) com

- EDDB pré-tratado catodicamente. Inserido: a relação dos parâmetros lap vs. $t^{1/2}$ obtidos pela equação do Cottrel.....48
- Figura 11** – Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de ANL e VAL em um EDDB pré-tratado catodicamente em solução tampão BR (pH 5,0). Faixa linear de $4,9 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,9 \times 10^{-5} - 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e VAL respectivamente. Inserido: curvas analíticas de ANL e VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 50
- Figura 12** – Voltamogramas de onda quadrada para diferentes alíquotas de diferentes concentrações de (A) ANL (2–13: $4,9 \times 10^{-7} - 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de VAL e (B) VAL (2–11: $1,9 \times 10^{-5} - 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ANL em solução tampão BR (pH 5,0) empregando o EDDB pré-tratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 52
- Figura 13** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos da oxidação simultânea de ANL, HCZ e VAL em um EDDB pré-tratado catodicamente em solução tampão BR (pH 5,0). Faixa linear de (2 – 9): $4,9 \times 10^{-7} - 7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL, $2,9 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HCZ e $9,7 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$55
- Figura 14** – Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de (A) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de HCZ $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $39,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) VAL (2–9: $9,8 - 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e HCZ $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão BR (pH 5,0), empregando o EDDB pré-tratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 57
- Figura 15** – Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de (A) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de VAL $4,0 \times$

$10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e VAL (2–9: $9,8 - 190,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de HCZ $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e VAL (2–9: $9,8 - 190,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão BR (pH 5,0), empregando o EDDB prétratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$ 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais e condições experimentais para a determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL em mistura binária e ternária.	49
Tabela 2 – Resultados obtidos na determinação de ANL e VAL em mistura binária em doses combinadas utilizando o método voltamétrico (com EDDB) comparado com CLAE.	53
Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos para determinação de ANL e VAL segundo ERDEN, P.E. (VPD) e pelo método proposto (VOQ).	54
Tabela 4 – Resultados obtidos na determinação de ANL, HCZ e VAL em mistura ternária em doses combinadas utilizando o método voltamétrico (com EDDB) comparado com CLAE.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS	Alisquireno
ANL	Besilato de Anlodipino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATE	Atenolol
ATOR	Atorvastatina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BR	Britton-Robinson
CAP	Captopril
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CVD	Deposição a Vapor Químico
DPADSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Pulso Diferencial
DPR	Desvio Padrão Relativo
E_{ap}	Potencial de pico anódico
EC	Eletroforese Capilar
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
EDDB	Eletrodo de Diamante Dopado com Boro
EFM	Eletrodo de Filme de Mercúrio
ENA	Enalapril
EPR	Erro Padrão Relativo
ESC	Eletrodo saturado de calomelano
EZE	Ezetimiba
HCZ	Hidroclorotiazida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPHT	Alta Pressão e Alta Temperatura
LOS	Losartana
MDPO	Método derivada de primeira ordem
MES	Método por equação simultânea
MWCNT	Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas

NEB	Nebivolol Hidroclorida
OL	Olmesartana
PBS	Solução Tampão Fosfato
PTA	Pré-Tratamento Anódico
PTC	Pré-Tratamento Catódico
RAM	Ramipril
SWADSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução Anódica por Onda Quadrada
SWCNT	Nanotubo de Carbono de Parede Simples
TEL	Telmisartana
UV	Ultravioleta
VAL	Valsartana
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Besilato de Anlodipino	16
2.1.1	Métodos para determinação de Besilato de Anlodipino	17
2.2	Hidroclorotiazida	22
2.2.1	Métodos para determinação de Hidroclorotiazida	23
2.3	Valsartana	26
2.3.1	Métodos para determinação de Valsartana	27
2.4	Métodos para determinação simultânea de Besilato de Anlodipino e Valsartana	29
2.5	Métodos para determinação simultânea de Besilato de Anlodipino, Hidroclorotiazida e Valsartana	30
2.6	Eletrodo de diamante dopado com boro	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivo específico	35
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
4.1	Reagentes e soluções	36
4.2	Instrumentação	36
4.3	Procedimentos analíticos	37
4.4	Preparo das amostras	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Comportamento eletroanalítico de ANL, HCZ e VAL	40
5.2	Determinação simultânea de ANL e VAL em amostras binárias	49
5.3	Determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL em amostras ternárias	54
5.4	Teste de interferentes e recuperação de ANL, HCZ e VAL em amostras binárias e ternárias	61

6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma doença crônica determinada pela elevação dos níveis de pressão sanguínea, atingindo cerca de 20% da população brasileira adulta, reduzindo a qualidade e expectativa de vida. A pressão pode se elevar por vários motivos, mas principalmente porque os vasos sanguíneos se degeneram, oferecendo algum tipo de resistência ao fluxo sanguíneo. A hipertensão acomete, além dos vasos sanguíneos, coração, rins e cérebro. Com o passar dos anos, os vasos entram, naturalmente, em processo de envelhecimento, perdendo a capacidade de contração e dilatação. O sangue, ao realizar seu trajeto, exerce pressão sobre os vasos podendo rompê-los, causando complicações ao paciente. A dificuldade da passagem do sangue no coração, pode causar a angina, podendo ocasionar um infarto. No cérebro, o rompimento de um vaso pode causar um acidente vascular cerebral (AVC) ou “derrame cerebral”. Nos rins podem ocorrer alterações na filtração até a paralisação dos órgãos. Todas essas situações são graves e podem ser evitadas com o tratamento adequado e bem conduzido [1,2].

Outros fatores, além da idade, também podem influenciar o aumento dos níveis de pressão arterial como, tabagismo, obesidade, estresse, níveis altos de colesterol, sedentarismo, diabete, alimentação inadequada, etc. Além desses fatores de risco e sabendo-se que a incidência da hipertensão aumenta com a idade, conclui-se que a hipertensão é mais comum em adultos acima de 50 ou 60 anos. Os sintomas mais comuns aparecem quando a pressão sobe muito, podendo causar dores de cabeça, tonturas, fraqueza, dores no peito, entre outros [2].

A hipertensão é uma doença que não tem cura, mas pode ser controlada. O tratamento para o controle da hipertensão nem sempre significa o uso de medicamentos, a pessoa pode adotar um estilo de vida mais saudável, como a prática de exercícios físicos e alimentação saudável (sem consumo de alimentos gordurosos ou sal). Entretanto, por ser uma doença assintomática, na maioria das vezes, quando um paciente de idade mais avançada é diagnosticado com hipertensão, o tratamento geralmente é realizado à base de agentes anti-hipertensivos [2]. O anlodipino (ANL), hidroclorotiazida (HCZ) e valsartana (VAL) são anti-hipertensivos que atuam em locais distintos, comumente indicados e utilizados por pacientes hipertensos em estágios da doença considerados moderados ou graves. O tratamento à base de anti-hipertensivos pode ser feito em associação ou

em doses combinadas, quando o tratamento individual se apresenta insuficiente para o controle ideal da pressão arterial. As possíveis associações são feitas com fármacos de mecanismos de ação fisiológica distintas. Os comprimidos e cápsulas de anti-hipertensivos podem ser comercializados de forma individual, em que o paciente poderá tomar dois ou mais comprimidos no caso de um tratamento em associação, ou podem ser comercializados contendo dois ou mais princípios ativos no mesmo comprimido, sendo sua utilização mais prática. O ANL é um bloqueador do canal de cálcio, HCZ é um agente diurético e a VAL é um potente bloqueador específico do receptor de angiotensina II [3].

A combinação apropriada desses anti-hipertensivos tem grande importância farmacológica, assim como o controle do teor e dosagem adequada do medicamento utilizado, por ser fundamental para o sucesso do tratamento e minimizando os efeitos colaterais. A indústria farmacêutica utiliza-se de métodos analíticos descritos na farmacopeia para certificação da qualidade de amostras farmacêuticas comerciais. No entanto, o uso de associações de fármacos na mesma forma farmacêutica é uma prática relativamente nova, por isso há poucas metodologias nas farmacopeias que apresentam associações de dois ou mais fármacos. Assim, há um grande interesse no desenvolvimento e validação de métodos analíticos adequados para quantificação de anti-hipertensivos associados em formulações farmacêuticas e amostras biológicas como controle de qualidade [1,4-5].

A validação de um método analítico é um aspecto importante para garantia da qualidade analítica da amostra [6]. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, estimar a eficiência e a implementação de um método analítico para determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. No caso de uma metodologia não descrita em farmacopeias ou formulários, a metodologia será avaliada por diversos parâmetros, como especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez [7].

A maioria dos métodos utilizados pela indústria farmacêutica para a determinação do princípio ativo em formulações farmacêuticas (individual ou simultânea) não é totalmente adequada, devido ao alto custo de aquisição e

manutenção de equipamentos, elevado tempo de análise e emprego de solventes orgânicos de média ou alta toxicidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, de baixo custo e sensíveis para determinação de anti-hipertensivos.

As técnicas eletroanalíticas são bastante atrativas para o desenvolvimento de procedimentos analíticos em rotinas laboratoriais devido ao seu baixo custo, rapidez de aquisição dos resultados, fácil manuseio, além de dispensar o uso de reagentes orgânicos ou tóxicos. Essas técnicas mensuram apenas as moléculas eletroativas em uma determinada faixa de potencial de maneira muito sensível e específica, diminuindo o efeito de possíveis interferentes não eletroativos, tornando o tratamento da amostra mais fácil. Apresentam alta repetibilidade e exatidão do método selecionado, fornecendo dados para interpretação do comportamento eletroquímico do sistema [8-9]. A voltametria é uma técnica eletroanalítica que consiste basicamente na quantificação e identificação de analitos pela medida da corrente elétrica em função do potencial aplicado. A voltametria cíclica (VC) é uma técnica utilizada geralmente para investigação do comportamento eletroanalítico do analito, por ter grande alta corrente capacitiva, mas também pode ser utilizadas para quantificação. As técnicas de pulso como a voltametria de onda quadrada (VOQ) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) são mais adequadas para quantificação de analitos, pois são técnicas muito sensíveis, que permitem um baixo limite de detecção e quantificação. As técnicas de pulso são de grande importância no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos, pois possuem alta relação sinal ruído, rapidez nas análises, além de seletividade adequada. A VOQ destaca-se entre elas devido a sua alta velocidade de análise, tornando o método eficaz [9].

Os eletrodos de carbono são bastante utilizados em conjunto das técnicas voltamétricas pelas propriedades mecânicas e eletroquímicas adequadas para eletroanálise, apresentam ampla faixa de potencial, alta repetibilidade e reprodutibilidade, razoavelmente inertes quimicamente e possibilidade de modificação da superfície. No entanto alguns eletrodos, como o carbono vítreo (um dos mais utilizados), possui alta corrente de fundo, dificultando a obtenção de um baixo limite de detecção em procedimentos eletroanalíticos, além de ser passível a efeitos de adsorção, em especial de espécies orgânicas [10].

O eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) é um material sintetizado que possui ótimas propriedades para aplicação em eletroanálise na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos em diversas matrizes [11], como reportado em diversos trabalhos na literatura [12-17]. Esse eletrodo surge como alternativa frente aos eletrodos convencionais de carbono por apresentar vantagens físicas e químicas, como ampla janela de potencial de trabalho (-1,5 V até 2,5 V (vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹)) que depende do meio orgânico em análise e a quantidade de dopagem de boro, baixa e estável corrente de fundo, fraca adsorção de moléculas, alta estabilidade física e térmica, não necessita de modificação de sua superfície e apresenta repetibilidade e reprodutibilidade nos resultados obtidos. A ampla janela de potencial do EDDB permite uma análise simultânea mais adequada de compostos ao otimizar o sistema, visando a separação, repetição e boa definição dos picos de oxidação obtidos simultaneamente, como é reportado na literatura [18-23]. Outros eletrodos também podem ser utilizados em análises simultâneas, como o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono [24], porém sua janela de potencial é menor (até 1,5 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)), podendo ocasionar a diminuição do tempo de utilização desse tipo de eletrodo com aplicação de potenciais muito elevados. Dessa forma, o EDDB é o mais indicado para análises simultâneas, principalmente pela sua janela de potencial e estabilidade física em potenciais elevados.

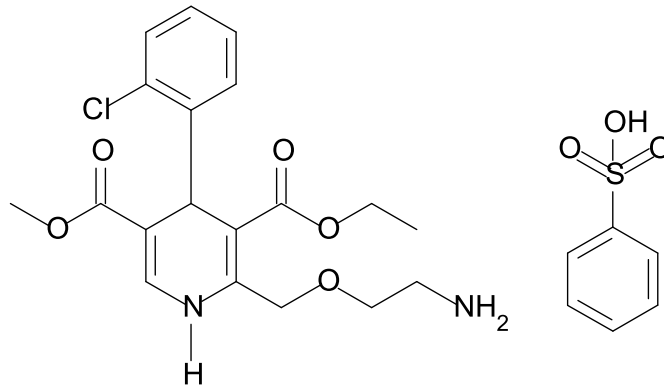
Segundo estudos realizados por SUFFREDINI et al. [25] o desempenho do EDDB, em relação ao sinal analítico, depende da terminação de sua superfície, podendo ser predominantemente em hidrogênio ou oxigênio. Esse tipo de superfície pode ser determinada por intermédio de um pré-tratamento eletroquímico, podendo condicionar o eletrodo a uma superfície hidrofílica (terminações em oxigênio), ao se empregar o pré-tratamento anódico (PTA), ou em superfície hidrofóbica (terminações em hidrogênio), ao utilizar o pré-tratamento catódico (PTC). Essa utilização e diferenças entre superfícies são relatados na literatura [25-31].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Besilato de Anlodipino

O Besilato de Anlodipino (ANL) (Figura 1) de fórmula molecular $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$ é um fármaco de primeira linha no tratamento da hipertensão, é um bloqueador seletivo dos canais de cálcio, inibindo o influxo de íons cálcio para o interior da musculatura lisa cardíaca e vascular, inibindo a contração muscular, causando uma redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente a pressão arterial.

Figura 1. Fórmula estrutural do Besilato de Anlodipino.



Na farmacopeia a identificação e determinação de ANL é realizada por espectrofotometria de absorção de infravermelho e por CLAE, respectivamente [4]. A cromatografia apesar de ser uma técnica bem estabelecida e muito utilizada, possui algumas desvantagens, como alto custo e necessita de utilização de solventes tóxicos. Dessa forma torna-se necessário o desenvolvimento de métodos adequados para determinação de ANL na forma individual ou de forma simultânea, no caso de formulações farmacêuticas combinadas em diferentes dosagens.

Os trabalhos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de ANL de forma individual ou simultânea, por meio de diferentes técnicas analíticas, estão descritos a seguir de forma sucinta.

2.1.1 Métodos para determinação de Besilato de Anlodipino

Em um trabalho descrito na literatura, EL-BAGARY, R. et al [32], propôs um método para a determinação simultânea por CLAE de hemifumarato de alisquireno (ALS), besilato de anlodipino (ANL) e hidrociorotiazida (HCZ) em formulações farmacêuticas. Utilizou-se acetonitrila: 0,025 mol L⁻¹ e ácido octano sulfúrico de sal mono-hidratado de sódio em água (60:40 v/v) na fase móvel. A taxa de fluxo foi mantida em 1,2 mL/min, na fase estacionária usando uma coluna C18. Eluição isocrática foi aplicada em toda a análise e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 232 nm a temperatura ambiente. A linearidade se mostrou adequada em concentrações de $8,1 \times 10^{-5} - 8,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ALS, $3,52 \times 10^{-6} - 7,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ANL e $1,34 \times 10^{-5} - 2,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de HCZ. Os limites de detecção e quantificação foram de $2,07 \times 10^{-6}$ e $7,16 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para ALS; $1,07 \times 10^{-7}$ e $3,56 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ANL e $1,75 \times 10^{-7}$ e $5,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para HCZ.

MOUSSA, B. et al [33] apresentou um trabalho desenvolvido para a determinação simultânea de ANL e atorvastatina (ATOR) por CLAE – com detecção espectrofluorimétrica por fluorescência. As espécies ANL e ATOR foram excitados no comprimento de onda de 361 e 274 nm e depois medidos em 422 e 369 nm respectivamente. Em cromatografia o tempo de retenção foi de 8 minutos em coluna C18 usando acetonitrila: tampão fosfato (0,015 M, pH 3) (45/55, v/v) em fase móvel. O intervalo de concentração obtido pelo método espectrofluorimétrico foi de $8,8 \times 10^{-7} - 1,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ANL e $8,9 \times 10^{-7} - 1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ATOR. Para o método cromatográfico o intervalo obtido foi de $8,8 \times 10^{-6} - 3,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para ANL e $8,9 \times 10^{-6} - 3,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para ATOR. O limite de detecção e de quantificação obtido método espectrofluorimétrico foi de $9,3 \times 10^{-8}$ e $2,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ANL, respectivamente, e $1,7 \times 10^{-7}$ e $5,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ATOR, respectivamente. Para o método cromatográfico o limite de detecção e quantificação foi de $1,5 \times 10^{-6}$ e $4,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para ANL, respectivamente, e $2,1 \times 10^{-6}$ e $6,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para ATOR, respectivamente.

Em outra pesquisa realizada, ARGEKAR, A.P. e POWAR, S.G. [34] desenvolveram um método para determinação simultânea de ANL e atenolol (ATE) pela técnica de cromatografia em camada fina de alta eficiência (CCDAE) em formulações farmacêuticas. Foi utilizado cloridrato de metileno:metanol:solução de amônia (25% NH₃) na proporção de (8,8:1,3:0,1: v/v) como fase móvel e placas

CCDAE (0,2 mm de espessura) pré-revestidas com gel sílica em folha de alumínio como fase estacionária. A detecção foi realizado por detector UV em comprimento de onda de 230 nm. Os fatores de retenção de ATE e ANL foram de 0,33 e 0,75 respectivamente. Na construção da curva analítica foi obtida uma faixa linear de $1,8 \times 10^{-5} - 8,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e $3,7 \times 10^{-5} - 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para ATE.

As técnicas cromatográficas possuem bons parâmetros para quantificação simultânea, pois ocorre a separação dos analitos dentro da coluna cromatográfica e ao chegar ao detector os analitos são quantificados com alta sensibilidade. No entanto essas técnicas possuem algumas desvantagens, como o alto custo de manutenção e utilização do equipamento, elevado tempo de análise, além de um alto consumo de solventes orgânicos e tóxicos ao meio ambiente, ocasionando a geração de resíduos que necessitam de um descarte adequado. Dessa forma se mostra necessário o desenvolvimento de métodos analíticos baseados em diferentes técnicas analíticas, visando uma análise com alta sensibilidade sem a geração e utilização de resíduos tóxicos para o meio ambiente.

Métodos espectrofotométricos para determinação de fármacos também estão presentes na literatura, como JAIN, N. [35] que desenvolveu um método para quantificação individual de ANL utilizando uma solução de acetato de sódio 2 mol L^{-1} como agente de solubilização hidrotópica. Em solução acetato houve uma melhora de 75 vezes na solubilidade do ANL em comparação com a solubilidade apenas em água destilada. O fármaco apresentou uma absorvância máxima em 365 nm e o acetato de sódio em 240 nm, portanto nenhuma interferência foi observada para a estimativa de ANL. Na faixa de concentração de $8,8 \times 10^{-5} - 4,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($R = 0,999$) segue a lei de Beer, com recuperação em torno de 97,8% – 100,16%.

PATIL, B.P. et al [36] desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação simultânea de Nebivolol hidrocloreto (NEB) e ANL. Por solubilização dos fármacos em metanol, o método envolve a análise da absorvância em dois comprimentos de onda, 280 nm e 239 nm, com absorvância máxima de NEB e ANL respectivamente. A lei de Beer é mantida em uma faixa de concentração de $2,2 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para NEB e $1,7 \times 10^{-5} - 7,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL. O limite de detecção e quantificação foi de $7,9 \times 10^{-7}$ e $2,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, para NEB e $3,8 \times 10^{-7}$ e $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, para ANL.

Em um outro método espectrofotométrico descrito na literatura, PAWAR, P.P. et al [37], desenvolveram dois métodos para determinação de ANL e telmisartana (TEL), o método por equação simultânea (MES) e o método por derivada de primeira ordem (MDPO). Para a construção das curvas analíticas uma quantidade adequada do fármaco foi dissolvido em ácido acético glacial e em seguida diluído com água destilada. O MES consiste na medida da absorbância em comprimentos de onda de 367 e 292 nm para quantificação de ANL e TEL e por meio dos parâmetros como absorvidade molar e absorbância máxima é calculado a concentração de cada fármaco. No MES a lei de Beer é mantida em $3,5 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e $9,7 \times 10^{-6} - 5,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para TEL, o limite de detecção foi de $2,8 \times 10^{-7}$ e $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e TEL, respectivamente. O segundo método (MDPO) consiste na análise da absorbância em 270 e 295 nm para determinação de ANL e TEL, em que a primeira derivativa é obtida por diferenciação eletrônica instrumental nos respectivos comprimentos de onda, assim um espectro não tem interferência sobre o outro. No MDPO a lei de Beer é mantida em $3,5 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e $9,7 \times 10^{-6} - 5,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para TEL, o limite de detecção foi de $3,2 \times 10^{-7}$ e $1,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e TEL respectivamente. O método foi validado para determinação de ANL e TEL em formulações combinadas.

As técnicas espectrofotométricas diferentemente das cromatográficas não possuem um alto custo de manutenção, porém também existe o alto uso de solventes orgânicos e não é uma técnica muito adequada para a análise simultânea, pelo fato de ocorrer a sobreposição das bandas espectrais dos analitos, podendo ter interferência dos analitos na real concentração. Assim a leitura dos analitos tem de ser feito em vários comprimentos de onda para se obter equações para assim poder calcular a real concentração dos analitos. Dessa forma a metodologia pode ter um elevado tempo de análise e de consumo de reagentes e solventes. Dessa forma mostra a necessidade do desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação de fármacos.

Métodos eletroanalíticos também estão presentes na literatura para determinação de ANL, porém existem poucos trabalhos contendo análises simultâneas.

GAZY, A.A.K [38] realizou a determinação de ANL por voltametria adsorptiva de redissolução anódica por onda-quadrada utilizando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) em amostras farmacêuticas e em fluidos biológicos. Foram

realizados estudos por voltametria cíclica em solução tampão BR (pH = 11,0), que resultaram um processo irreversível de oxidação de ANL, este processo envolve dois elétrons e seu controle se dá por adsorção. O pico de oxidação de ANL foi visto em 0,510 V (vs Ag/AgCl), com os parâmetros otimizados foi utilizado esse pico para a determinação do ANL. A faixa linear obtida foi de $4,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. No entanto o ECV apresenta baixa repetibilidade, mostrando a necessidade do desenvolvimento de um método eletroanalítico mais preciso.

SIKKANDER, A. MANISANKAR, P. VEDHI, C. [39] realizou estudos sobre comportamento voltamétrico de ANL utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT). Os resultados apontaram para um processo oxidativo irreversível e controlado por difusão das espécies até a superfície do eletrodo. Resultados também apontaram dependência do aumento do pH com o pico de oxidação, atingindo um máximo de corrente em pH 13 (solução tampão BR ajustado com KOH). Nesse pH os parâmetros foram otimizados e foi realizada a determinação. A faixa linear obtida foi de $1,77 \times 10^{-8} - 5,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto o limite de detecção foi de $1,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

GOYAL, R.N. e BISHNOI, S. [40] utilizaram técnicas voltamétricas para determinar eletroquimicamente ANL em eletrodo de grafite pirolítico, comparando diferentes modificações nesse eletrodo, a primeira modificação foi utilizando nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT), a segunda modificação foi utilizando nanotubo de carbono modificado de paredes múltiplas (MWCNT). As informações do comportamento eletroanalítico de ANL foi obtido pela voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada em tampão fosfato pH 7,2. Um maior pico de corrente e um potencial menos positivo foi observado no eletrodo modificado em relação ao eletrodo não modificado. Efeito do pH, velocidade de varredura e concentração do ANL foram examinados. Com os parâmetros otimizados foi obtido uma faixa linear de ANL de $5,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para ambos os eletrodos. O limite de detecção obtido foi de $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para o SWCNT, enquanto para MWCNT o limite de detecção foi $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. A comparação de atividade eletroanalítica entre os eletrodos apresentou uma maior sensibilidade 1,8 do SWCNT em comparação ao MWCNT. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas e em amostras de urina humana.

Os eletrodos modificados apresentam boas características como

sensibilidade e repetibilidade melhor que o ECV, porém não são adequados para análises em potenciais muito elevados, pois ocasiona o desgaste do filme assim diminuindo a vida útil do eletrodo.

Estudos por voltametria de onda quadrada foram realizados por STOILJKOVIC, Z.Z. et al. [41] para determinação de ANL em um eletrodo de ouro, e em um eletrodo de ouro modificado com nanotubo de carbono multiparedes (Au/MWCNT). Para as análises de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada foram utilizados soluções de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato (PBS) (pH 11,0), respectivamente. A faixa linear obtida por voltametria de onda quadrada foi de $2,6 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o potencial específico em que foi obtido o pico de oxidação do ANL foi de $0,75 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$)). O resultado foi comparado entre os eletrodos e mostrou um melhor desempenho catalítico no eletrodo de ouro do que no eletrodo de ouro modificado com nanotubo de carbono multiparedes em termos de atividade anódica. No entanto o tampão fosfato não apresenta o efeito tampão na faixa selecionada (pH 11,0), dessa forma o estudo é realizado em uma faixa de pH condicionado, sendo mais adequado a utilização de outro eletrólito suporte.

ŠVORC, L. et al [42] utilizou um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de ANL. Estudos por voltametria cíclica indica que a oxidação eletroquímica seja irreversível, com um pico de oxidação bem definido em $0,75 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$)) em solução tampão BR (pH 5,0). A reação de oxidação do ANL na superfície do eletrodo é controlada por difusão e indica a participação de dois elétrons no mecanismo. Utilizando a voltametria de pulso diferencial (VPD) nas condições otimizadas, na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-7} - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, foram encontradas duas linearidades, em $2,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$) e $6,0 \times 10^{-6} - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$), respectivamente. O limite de detecção obtido foi de $7,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O método foi aplicado com sucesso em amostras farmacêuticas com bons resultados analíticos.

A literatura mostra que determinações simultâneas estão sendo desenvolvidas, porém ainda existem poucos trabalhos publicados por técnicas voltamétricas para a determinação de ANL. Um dos trabalhos apresentados é o do DOGAN-TOPAL et al [43] que realiza a determinação simultânea de ANL com ATOR empregando um eletrodo de carbono vítreo juntamente com diferentes técnicas voltamétricas, como a VOQ e a VPD. O eletrólito de suporte selecionado foi o

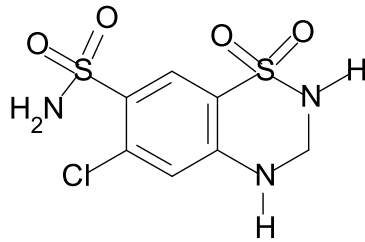
tampão BR (pH 5,0), o processo de oxidação de ambas as moléculas é controlado por difusão das espécies. A resposta linear da determinação foi de $4,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e $2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ATOR. O Limite de detecção foi de $8,1 \times 10^{-7}$ e $4,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL e ATOR, respectivamente. No trabalho apresentado por MOHAMMADI, A. et al. [44], realizaram a determinação simultânea de ANL e ATOR por VPD utilizando um eletrodo de pasta modificado com MWCNT, em solução tampão BR (pH 6,0). A faixa linear obtida foi de $4,4 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e $4,4 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ATOR. O limite de detecção obtido foi de $1,7 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e ATOR, respectivamente. Em comparação com o eletrodo de carbono vítreo, o eletrodo preparado apresentou um aumento na corrente de pico devido a alta área de superfície eletroativa e adequada condução eletrônica da pasta de nanotubo de carbono em multicamadas.

VALEZI, C.F. et al [24] desenvolveu um método para determinação simultânea de ANL e enalapril (ENA) por VOQ utilizando um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono de paredes múltiplas na presença do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Em voltametria de onda quadrada foram observados a presença de dois picos de oxidação em 0,790 V e 1,21 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) sendo do ANL e ENA, respectivamente. Em comparação com ECV, a análise por VOQ apresentou um pico de oxidação em 0,753 V para ANL e não foi observado pico de oxidação para ENA. Nas condições otimizadas, em solução tampão BR (pH 6,0) contendo $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB, foram construídas curvas de calibração na faixa linear de $5,8 \times 10^{-7} - 5,9 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ para ANL e $2,0 \times 10^{-6} - 5,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ENA. O limite de detecção obtido foi de $4,9 \times 10^{-8}$ e $8,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e ENA, respectivamente.

2.2 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCZ) (Figura 2) de fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$ é um diurético tiazídico utilizado no tratamento da hipertensão, geralmente utilizado em combinação com um anti-hipertensivo. Pode ser utilizado também para o tratamento de cirrose hepática, insuficiência cardíaca congestiva, além de edemas relacionados a várias formas de disfunção renal. Atua diretamente nos rins, aumentando a excreção de sódio e cloreto e, conseqüentemente, de água.

Figura 2. Fórmula estrutural da Hidroclorotiazida



Na farmacopeia a identificação e determinação podem ser realizadas por espectrofotometria de absorção no infravermelho e CLAE, ambos para análise individual de HCZ. Entretanto, como a HCZ é geralmente utilizada em combinação com outros anti-hipertensivos, tem-se a necessidade do desenvolvimento de métodos para determinação simultânea, além de que a cromatográfica é uma técnica de alto custo e utiliza demasiado tempo de análise [4].

A seguir estão descritos os trabalhos presentes na literatura, de forma objetiva, de maior relevância para a determinação de HCZ na forma individual ou simultânea, por meio de diferentes técnicas analíticas.

2.2.1 Métodos para determinação de Hidroclorotiazida

Na literatura estão presentes diversos métodos para determinação de HCZ de forma individual ou simultânea. EL-BAGARY, R. et al [32] desenvolveram um método para determinação de ALS, ANL e HCZ com base na técnica CLAE, como já citado na revisão. Outro método com base na cromatografia líquida foi desenvolvido por BELAL, F. et al [45] para determinação simultânea de ramipril (RAM) e HCZ em amostras farmacêuticas. A fase móvel consistia em acetonitrila:solução perclorato de sódio (0,1 mol L⁻¹) ajustado para pH 2,5 com ácido fosfórico (46:54 v/v), em uma taxa de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna LC-8. A detecção foi realizada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 210 nm. Foi obtida uma faixa linear de 1,1 × 10⁻⁵ – 1,1 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ para RAM e 2,0 × 10⁻⁶ – 4,7 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ para HCZ. O limite de detecção obtido foi de 4,3 × 10⁻⁷ e 7,7 × 10⁻⁸ mol L⁻¹ para RAM e HCZ, respectivamente.

CARLUCCI, G. et al [46] desenvolveram um método para a determinação simultânea de losartana (LOS) e HCZ em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) em amostras farmacêuticas comerciais. A fase móvel consiste em acetonitrila:tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0) (35:65, v/v) em um tempo de retenção de 1,0 mL min⁻¹ e a eluição de coluna monitorada em 230 nm. A faixa linear obtida foi de $7,1 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,7 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para LOS e HCZ respectivamente. O limite de detecção foi de $1,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para LOS e $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para HCZ.

Como já discutido na revisão, as técnicas cromatográficas, apesar de apresentarem algumas vantagens, possuem desvantagens como alto custo de manutenção e alta geração de resíduos orgânicos.

Determinações simultâneas utilizando-se a espectrofotometria estão presentes na literatura, como o trabalho de MEREY et al [47] em que apresenta o desenvolvimento de quatro métodos espectrofotométricos para determinação simultânea de ANL, olmesartana (OL) e HCZ, onde a determinação de ANL é feita em comprimento de onda de 364,6 nm de forma direta, sem que tenha a interferência de OL e HCZ, que apresenta faixa linear de $1,76 \times 10^{-5} - 1,41 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O primeiro método depende da determinação de OL e HCZ medindo a segunda derivativa da razão dos espectros em 254,4 e 338,6 nm, respectivamente, em que foi obtido uma linearidade de $1,16 \times 10^{-5} - 1,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para OL e $1,7 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para HCZ. O segundo método é a primeira derivativa do segundo divisor da razão dos espectros de OL e HCZ em 260 e 273 nm respectivamente, obtendo uma faixa linear de $1,16 \times 10^{-5} - 1,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para OL e $3,4 \times 10^{-5} - 1,34 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de HCZ. O terceiro método é baseado na técnica de resolução sucessiva de espectrofotometria, que consiste no método de subtração da razão quando OL e HCZ são ambos absorptivos em 260 nm, enquanto HCZ é medido usando a amplitude da primeira derivativa em 335,2 nm, em que a faixa linear de OL e de HCZ é de $1,16 \times 10^{-5} - 1,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. No quarto método a razão de espectros é obtido após que a constante é eliminada por meio de centralização da proporção dos espectros em 252 nm e 220 nm para OL e HCZ respectivamente, a faixa linear obtida é de $1,16 \times 10^{-5} - 1,16 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para OL e $3,4 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para HCZ. No entanto as análises simultâneas utilizando-se as técnicas espectrofotométricas necessitam de uma metodologia cautelosa, pois é necessária a leitura da mesma amostra em diversos comprimentos

de onda para evitar a interferência entre os analitos, pois existe a sobreposição das bandas espectrais.

Também contém na literatura diversos trabalhos sobre determinação analítica de fármacos por métodos voltamétricos. RAZAK, O.A. [48] desenvolveu um método para determinação individual de HCZ utilizando um eletrodo de carbono vítreo. Foi obtido um pico oxidação bem definido em um potencial de 1,04 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) em solução tampão BR (pH 3,3). Estudos por voltametria cíclica indicaram que o processo de oxidação é irreversível e é controlado por difusão das espécies (transporte de massa). Por meio da voltametria de pulso diferencial foi obtido uma faixa linear de $8,1 \times 10^{-8} - 1,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $1,7 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

SANTOS, M.C.G. et al [49] realizou a validação de um método para determinação simultânea de LOS e HCZ por voltametria em um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) em formulações farmacêuticas. O método consiste em análises de VC e VOQ, em que os voltamogramas apresentam dois picos de corrente elétrica bem definidos e controlados pelo processo de difusão das espécies a superfície do eletrodo. Esses picos apresentaram uma separação de 0,23 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) entre os analito em solução tampão Britton Robinson (pH 9,5) utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente. Foi estudado a influência do pH na separação dos picos. Sob as condições otimizadas o método voltamétrico apresenta faixa linear de $1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para LOS e $4,0 \times 10^{-6} - 8,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para HCZ, enquanto o limite de detecção é de $1,2 \times 10^{-6}$ e $9,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para LOS e HCZ respectivamente.

Também utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro, EISELE, A.P.P et al [50], desenvolveram um método para determinação simultânea de HCZ e valsartana (VAL) utilizando a VOQ. Nesse caso foi realizado o pré-tratamento catódico no eletrodo, para condicionar sua superfície em terminações em hidrogênio (hidrofóbica). A determinação foi realizada em solução tampão BR (pH 5,0). O processo de oxidação dos dois fármacos é controlado por difusão das espécies até a superfície do eletrodo, em que envolve 2 elétrons na oxidação de HCZ e 1 elétron para VAL. A faixa linear obtida foi de $1,97 \times 10^{-6} - 8,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para HCZ e $9,8 \times 10^{-6} - 2,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL. O limite de detecção foi de $6,4 \times 10^{-7}$ e $9,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para HCZ e VAL, respectivamente.

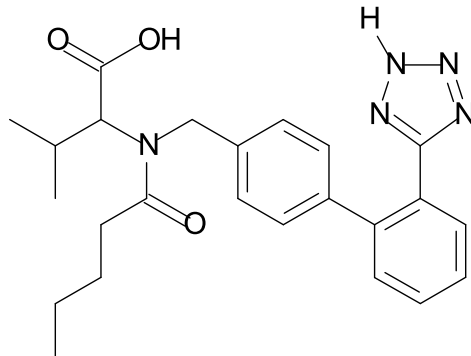
Os eletrodos de diamante dopado com boro apresentaram bons parâmetros como sensibilidade, precisão e exatidão. Como apresenta alta estabilidade, resistência e baixa corrente de fundo, esse eletrodo se apresentou adequado para análises simultâneas de fármacos.

GHOLIVAND, M.B. [51] desenvolveu um método para determinação simultânea de captopril (CAP) e HCZ em formulações farmacêuticas e amostras clínicas, utilizando um eletrodo de pasta de carbono com compósito de grafeno/ferroceno. Os perfis voltamétricos de CAP e HCZ foram investigados de forma individual e simultânea, com dois picos de oxidação bem definidos em 0,28 e 0,98 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)), respectivamente, em solução tampão fosfato (pH 7,0). Com a voltametria de pulso diferencial, nas condições otimizadas, foram construídas curvas de calibração na faixa linear de $1,0 \times 10^{-6} - 4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para CAP e $5,0 \times 10^{-7} - 3,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para HCZ. O limite de detecção foi de $8,7 \times 10^{-7}$ e $3,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para CAP e HCZ, respectivamente. Assim como os outros eletrodos modificados, este apresenta uma limitação para análises em elevados potenciais.

2.3 Valsartana

A valsartana (VAL) (Figura 3) de fórmula molecular C₂₄H₂₉N₅O₃ é um bloqueador do receptor da angiotensina II (AT₁), utilizado no tratamento da hipertensão. A angiotensina II, formada a partir da angiotensina I pela ECA (Enzima Conversora da Angiotensina), ao se ligar em seu receptor específico causa diversos efeitos fisiológicos, inclusive no controle da pressão arterial, como vasoconstritor e retenção de sódio. A valsartana como um antagonista dos receptores da angiotensina II, no músculo vascular liso e nas glândulas suprarrenais, promove o melhor controle da pressão arterial [1].

Figura 3. Fórmula estrutural da Valsartana



Na farmacopeia a identificação e determinação pode ser realizada por espectrofotometria de absorção no infravermelho (230 nm) e cromatografia líquida, ambos para análise individual de VAL. A cromatografia, apesar das vantagens analíticas, é uma técnica de alto custo e demasiado tempo de análise, além do uso de solventes considerados tóxicos. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de métodos adequados baseados em outras técnicas para determinação de VAL na forma individual e simultânea, no caso de formulações farmacêuticas combinadas.

A seguir serão descritos na literatura de forma sucinta os trabalhos mais relevantes para a determinação de VAL de forma individual ou simultânea, por meio de diferentes técnicas analíticas.

2.3.1 Métodos para determinação de Valsartana

Alguns métodos são relatados na literatura para determinação de VAL de forma individual ou simultânea. LAKSHMI, K.S. e SIVASUBRAMANIAN, L. [52] desenvolveram um método para determinação simultânea de VAL e ramipril (RAM) em mistura sintética por CLAE, utilizando uma coluna C18. A fase móvel consiste em acetonitrila:água destilada (55:45 v/v) com pH ajustado em 3,6 com 88% de ácido ortofosfórico. A determinação é realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 215 nm. A faixa linear obtida foi de $1,1 \times 10^{-4}$ – $5,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL e $2,4 \times 10^{-4}$ – $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para RAM. O limite de detecção obtido foi de $6,4 \times 10^{-8}$ e $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para VAL e RAM, respectivamente.

RAMACHANDRAN, S., MANDAL, B.K., NAVALGUND, S.G. [53]

utilizando a CLAE-FR desenvolveu um método para determinação de VAL e ezetimiba (EZE). Foi utilizado uma coluna C18, com fase móvel contendo acetonitrila:solução tampão fosfato (42:58 v/v pH 3,15) com fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção espectrofotométrica no comprimento de onda de 230 nm. A faixa linear obtida foi de $2,3 \times 10^{-6} - 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e $2,4 \times 10^{-6} - 4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para EZE. O limite de detecção obtido foi de $4,6 \times 10^{-7}$ e $7,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e EZE.

BRUNETTO, M. et al [54] descreve um método na literatura para a determinação simultânea de LOS, TEL e VAL por injeção direta de urina humana em coluna de comutação em sistema de CLAE com detecção por fluorescência. É necessária a utilização de uma pré-coluna como tratamento da amostra, já que a urina é injetada de forma direta. As análises em amostras de urina foram extraídas da matriz usando extração na fase sólida envolvendo pré-coluna embalada com $25 \mu\text{m}$ C18 com suporte de alquí-diól, solução 2% de metanol em 5 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 3,8), uma taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ para isolamento e pré-concentração de losartana, telmisartana e valsartana. Os analitos enriquecidos foram esvaziados para uma coluna analítica com uma mistura de tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 3,8):acetonitrila:metanol (65:20:15, v/v/v) em taxa de fluxo de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detectado em fluorescência de 259 e 399 nm em excitação e emissão respectivamente. A faixa de linear obtida foi de $1,3 \times 10^{-8} - 5,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para LOS, $6,0 \times 10^{-8} - 3,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e $1,0 \times 10^{-8} - 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para TEL. Os limites de detecção foram de $4,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para LOS, $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e $2,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para TEL.

Na literatura existem poucos métodos voltamétricos desenvolvidos para determinação individual de VAL, como YAN, J. et al [55] utilizou um eletrodo de filme de mercúrio (EFM) juntamente com a voltametria adsortiva de redissolução anódica por pulso diferencial (DPADSV) e onda quadrada (SWADSV). O eletrodo saturado de calomelano (ESC) foi utilizado como eletrodo de referência. A adsorção de VAL no eletrodo foi realizado em um potencial de 0,10 V (vs ESC) em solução tampão BR (pH 7,0). Com as condições instrumentais otimizadas, a faixa linear obtida foi de $6,0 \times 10^{-8} - 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL. Os limites de detecção $2,9 \times 10^{-9}$ e $3,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente para as técnicas de DPADSV e SWADSV.

No entanto o eletrodo de mercúrio, apesar de apresentar bons resultados, é um material altamente tóxico para o meio ambiente e pelo operador ao

manipulá-lo. Assim necessita de um descarte específico para evitar problemas mais graves.

GURLER, N. et al [56] desenvolveu um método para determinação de VAL utilizando um ECV em conjunto da DPADSV e SWADSV. Foi observado um processo oxidativo em 1,1 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) em solução tampão BR (pH 3,0) em VC, indicando que o processo seja irreversível, pois não tem pico na varredura reversa. A faixa linear obtida para determinação de VAL foi de $8,0 \times 10^{-7}$ – $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ quando utilizado a DPADSV e $5,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ quando empregado a SWADSV. Os limites de detecção obtidos foram de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para DPADSV e SWADSV, respectivamente.

2.4. Métodos para determinação simultânea de Besilato de Anlodipino e Valsartana

A determinação simultânea é uma prática que vem sendo desenvolvida em diversos métodos baseados em diferentes técnicas analíticas. A seguir serão descritos alguns dos trabalhos mais relevantes para a determinação simultânea de ANL e VAL.

ÇELEBIER, M. et al [57] desenvolveu um método para determinação simultânea de ANL e VAL em amostras farmacêuticas utilizando a CLAE. Foi utilizada uma coluna C18 para separação, a fase móvel consistia em uma mistura de solução tampão fosfato (pH 3,6; 0,01 mol L⁻¹):acetonitrila:metanol (46:44:10 v/v/v) usada para quantificação. As análises foram feitas em uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ em temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20 µL e o detector UV foi fixado em 240 nm. Nessas condições o tempo de retenção foi de 7,1 e 3,4 minutos para ANL e VAL respectivamente. A faixa linear obtida foi de $1,8 \times 10^{-7}$ – $8,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ANL e $1,1 \times 10^{-7}$ – $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL. Os limites de detecção obtidos foram de $8,8 \times 10^{-8}$ e $4,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para ANL e VAL, respectivamente.

ALNAJJAR, A.O [58] utilizou a eletroforese capilar (EC) para desenvolver um método para determinação simultânea de ANL e VAL em amostras farmacêuticas e plasma humano com detecção UV de fotodiodos. As condições otimizadas foram, 0,025 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 8,0), tempo de injeção de 10,0 s, voltagem de 25.000 V e coluna em temperatura de 25°C com detecção em 214 nm. A faixa linear obtida foi de $1,8 \times 10^{-6}$ – $6,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ANL e $2,2 \times 10^{-6}$ – $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL. Os limites de detecção obtidos foram

de $5,9 \times 10^{-8}$ e $6,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para ANL e VAL, respectivamente. Entretanto ao utilizar a EC é necessário um minucioso tratamento da amostra, pois um mínimo de interferentes pode interferir diretamente na sensibilidade e repetibilidade da análise.

Um estudo desenvolvido por MOHAMED, N.G. et al [59], utilizou-se a espectrofotometria para a determinação simultânea de ANL e VAL sem prévia separação. Nesse método o ANL em solução metanólica foi determinado, usando ordem zero, por espectrofotometria UV em 360 nm, sem alguma interferência de VAL. Enquanto a VAL é determinada pela primeira derivada da razão de espectros em 290 nm. A faixa linear obtida para foi de $1,4 \times 10^{-5}$ – $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para ANL e $4,6 \times 10^{-5}$ – $4,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para VAL. Os limites de detecção obtidos foram de $7,2 \times 10^{-6}$ e $9,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para ANL e VAL, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso, no entanto o método de determinação por derivativa possui algumas desvantagens, como a necessidade de fazer várias análises em diferentes comprimentos de onda, para tentar diminuir ao máximo a sobreposição dos espectros dos analítos.

Na literatura está presente apenas um método voltamétrico para determinação simultânea de ANL e VAL, que foi desenvolvido por ERDEN, P.E., TASDEMIR, I.H. e KILIÇ, E. [10] em que foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo. Em voltametria cíclica foi observado dois picos irreversíveis de oxidação em 0,95 e 1,15 V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) de ANL e VAL, respectivamente, em solução tampão BR (pH 5,0). Para a determinação foi utilizada a voltametria de pulso diferencial. A faixa linear obtida para foi de $1,8 \times 10^{-6}$ – $5,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ANL e $3,4 \times 10^{-6}$ – $7,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para VAL. Os limites de detecção obtidos foram de $5,5 \times 10^{-7}$ e $8,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para ANL e VAL, respectivamente. No entanto esse método apresenta algumas limitações, como alto desvio padrão relativo das análises e a linearidade não permite a determinação em todas as amostras presentes no mercado. Dessa forma é necessário o desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação simultânea de ANL e VAL.

2.5. Métodos para determinação simultânea de Besilato de Anlodipino, Hidroclorotiazida e Valsartana

Em um trabalho descrito na literatura, SHARMA et al. [60], utilizou a CLAE-FR, CCDAE e métodos detecção UV para determinação simultânea de ANL,

HCZ e VAL em diferentes dosagens e combinações em comprimidos. No método de CLAE-FR a separação foi feita utilizando a coluna C18 em solução tampão ortofosfato de di-hidrogenofosfato de potássio (50 mmol L^{-1} , pH 3,7) com 0,2% trietilamina como modificador e acetonitrila numa razão de 56:44 (v/v) na fase móvel. A determinação foi realizada por meio de um detector de arranjo de fotodiodos a 230 nm ao longo de um intervalo de concentração de $3,5 \times 10^{-6} - 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL, $1,68 \times 10^{-5} - 1,51 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HCZ e $4,5 \times 10^{-5} - 3,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de VAL. Para o método CCDAE, os fármacos foram separados usando acetato de etila:metanol:tolueno:amônia (7,5:3:2:0,8, v/v/v/v) como fase móvel. Em análise simultânea de espectrofotometria-UV foram utilizados três tipos diferentes de comprimentos de onda para mensurar a absorbância dos fármacos.

EL-GIZAWY et al [61] desenvolveu uma método simples e específico para determinação simultânea de ANL, VAL e HCZ por CLAE sem a etapas de preparação de amostras. Foi utilizado uma coluna cromatográfica em fase reversa C18, a fase móvel consistia em acetonitrila:solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com pH 2,8 na proporção de (40/60, v/v) em uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A determinação foi realizada utilizando um comprimento de onda de 227 nm. O tempo de retenção de cada fármaco foi de 2,26; 3,16 e 11,19 minutos para HCZ, ANL e VAL. O intervalo de concentração foi de $7,0 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL, $1,1 \times 10^{-5} - 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e $3,4 \times 10^{-6} - 4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para HCZ. O limite de detecção e de quantificação obtido foi de $1,8 \times 10^{-6}$ e $5,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL, $3,3 \times 10^{-6}$ e $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL e $1,3 \times 10^{-6}$ e $3,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para HCZ.

2.6 Eletrodo de diamante dopado com boro

O diamante é um material de propriedades únicas, como alta dureza e densidade atômica, estabilidade química, além de excelente constante dielétrica. Por essas e outras razões atraiu o interesse de pesquisadores para sua aplicação em diferentes áreas de pesquisa e desenvolvimento. Porém seu elevado custo de obtenção ainda era uma barreira para aplicação desse material como eletrodo. Com o desenvolvimento de tecnologias eficazes para a fabricação de filmes finos de diamante sintético, a partir de uma fase gasosa sob pressão e com o crescimento do filme em substratos, foi possível diminuir o custo do eletrodo, podendo esse ser

produzido em larga escala [11,62].

Os dois métodos mais utilizados para síntese do filme de diamante por deposição química são, a alta temperatura e pressão (HPHT (High Pressure/High Temperature)) e a partir da fase vapor (CVD (Chemical Vapor Deposition)). Com o empenho nos estudos para a síntese de filmes de diamante foi possível propor e aprimorar métodos visando a economia e versatilidade, que resultou no grande desempenho do processo CVD. Atualmente, esse método para crescimento dos filmes é o mais difundido por ser econômico e possuir manuseios simplificados, podendo ser produzido em série [63].

O diamante natural é um material isolante (com exceção do tipo IIb) com resistividade na ordem de $10^{16}\Omega\text{cm}$. No caso dos diamantes sintéticos produzidos pelo processo CVD, em que sua superfície é terminada em hidrogênio, a resistividade é diminuída a uma ordem de $10^6\Omega\text{cm}$, porém ainda é uma resistividade considerada muito alta para semicondutores. No intuito de crescer filmes de diamante com características semicondutoras, pesquisadores utilizaram o boro como dopante no processo de síntese do filme, sabendo que diamante natural IIb é um semicondutor do tipo *p* que contém boro. FUJIMORI et al [64] cresceu um filme de diamante dopado com boro sobre substrato de silício, onde obteve uma maior taxa de crescimento do filme e a diminuição da resistividade elétrica em função da concentração de boro utilizado como dopante. O boro é injetado no reator, proveniente do trimetilboro, simultaneamente com metano e hidrogênio na fase gasosa do processo CVD. Outros elementos também podem ser utilizados como dopantes, como o enxofre, fósforo e lítio [63].

O substrato utilizado para o crescimento do filme podem ser materiais como o tungstênio, molibdênio, titânio, grafite, nióbio entre outros, porém o silício tem a vantagem de ser um semicondutor que possui um coeficiente de dilatação próximo ao do diamante, isso o torna um dos substratos mais utilizados para crescimentos dos filmes de diamante [63].

Com o estabelecimento do EDDB, esse apresentou ampla possibilidade de aplicações em diversas áreas da ciência, por apresentar muitas vantagens frente a outros eletrodos, como estabilidade química e térmica, resistência a corrosão, baixa e estável corrente de fundo, fraca adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas, alta repetibilidade e reprodutibilidade de dados, e principalmente uma ampla janela de potencial em meio aquoso e não aquoso com

desprendimento de oxigênio em +2,5 e desprendimento de hidrogênio em – 1,5 V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)). Essas características distintas do EDDB mostra a superioridade frente aos eletrodos comumente utilizados, como o eletrodo de platina, carbono vítreo, pasta de carbono [11,65]. O eletrodo de diamante possui tamanha estabilidade que pode ser utilizado em elevados potencial para o tratamento de água, na degradação de poluentes como amônia, cianeto, fenol, clorofenóis, anilina, diversos corantes, álcoois entre outros [28,66].

O trabalho de PLESKOV et al [11] descreveu o comportamento eletroquímico e fotoeletroquímico dos filmes de diamante, em que concluiu que o filme de diamante não seja tão inerte quanto se pensava, e que as propriedades superficiais podem ser alteradas, sensivelmente, via pré-tratamento superficial. A partir dessa descoberta, diversos trabalhos foram realizados para elucidar alguns fenômenos relacionados a alteração superficial.

Foi visto que a superfície do EDDB pode ser terminada em oxigênio ou hidrogênio. A terminação em hidrogênio concede uma característica hidrofóbica, em que apresenta maior condutividade. Esse tipo de superfície, é característica de quando o EDDB é sintetizado pelo processo CVD, porém com o passar do tempo essa superfície pode ser oxidada e o eletrodo passa a não repetir ou reproduzir os dados obtidos. A superfície em oxigênio apresenta um caráter hidrofílico, em que apresenta menor condutividade. Esse tipo de superfície pode ser obtida por meio de um pré-tratamento, o pré-tratamento anódico (PTA) ocasiona a oxidação da água, produzindo terminações em oxigênio, e o pré-tratamento catódico (PTC) que provoca a redução da água, produzindo terminações em hidrogênio. As superfícies condicionadas do eletrodo são reversíveis, podendo recuperar a superfície desejada aplicando o pré-tratamento adequado [25,27,30]. A realização do pré-tratamento anódico seguido do catódico é utilizado para limpar a superfície do eletrodo, oxidando qualquer espécie que possivelmente possa estar adsorvida superficialmente no filme.

Sobre as eventuais aplicações eletroquímicas do EDDB modificado superficialmente, YAGI et al [67], demonstrou que a superfície pode ser oxidada por meio do tratamento anódico, em que mostrou uma alteração da estrutura local do filme, além da retirada da camada superficial de hidrogênio. No entanto o PTA não exercia um efeito intenso na camada sub-superficial. Com essa possibilidade de introduzir espécies oxigenadas, de modo temporário ou definitivo, pode-se promover

o desenvolvimento de sensores e biossensores, por implementar alguma seletividade em algumas reações e quantificações, ou servir para imobilização superficial de espécies biológicas. Um indicativo da presença de grupos carboxílicos negativamente carregados na superfície do filme, é o aumento da reação de transferência de carga com a diminuição do pH. Entretanto com o aumento da relação C/O na superfície do filme, torna-se mais lenta a cinética do processo oxidativo de alguns pares redox, pelo fato de ter menos partículas oxigenadas disponíveis [63].

O conhecimento sobre o pré-tratamento adequado é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. Em alguns casos o pré-tratamento anódico se mostrou mais seletivo em algumas determinações [17,21,49]. Entretanto na maioria dos casos de análises de moléculas, o pré-tratamento catódico se apresentou com melhor perfil de análise, principalmente em repetibilidade e magnitude de corrente [13,16,22]. SUFFREDINI et al [25] observou essa característica de melhor desempenho, de magnitude de corrente, do pré-tratamento catódico. Esse comportamento foi relatado em trabalhos realizados pelo nosso grupo de trabalho, em que o PTC obteve maior sinal de corrente elétrica, além de melhor repetibilidade em comparação ao PTA [19, 50]. Por espectroscopia Raman foi possível afirmar que nenhuma mudança ocorreu na estrutura do EDDB devido a utilização do pré-tratamento. É indicado a realização do pré-tratamento apenas uma vez durante o dia de trabalho, assim assegurando a qualidade e reprodutibilidade entre as análises [26].

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver dois métodos voltamétricos para determinação simultânea de ANL e VAL (amostra binária) e de ANL, HCZ e VAL (amostra ternária) em formulações farmacêuticas em diferentes dosagens, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro mediante tratamento catódico.

3.2. Objetivos específicos

Investigar o comportamento voltamétrico de cada anti-hipertensivo, de forma individual e simultânea, utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro;

Avaliar os pré-tratamentos eletroquímicos: anódico e catódico, sobre o BDDE;

Utilizar as técnicas de pulso com os parâmetros otimizados para a construção de curvas de calibração, avaliando-se: sensibilidade e limite de detecção, intervalo linear de concentração, repetibilidade inter-dia e intra-dia;

Proposição de mecanismos de reação para cada analito;

Aplicação dos procedimentos voltamétricos desenvolvidos em amostras reais: formulações farmacêuticas;

Comparação dos resultados obtidos pelo método proposto e pelo método comparativo (cromatografia).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções empregadas nos experimentos foram preparadas a partir de reagentes comerciais de grau analítico e foram preparadas com água destilada e deionizada, purificada em um sistema Milli-Q (Millipore®). Os reagentes empregados foram anlodipino (como besilato), hidroclorotiazida, valsartana e ácido sulfúrico, obtidos da Sigma-Aldrich; ácido fosfórico, ácido orto-fosfórico, etanol e metanol foram adquiridos da Merck; ácido acético, hidróxido de sódio e ácido bórico foram obtidos da Synth; acetonitrila e metanol de grau HPLC foi obtido da LiChrosolv®.

Para as amostras foram utilizadas cápsulas e comprimidos das combinações de ANL e VAL (amostra binária) e de ANL, HCZ e VAL (amostra ternária) em todas as dosagens presentes no mercado popular. Para a amostra binária as dosagens utilizadas foram de 5 mg/ 80 mg, 10 mg/ 160 mg e 5 mg/ 320 mg de ANL e VAL respectivamente. Para a amostra ternária foram utilizadas as dosagens de 5 mg/ 12,5 mg/ 160 mg, 10 mg/ 12,5 mg/ 160 mg, 5 mg/ 25 mg/ 160 mg, 10 mg/ 25 mg/ 160 mg de ANL, HCZ e VAL respectivamente. Para o ANL (como besilato) 6,9 mg e 13,9 mg é equivalente a 5 mg e 10 mg de Anlodipino. Todas as cápsulas e comprimidos foram adquiridos em drogarias da cidade de Londrina, Estado do Paraná, Brasil.

Soluções estoque de ANL, HCZ e VAL foram preparadas em etanol (para amostra binária) e em metanol (para mistura ternária) na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A solução de trabalho foi preparada diariamente onde alíquotas da solução estoque foram diluídas em solução tampão BR (pH 5,0). O tampão BR, que foi selecionado como eletrólito de suporte, foi preparado pela mistura do ácido acético, orto-fosfórico e bórico na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Ao final o pH é ajustado por adição de hidróxido de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2. Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PalmSens PC gerenciado pelo programa PalmSens PC.

Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula de vidro de compartimento único de 15 mL equipada com uma tampa de Teflon®, contendo orifícios para o posicionamento de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e uma placa de platina de 0,5 cm de largura e 1 cm de comprimento, respectivamente. O eletrodo de trabalho utilizado nas medidas voltamétricas foi um eletrodo de diamante dopado com boro (dopado com 8000 ppm) com área geométrica de 0,25 cm², fabricado pelo Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique AS (CSEM), em Neuchatêl, Suíça. Esse eletrodo foi sintetizado sobre um substrato de silício pela técnica de HFCVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), cuja fase gasosa consistia em metano (CH₄), com excesso de hidrogênio (H₂) e trimetilboro como gás de dopagem [68]. Antes dos experimentos, o EDDB foi pré-tratado anodicamente e catodicamente em uma solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, por aplicação de 0,5 A cm⁻² durante 30 s, e posterior aplicação de -0,5 A cm⁻² durante 120 s, em um potenciostato MQPG-01 (Microquímica). Dessa forma, a superfície do EDDB foi predominantemente terminada em hidrogênio [25,26,29].

As medidas de pH das soluções empregadas nesse trabalho foram feitas utilizando-se um pHmetro Hanna Instruments, modelo HI-221 e um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externa de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)

Para a determinação dos anti-hipertensivos por CLAE foi utilizado o equipamento LC Thermo Electron Corporation Finningan Suveyor PDA juntamente com a coluna C18 ACE 5 (250 x 4,6 mm, 5 µm).

4.3. Procedimentos analíticos

A voltametria cíclica (VC) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) foram utilizadas para investigar o comportamento voltamétrico do ANL, HCZ e VAL e a sua quantificação simultânea em formulações farmacêuticas. As análises voltamétricas foram realizadas da seguinte forma, adição da solução estoque na célula voltamétrica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0), seguido de agitação por um minuto. Passado o tempo de agitação, a análise voltamétrica era realizada. Esse procedimento era realizado em triplicata, assim utilizando-se a última medida para construção dos voltamogramas.

A curva analítica simultânea foi obtida pela adição de alíquotas da

solução padrão de ANL $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, HCZ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão BR (pH 5,0) e 200 μL de etanol (solução binária) ou metanol (ternária). Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após cada alíquota adicionada. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir das seguintes relações: $\text{LD} = 3\text{SB}/b$ e $\text{LQ} = 10\text{SB}/b$, respectivamente, onde SB corresponde ao desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b é o valor do coeficiente angular da respectiva curva analítica [69].

Para o teste dos interferentes, diversos excipientes foram avaliados, como celulose microcristalina, dióxido de silício, dióxido de titânio e estearato de magnésio nas faixas de concentração (solução padrão:composto interferente) de 1:1, 1:10 e 10:1 (m/m).

4.4. Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado através da quantidade dos analitos em mol L^{-1} indicado no rótulo do medicamento. Foi utilizada a massa da VAL como referência para o preparo da solução teórica de VAL $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, logo pela proporção contida no comprimido foi possível concentração teórica de ANL e HCZ. No caso do comprimido 5 mg/ 80 mg de ANL e VAL, respectivamente, a média da massa dos comprimidos pesados foi de 0,0907 g, equivalente a $1,836 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de VAL, dessa forma para preparar uma solução de VAL $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ uma massa de 0,0247 g foi pesada e adicionada a um balão volumétrico de 5 mL e completado com etanol, sem a necessidade de filtrar a amostra. Pela proporção contida no comprimido, teoricamente a solução contida no balão volumétrico possui a quantidade de $6,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL, com a adição de 100 μL dessa solução a célula voltamétrica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0) a quantidade teórica de ANL e VAL foi de $6,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, esses valores são encontrados dentro da linearidade da curva analítica apresentada pelo método proposto. Essa forma de calcular a massa pesada do comprimido macerado para o preparo de solução foi utilizada para os demais medicamentos em outras dosagens.

Para a solução binária, foram utilizadas alíquotas de 50 e 100 μL para a medida das amostras de 10 e 5 mg de ANL respectivamente. Essas alíquotas

foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0) enquanto para amostra ternária foi adicionada à célula eletroquímica apenas uma alíquota de 50 µL. Os voltamogramas foram obtidos e a concentração de cada anti-hipertensivo foi determinada utilizando a curva analítica correspondente a cada analito.

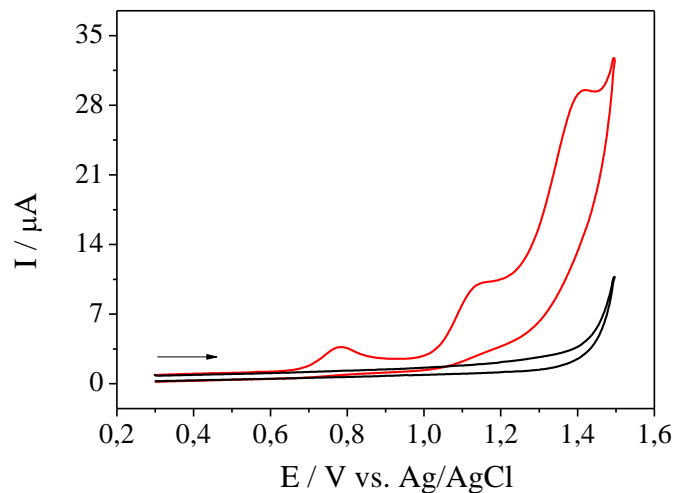
Para as análises em CLAE, as cápsulas e comprimidos foram macerados e pesados, em que uma certa quantidade adequada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com metanol de grau HPLC. Os anti-hipertensivos foram separados isocraticamente pela coluna em uma fase móvel que consistia em acetonitrila-metanol-tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹) pH 3,6 na proporção de (44:10:46 v/v/v). A curva analítica foi construída por injeções de alíquotas de 20 µL em concentrações diferentes e monitorado em comprimento de onda de 243 nm. Os picos do tempo de retenção foram encontrados em 2,5; 4,7 e 9,5 min para ANL, HCZ e VAL respectivamente [57].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comportamento eletroanalítico de ANL, HCZ e VAL

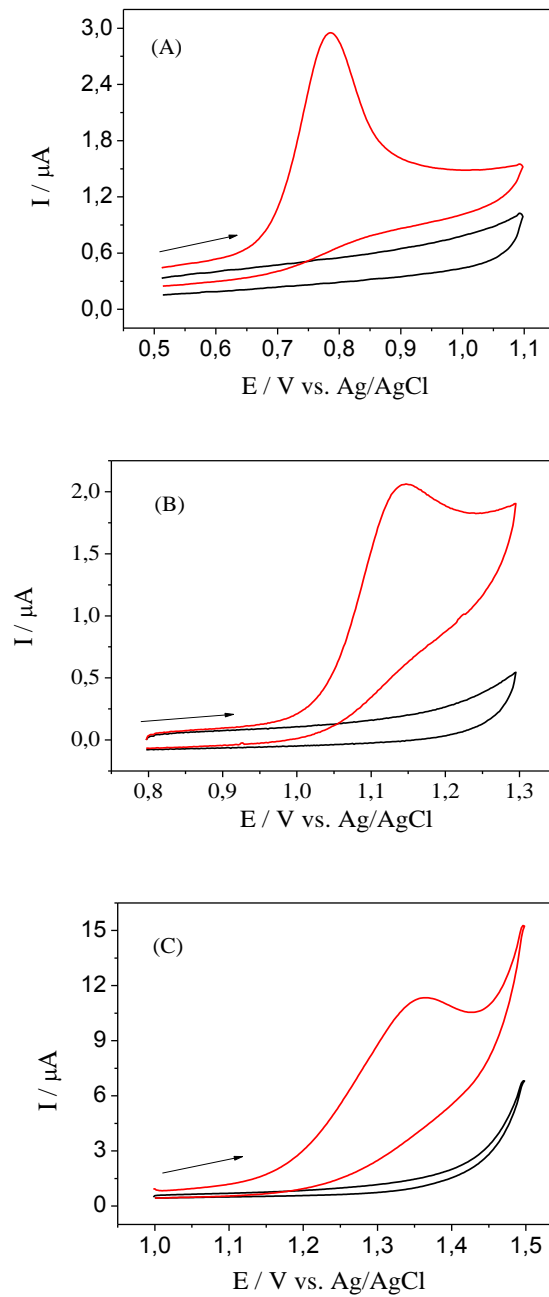
Inicialmente foi investigado o comportamento voltamétrico e a eletroatividade dos analitos utilizando-se a VC em tampão BR (pH 5,0). A Figura 4 apresenta o voltamograma do comportamento oxidativo simultânea de ANL, HCZ e VAL em um EDDB pré-tratado catodicamente. É possível observar a presença de três picos de oxidação bem definidos na análise simultânea proveniente de cada um dos analitos. Os valores dos potenciais de pico de cada analito são distintos, assim é possível a determinação simultânea por não haver interferência entre os picos.

Figura 4. Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR (pH 5,0) sem adição (—) e com adição (—) de ANL $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a 40 mV s^{-1} utilizando um EDDB pré-tratado catodicamente.



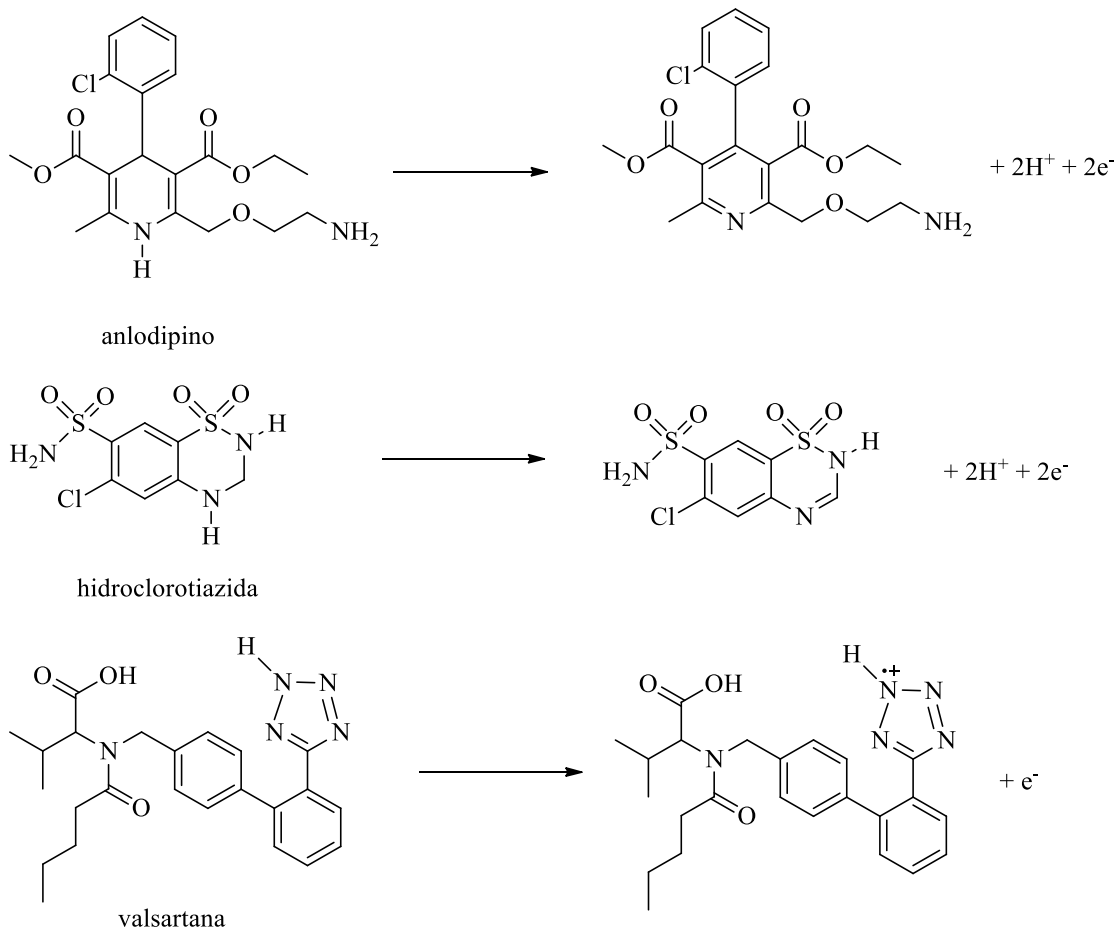
Por não ser observado nenhum pico de redução na varredura reversa da VC nos voltamogramas individuais, pode-se afirmar que os três processos oxidativos presentes são irreversíveis. Com a realização de análise individual dos analitos por voltametria cíclica, é possível discernir que o pico oxidativo em 0,781 V, 1,16 V e 1,37 V pertence ao ANL, HCZ e VAL, respectivamente, como mostrado na Figura 5.

Figura 5. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 5,0) sem adição (—) e com adição (—) de (A) ANL $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) HCZ $9,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (C) VAL $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a 40 mV s^{-1} , utilizando um EDDB pré-tratado catódicamente.



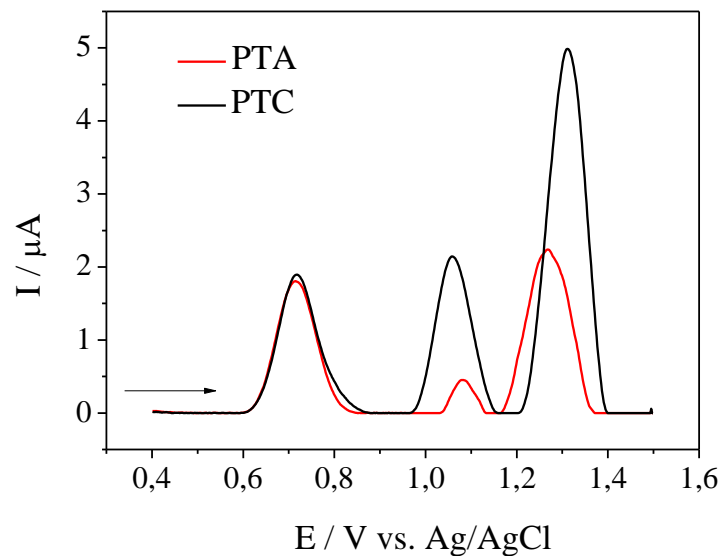
Utilizando os voltamogramas cíclicos individuais dos analitos (Figura 5), pode ser estimado o número de elétrons transferidos em cada processo oxidativo de ANL, HCZ e VAL por meio da aplicação da equação: $E_{ap} - E_{ap/2} = 47,7 \text{ mV}/\alpha n$ [70], considerando que $\alpha = 0,5$ (usado para sistemas totalmente irreversíveis[12]). O valor de $E_{ap} - E_{ap/2}$ foi de 0,050 V, 0,050 V e 0,10 V para ANL, HCZ e VAL, respectivamente, com esses valores multiplicados por α foi obtido 0,025; 0,025 e 0,5 respectivamente. Ao dividir por 0,0477 V foi possível estimar o número de elétrons estimado para oxidação de ANL, HCZ e VAL, que foi de 2, 2 e 1, respectivamente. Com isso foi possível propor um mecanismo de oxidação de cada analito, apresentado na Figura 6.

Figura 6. Mecanismo de oxidação proposto para ANL, HCZ e VAL empregando um EDDB pré-tratado catodicamente.



Como a superfície do EDDB pode influenciar na intensidade da atividade catalítica dos analitos, foi realizado o estudo do efeito do pré-tratamento anódico e catódico, comparando a superfície hidrofílica (PTA) e hidrofóbica (PTC) do EDDB, utilizando a VOQ para análise simultânea de ANL, HCZ e VAL (Figura 7). Para as duas superfícies foram observados três picos de oxidação, porém o EDDB em superfície catódica apresentou maior magnitude de corrente elétrica para os três analitos do que em superfície anódica, em uma proporção de 5,0%, 375% e 123% para ANL, HCZ e VAL, respectivamente.

Figura 7. Voltamogramas de onda quadrada obtido com o EDDB em superfície catódica (—) e superfície anódica (—) em solução tampão BR (pH 5,0) contendo ANL $9,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



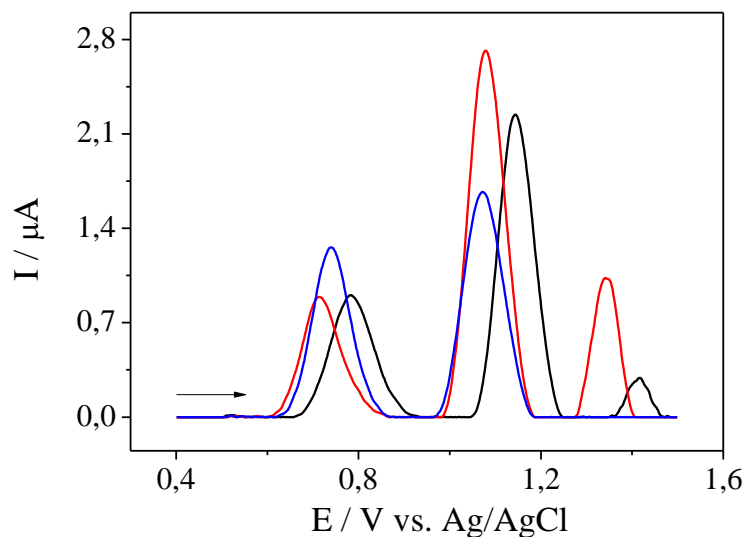
Esse comportamento indica que o eletrodo com terminações em hidrogênio (hidrofóbico) proporciona maior magnitude de corrente do que o eletrodo com terminações em oxigênio (hidrofílico), esse comportamento é observado em diversos trabalhos realizados com o EDDB [13,16,19,22,50], isso pode ser devido a maior afinidade de moléculas orgânicas com a superfície catódica, provocado por um alto coeficiente de difusão do processo de oxidação, causando o aumento da magnitude de corrente [63].

Por possuir melhor resposta voltamétrica, o pré-tratamento catódico foi escolhido para análises posteriores. Da mesma forma como apresentado por

Suffredini et al. [25,26], o pré-tratamento foi realizado apenas uma vez durante o dia de trabalho (antes das análises voltamétricas), assim apresentou adequada repetibilidade nos resultados para ANL, HCZ e VAL durante o dia de trabalho.

O estudo da influência do pH no comportamento eletroquímico de ANL, HCZ e VAL foi estudado utilizando-se a VOQ na faixa de pH de 4,0 a 6,0 usando solução tampão BR (Figura 8). Para o estudo foram utilizados valores de pH na faixa de 4,0 a 6,0, devido a solubilidade da VAL diminuir em $\text{pH} < 4,0$ e em $\text{pH} > 6,0$ não é observado o processo oxidativo do mesmo. Os resultados obtidos apresentam maior corrente de pico anódico (I_{pa}) em pH 5,0 para HCZ e VAL, enquanto para ANL obteve-se maior I_{pa} em pH 6,0. No entanto, em pH 5,0 os sinais analíticos apresentaram melhor repetibilidade e maior corrente elétrica, dessa forma esse valor de pH foi escolhido para os posteriores experimentos.

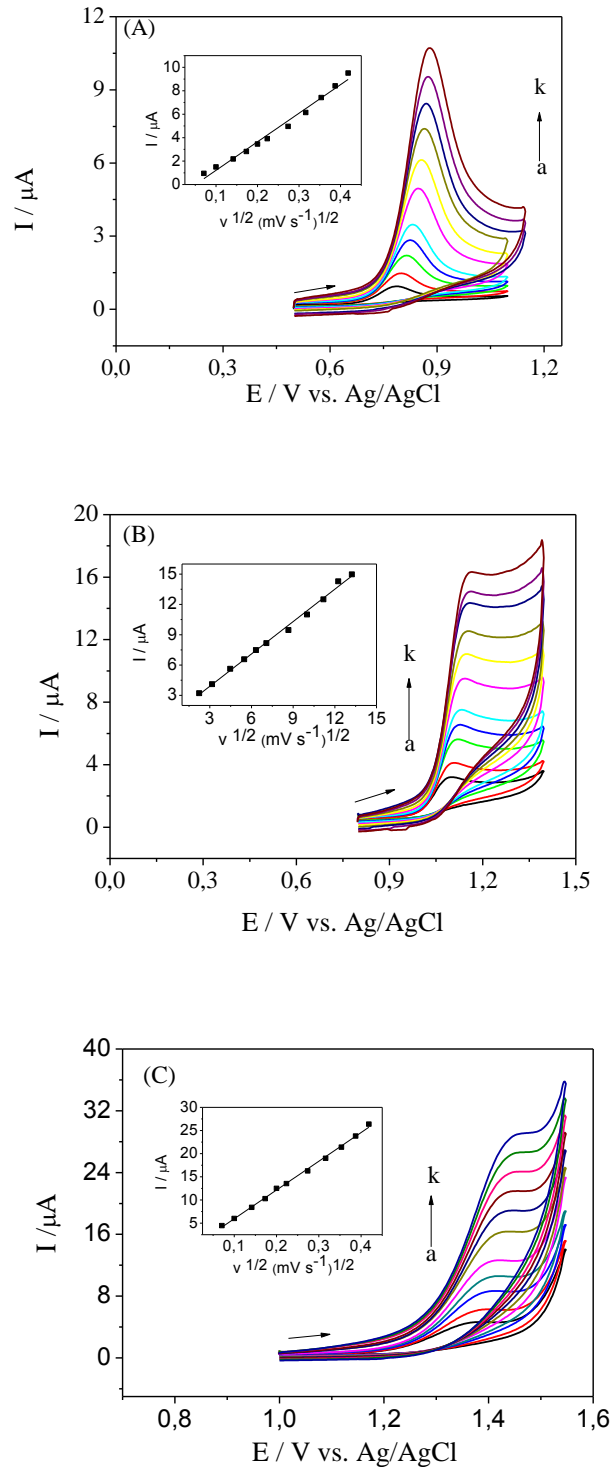
Figura 8. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR de diferentes valores de pH: 4,0 (—), 5,0 (—) e 6,0 (—) de ANL $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; HCZ $9,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em um EDDB pré-tratado catodicamente. Mesmos parâmetros de VOQ indicado na Figura 7.



O efeito do eletrólito de suporte na atividade catalítica dos anti-hipertensivos foi investigado utilizando as soluções tampão fosfato, acetato e BR, todos em pH 5,0. Os resultados não apresentaram diferença significativa em termos de magnitude de corrente elétrica, porém a solução tampão BR pH 5,0 apresentou maior repetibilidade entre as medidas, assim foi utilizado esse eletrólito suporte para posteriores análises. Diante dos resultados obtidos por VC e VOQ, como a separação dos picos oxidativos, diferença do valor do potencial entre os três picos de oxidação, repetibilidade e intensidade dos picos de corrente elétrica, torna-se possível a determinação simultânea e o entendimento do comportamento eletroquímico de ANL, HCZ e VAL empregando o EDDB pré-tratado catodicamente em solução tampão BR pH 5,0.

O estudo do aumento da velocidade de varredura de VC na oxidação de ANL, HCZ e VAL (Figura 9) foi realizado, para o melhor entendimento físico-químico sobre o processo oxidativo dos anti-hipertensivos empregando o EDDB com superfície catódica em solução tampão BR pH 5,0. Foram realizadas análises voltamétricas em diferentes velocidades, no intervalo de 5 – 200 mV s^{-1} . Foi obtida uma dependência linear do pico de corrente anódica com a raiz da velocidade de varredura (inserido na Fig. 9A, 9B e 9C) para ANL, HCZ e VAL, como apresentado nas equações obtidas: $I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = -1,4 + 0,81 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$ ($r = 0,981$); $I_{\text{HCTZ}} (\mu\text{A}) = 0,59 + 1,1 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$ ($r = 0,995$) e $I_{\text{VAL}} (\mu\text{A}) = -0,54 + 2,0 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$ ($r = 0,998$). Essa dependência linear indica que o processo oxidativo é controlado (etapa determinante) por difusão das espécies (transferência de massa) do seio da solução até a superfície do EDDB [71].

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para (A) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ANL, (B) $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ HCZ e (C) $9,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ VAL em diferentes velocidades de varredura (v): (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 30, (e) 40, (f) 75, (g) 100, (h) 125, (i) 150, (j) 175, (k) 200 mV s^{-1} , obtido em solução tampão BR (pH 5,0) com EDDB pré-tratado catodicamente.

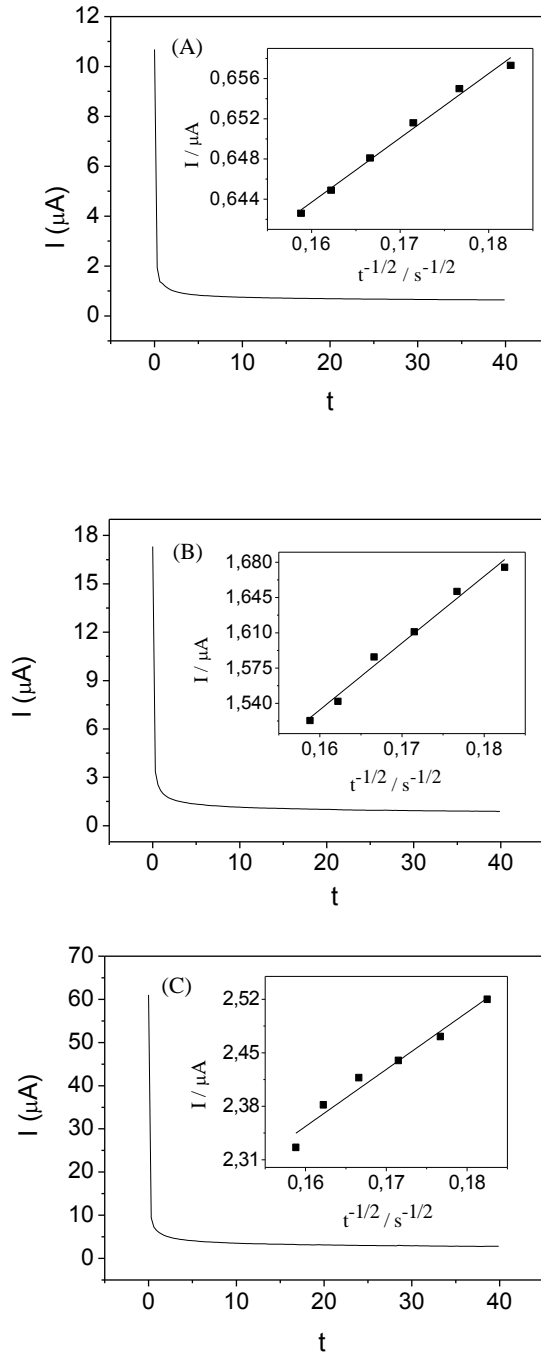


Para o melhor entendimento sobre o processo difusional que ocorre na superfície do EDDB pré-tratado catodicamente, foi mensurado o coeficiente de difusão de ANL, HCZ e VAL por estudos cronoamperométricos de forma individual, como mostra a Figura 10. Os potenciais foram fixados em 0,79 V (ANL), 1,20 V (HCZ) e 1,40 V (VAL) em solução tampão BR (pH 5,0) com adição de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (ANL), $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (HCZ) e $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (VAL) em um tempo de análise de 40 s. Os parâmetros de I_{ap} vs. $t^{1/2}$ foram utilizados para se calcular o coeficiente de difusão dos analitos através da equação de Cottrel [70].

$$I_{ap} = \frac{nFAC_o D_o^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde I_{ap} é a corrente elétrica, n o número de elétrons ($n = 2$ para ANL e HCZ; $n = 1$ para VAL), F é a constante de Faraday (96480 C mol^{-1}), C_o é a concentração do analito (mol cm^{-3}), D_o o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), e A é a área geométrica do EDDB ($0,25 \text{ cm}^2$). Os resultados obtidos de D_o foram de $5,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (ANL), $1,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (HCZ) e $6,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (VAL).

Figura 10. Cronoamperogramas de (A) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ANL, (B) $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ HCZ e (C) $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ VAL em diferentes potenciais fixados, obtido em solução tampão BR (pH 5,0) com EDDB pré-tratado catodicamente. Inserido: a relação dos parâmetros I_{ap} vs. $t^{-1/2}$ obtidos pela equação do Cottrel.



5.2. Determinação simultânea de ANL e VAL em amostras binárias.

Para construção das curvas de calibração visando a determinação simultânea, alíquotas diluídas de ANL e VAL foram adicionadas em 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). Dessa forma foi obtida uma linearidade entre o sinal analítico e a concentração adicionada, resultando em uma curva analítica para cada anti-hipertensivo. A técnica voltamétrica utilizada foi a VOQ, que consiste na aplicação de pulsos de potencial em um determinado tempo. Essa forma de aplicação de potencial permite uma baixa relação de sinal ruído, podendo alcançar um baixo limite de detecção e de quantificação, além de ser uma técnica de rápida aquisição de dados. A VPD também foi avaliada como possível técnica para determinação simultânea de ANL e VAL, porém os picos de oxidação não se mostraram bem definidos, assim a VOQ se mostrou como a técnica mais adequada para determinação simultânea desses anti-hipertensivos.

Os parâmetros instrumentais da VOQ, como a amplitude de pulso (a), frequência de onda quadrada (f) e incremento de varredura (ΔE_s), foram investigados de forma univariada no intuito de se obter os melhores resultados experimentais, como perfil de pico de oxidação bem definido, melhor repetibilidade, valores de potencial de oxidação menos positivos e adequada magnitude de corrente elétrica. A Tabela 1 apresenta os melhores parâmetros obtidos.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais e condições experimentais para a determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL em mistura binária e ternária.

Parâmetros	Tipo ou faixa testada	Otimizado
pH (solução tampão BR)	4,0 – 6,0	5,0
Eletrólito suporte	Tampão fosfato, acetato e BR	BR
Frequência (f) (Hz)	10 – 70	30
Amplitude de pulso (a) (mV)	10 – 80	40
Incremento de varredura (ΔE_s) (mV)	1 – 4	2
Pré-tratamento	PTA – PTC	PTC

Nas condições apresentadas na Tabela 1, foram construídas curvas analíticas para análise simultânea em mistura binária (ANL e VAL) e ternária (ANL, HCZ e VAL). A Figura 11 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos em mistura binária. As respostas dos sinais analíticos das alíquotas adicionadas de ANL e VAL apresentaram baixa relação sinal ruído, repetibilidade e linearidade adequadas. As equações analíticas apresentaram alta sensibilidade, exposto pelo alto valor do coeficiente angular nas duas equações. Com esses parâmetros obtidos é possível realizar a determinação simultânea de ANL e VAL.

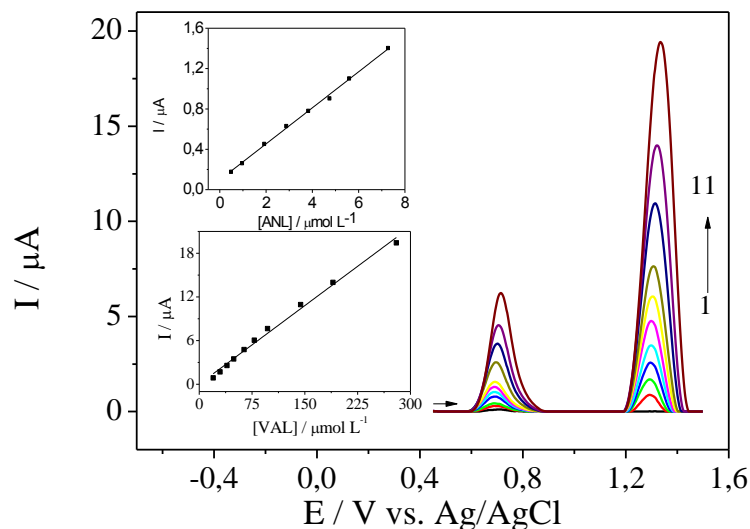
As curvas analíticas para a determinação binária (ANL e VAL) foram obtidas no intervalo de concentração de ANL $4,97 \times 10^{-7} - 2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de VAL $1,98 \times 10^{-5} - 2,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As equações analíticas correspondentes são:

$$I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = 0,381 + 2,15 \times 10^5 [c (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,995)$$

$$I_{\text{VAL}} (\mu\text{A}) = 0,0188 + 7,20 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,992)$$

Os valores de LD calculados para ANL e VAL foram de $7,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

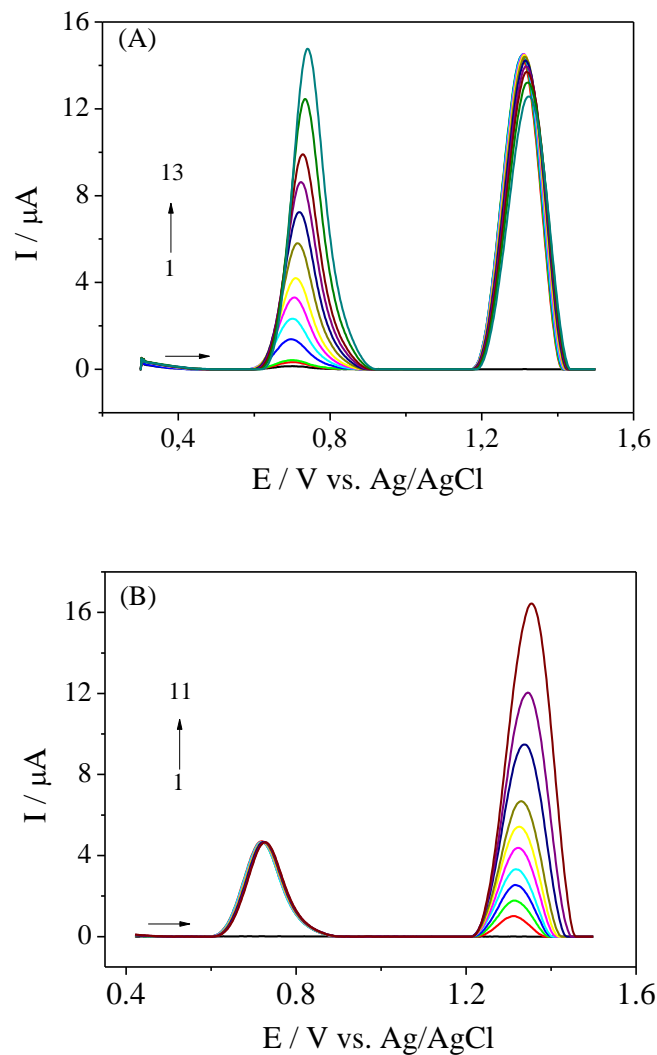
Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de ANL e VAL em um EDDB pré-tratado catodicamente em solução tampão BR (pH 5,0). Faixa linear de $4,9 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,9 \times 10^{-5} - 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL e VAL respectivamente. Inserido: curvas analíticas de ANL e VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$.



A repetibilidade intra-dia da magnitude da corrente de pico foi obtida em medições ($N = 10$) de ANL $9,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 5,0). Os valores de corrente de pico obtidos foram tratados estatisticamente no intuito de se obter parâmetros como média e desvio padrão, assim foi possível calcular o desvio padrão relativo (DPR) das medidas, obtendo uma variação de 1,98% e 1,59% de ANL e VAL de medidas intra-dia do método proposto. Para o cálculo da repetibilidade inter-dia da magnitude da corrente de pico foi calculado da mesma forma da repetibilidade intra-dia e na mesma concentração. Os resultados obtidos de DPR foram de 4,23% e 5,56% para ANL e VAL, respectivamente, dessa forma pode-se concluir que o método proposto resulta em adequada repetibilidade.

Para um melhor entendimento sobre a construção das curvas analíticas foram realizados testes para verificar a influência do sinal analítico de um anti-hipertensivo com o outro. Para isso foram adicionadas alíquotas apenas de um anti-hipertensivo enquanto o outro foi mantido em uma concentração constante. A Figura 12A apresenta a determinação apenas de ANL na faixa de concentração de $4,93 \times 10^{-7} - 2,81 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução com VAL fixada na concentração de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (com o pico de oxidação constante obteve-se um DPR de 0,387%). A equação da curva analítica obtida foi: $I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = 0,331 + 2,02 \times 10^5 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,997$). A figura 12B apresenta a determinação apenas de VAL realizada na faixa de $1,95 \times 10^{-5} - 2,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução com uma concentração fixa de ANL de $1,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (com o pico de oxidação constante obteve-se um DPR de 0,619%). A curva analítica obtida foi: $I_{\text{VAL}} (\mu\text{A}) = 0,398 + 6,04 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,996$). Com os resultados obtidos é possível concluir que a mudança da concentração de um anti-hipertensivo não tem influência de forma significativa sobre o potencial ou pico de corrente do outro, confirmado pelo baixo DPR quando a concentração de um anti-hipertensivo é fixada. É importante notar que os processos oxidativos de ANL e VAL sobre o EDDB pré-tratado catodicamente são independentes.

Figura 12. Voltamogramas de onda quadrada para diferentes alíquotas de diferentes concentrações de (A) ANL (2–13: $4,9 \times 10^{-7} - 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de VAL e (B) VAL (2–11: $1,9 \times 10^{-5} - 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ANL em solução tampão BR (pH 5,0) empregando o EDDB pré-tratado catódicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$.



Para aplicação do método proposto na determinação simultânea em amostra binária de ANL e VAL foram utilizadas cápsulas de diferentes dosagens combinadas de amostras encontradas no mercado popular. Não houve necessidade de extração, evaporação ou filtração para o preparo das amostras, indicando que o método proposto é rápido e viável, e para quantificação foram utilizadas as equações analíticas obtidas. Essas mesmas amostras de diferentes dosagens

também foram determinadas utilizando um método descrito na literatura por CLAE [57], com o objetivo de comparação com o método voltamétrico. Os resultados são apresentados na Tabela 2, em que pode ser observado que a exatidão do método voltamétrico se apresentou satisfatório para determinação em amostra binária de ANL e VAL. Para comparação entre o método da literatura e o método proposto foi aplicado o teste-*t* pareado [72], com valor de *t* calculado de 0,150, valor este menor que o valor de *t* crítico (2,015 ; $\alpha = 0,05$), indicando que não existe diferença significativa entre os métodos em um nível de confiança de 95%.

Tabela 2. Resultados obtidos na determinação de ANL e VAL em mistura binária em doses combinadas utilizando o método voltamétrico (com EDDB) comparado com CLAE.

Amostras	Anti-hipertensivo	Quantidade (mg capsula ⁻¹) ^a			E (%) ^b
		Rotulado	CLAE	VOQ	
A	ANL	5	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,1	2,84
	VAL	80	80,6 ± 4,4	79,3 ± 0,4	-1,61
B	ANL	10	9,7 ± 0,5	9,6 ± 0,2	-0,31
	VAL	160	171,3 ± 2,6	163,5 ± 1,2	-4,67
C	ANL	5	5,1 ± 0,6	4,7 ± 0,6	-7,25
	VAL	320	301,8 ± 28,5	309,4 ± 7,8	2,65

^aMédia das 3 medições.

^bErro relativo (%) = 100 × [(Método VOQ – método CLAE / método CLAE)].

Na literatura existe apenas um método voltamétrico descrito para a determinação simultânea de ANL e VAL, que emprega um eletrodo de carbono vítreo [10], no entanto esse método, frente ao método proposto, (utilizando um EDDB pré-tratado catodicamente) possui algumas limitações. Primeiramente a técnica utilizada pelo ECV é a VPD, que tem característica de ser mais lenta que a VOQ (utilizada no método proposto), assim tendo uma diminuição da eficiência em tempo. Outro ponto é a linearidade obtida com o ECV, que possibilita a

determinação apenas de um tipo de dosagem combinada (10 mg ANL/160 mg VAL), ao passo que a linearidade obtida com o método proposto permite a determinação em todas as dosagens combinadas disponíveis no mercado popular (inclusive 5 mg ANL/ 320 mg VAL), mostrando a praticidade e versatilidade do método proposto. Entretanto, a principal diferença entre os dois métodos, que mostra a superioridade do método proposto, é a repetibilidade intra e inter-dia. O método empregando ECV apresentou um alto valor de DPR devido a uma adsorção característica do ECV, enquanto para o método proposto obteve-se baixos valores de DPR, tanto intra como inter-dia, devido a característica de não adsorver moléculas à sua superfície, expondo assim uma maior segurança e confiabilidade do método para determinação simultânea de ANL e VAL empregando um EDDB pré-tratado catodicamente. Essa comparação dos parâmetros entre os métodos está apresentada na Tabela 3

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos para determinação de ANL e VAL segundo ERDEN, P.E. (VPD) e pelo método proposto (VOQ).

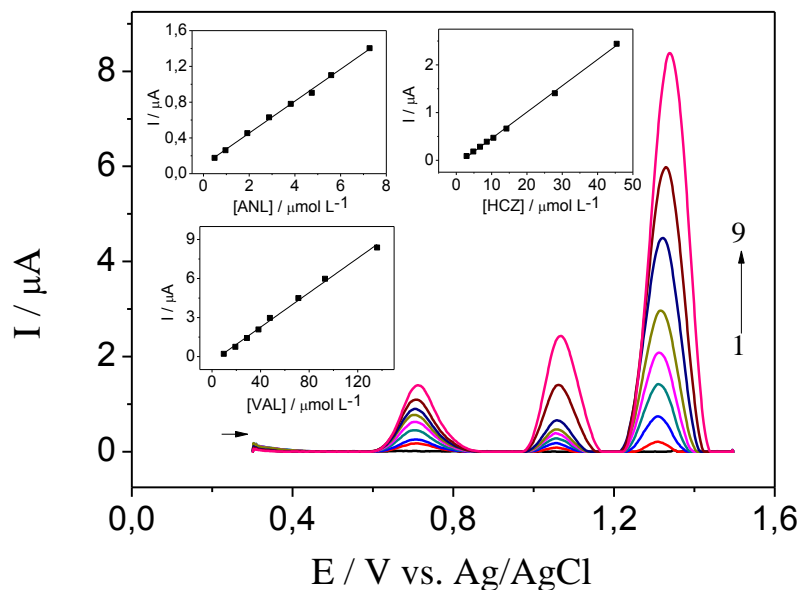
	ANL		VAL	
	ECV	EDDB	ECV	EDDB
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,55	0,076	0,83	0,69
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,8 – 56,0	0,49 – 29,0	3,4 – 73,0	19 – 280
DPR (intra-dia) (%)	4,23	1,98	5,68	1,59
DPR (inter-dia) (%)	8,97	4,23	12,47	5,56

5.3. Determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL em amostras ternárias.

A construção das curvas de calibração para a determinação simultânea em amostras ternárias, foi realizada utilizando-se a VOQ com os mesmos parâmetros da Tabela 1, porém foram adicionadas alíquotas diluídas de ANL, HCZ e VAL a uma célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 5,0). A Figura 13 apresenta as respostas analíticas de cada alíquota adicionada, as quais apresentam bons parâmetros analíticos, como alta relação sinal ruído (permitindo baixos limites de detecção e quantificação) e repetibilidade adequada. A linearidade obtida em cada curva analítica permite a determinação simultânea de ANL, HCZ e

VAL em todas as amostras farmacêuticas disponíveis no mercado. Cabe enfatizar que na literatura não há algum método eletroanalítico desenvolvido para a determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL ou em qualquer amostra ternária em diferentes doses farmacêuticas combinadas. Na literatura existem apenas métodos baseados na cromatografia e espectrofotometria [60,61]. Com as vantagens provenientes dos métodos voltamétricos juntamente com o EDDB, como rapidez, baixo uso de solventes orgânicos, alta sensibilidade, estabilidade física e térmica do eletrodo, confirma-se a importância do método proposto desenvolvido nesse trabalho e possível aplicabilidade em rotinas laboratoriais.

Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada obtidos da oxidação simultânea de ANL, HCZ e VAL em um EDDB pré-tratado catódicamente em solução tampão BR (pH 5,0). Faixa linear de (2 – 9): $4,9 \times 10^{-7} - 7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL, $2,9 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HCZ e $9,7 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$.



As construções das curvas analíticas para a determinação de ANL, HCZ e VAL em amostras ternárias apresentaram linearidade no intervalo de concentração de $4,97 \times 10^{-7} - 2,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ANL; $2,9 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HCZ e $9,7 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para VAL.

As equações analíticas correspondentes são:

$$I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = 0,097 + 1,8 \times 10^5 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,998)$$

$$I_{\text{HCZ}} (\mu\text{A}) = -0,094 + 5,5 \times 10^4 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,999)$$

$$I_{\text{VAL}} (\mu\text{A}) = -0,39 + 6,6 \times 10^4 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,996)$$

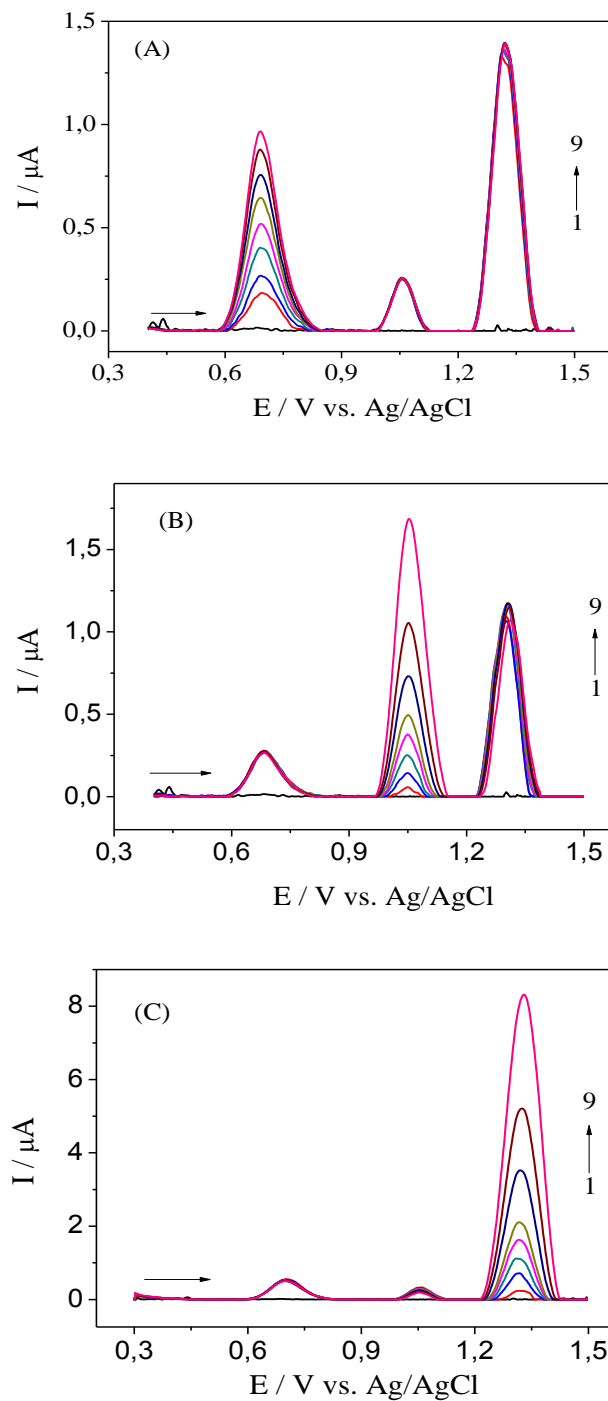
Os valores de LD calculados para ANL, HCZ e VAL foram de $7,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, $4,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

A repetibilidade intra-dia e inter-dia da magnitude do pico de corrente foi determinada em sucessivas medições ($N = 10$) de $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL, $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de HCZ e $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de VAL em solução tampão BR (pH 5,0). Quando esses valores são comparados e tratados, é possível obter o desvio padrão relativo (DPR) das medidas, resultando: para ANL, intra-dia 1,6% e inter-dia 5,1%; para HCZ, intra-dia 1,7% e inter-dia 5,7%; para VAL, intra-dia 2,8% e inter-dia 5,6%. Com os resultados obtidos pode-se concluir que o método proposto apresenta boa repetibilidade para determinação em amostras reais.

Para um melhor entendimento sobre a construção simultânea das curvas de calibração foram realizados testes para verificar a influência do sinal analítico de um anti-hipertensivo com o outro. Para isso foram adicionadas alíquotas apenas de um anti-hipertensivo enquanto os outros foram mantidos em uma concentração constante. Também foi realizada a adição de dois anti-hipertensivos simultaneamente enquanto a concentração de apenas um anti-hipertensivo foi fixada, como apresenta a Figura. 14.

Primeiramente, a determinação individual de ANL na faixa de concentração de $4,9 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução contendo HCZ e VAL na concentração de $1,1 \times 10^{-5}$ e $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, obtendo uma equação analítica de $I_{\text{ANL}} (\mu\text{A}) = 0,15 + 1,2 \times 10^5 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,996)$ (Figura 14A). A determinação individual de HCZ foi realizada na faixa de $2,9 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução com concentração fixa de ANL e VAL de $2,0 \times 10^{-6}$ e $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A equação analítica obtida foi $I_{\text{HCZ}} (\mu\text{A}) = -0,17 + 6,4 \times 10^4 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,998)$ (Figura 14B). Por fim, a determinação individual de VAL foi realizada na faixa de $9,8 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução com uma concentração fixa de $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ANL e HCZ respectivamente. A equação analítica obtida foi $I_{\text{VAL}} (\mu\text{A}) = -0,70 + 6,2 \times 10^4 [\text{c} (\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,996)$ (Figura 14C).

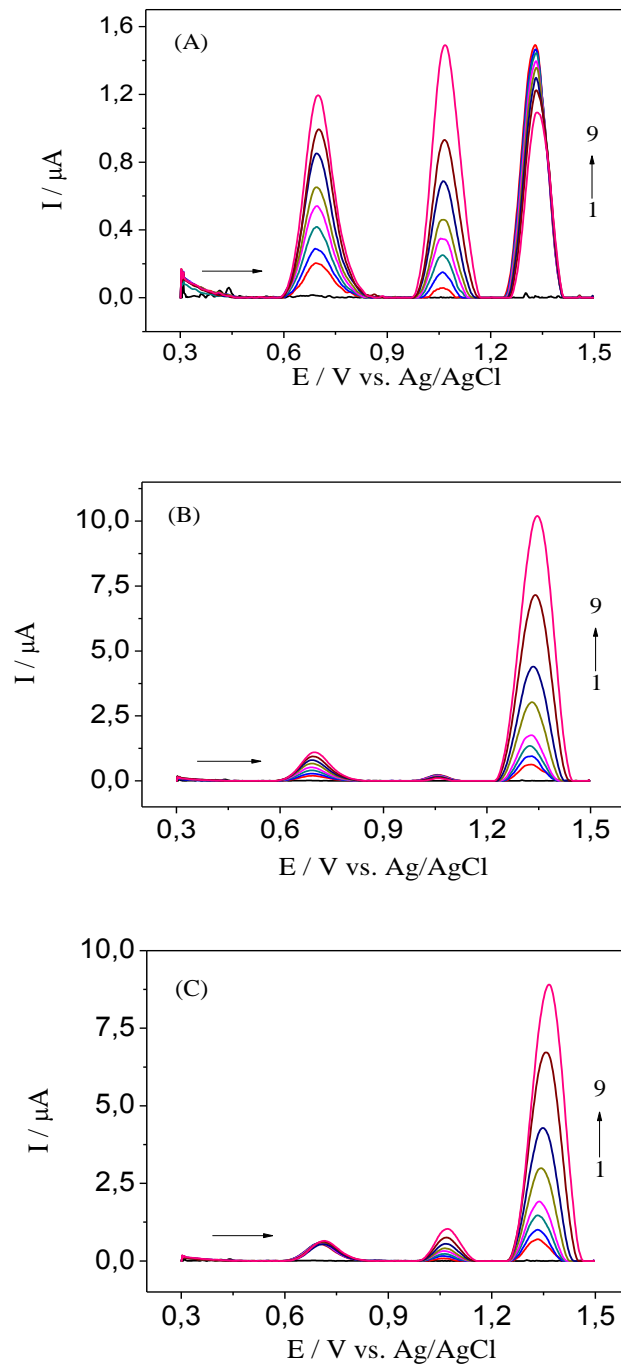
Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de (A) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de HCZ $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e VAL $39,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) VAL (2–9: $9,8 - 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e HCZ $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão BR (pH 5,0), empregando o EDDB pré-tratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$.



No mesmo sentido, foi realizado um estudo em que era determinado simultaneamente dois analitos enquanto apenas um era mantido em concentração constante. As concentrações fixadas de ANL, HCZ e VAL foram de $2,0 \times 10^{-6}$, $1,1 \times 10^{-5}$ e $3,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ respectivamente. As faixas lineares utilizadas para determinação simultânea de ANL e HCZ foram de $4,9 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $2,9 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ enquanto a VAL foi mantida constante. As equações analíticas: $I_{ANL} (\mu A) = 0,12 + 1,5 \times 10^5 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,991$) e $I_{HCZ} (\mu A) = -0,12 + 5,6 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,999$) (Figura 15A). As faixas lineares utilizadas para determinação simultânea de ANL e VAL foram de $4,9 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $9,8 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ enquanto a HCZ foi mantida constante. As equações analíticas: $I_{ANL} (\mu A) = 0,13 + 1,4 \times 10^5 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,998$) e $I_{val} (\mu A) = -0,79 + 5,6 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,995$) (Figura 15B). As faixas lineares utilizadas para determinação simultânea de HCZ e VAL foram de $4,9 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $2,9 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ enquanto o ANL foi mantido constante. As equações analíticas obtidas foram: $I_{HCZ} (\mu A) = -0,13 + 3,8 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,993$) e $I_{val} (\mu A) = -0,40 + 5,1 \times 10^4 [c (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,998$) (Figura 15C).

Dessa forma, pode-se concluir que a mudança da concentração dos compostos não tem influência significativa sobre o potencial, pico de corrente do outro ou de interferência no processo oxidativo empregando-se um EDDB pré-tratado catodicamente.

Figura 15. Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de (A) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de VAL $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) ANL (2–9: $0,49 - 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e VAL (2–9: $9,8 - 190,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de HCZ $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) HCZ (2–9: $2,9 - 29,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e VAL (2–9: $9,8 - 190,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de ANL $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão BR (pH 5,0), empregando o EDDB pré-tratado catodicamente. Parâmetros da VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_S = 2 \text{ mV}$.



O método proposto nesse estudo foi efetivamente aplicado na determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL em amostras farmacêuticas, utilizando comprimidos de diferentes dosagens encontrados no mercado popular. Os anti-hipertensivos contido nas amostras foram determinados utilizando as equações analíticas da Figura 12, sem a necessidade de extração das amostras, evaporação ou filtração, exibindo a viabilidade e praticidade do método proposto. As amostras farmacêuticas de diferentes dosagens também foram determinadas utilizando o método por CLAE [57], com o objetivo de comparação com o método voltamétrico. Os resultados são apresentados na Tabela 4, em que pode ser observado que a validação do método voltamétrico empregando um EDDB pré-tratado catodicamente se apresentou satisfatório para determinação de ANL, HCZ e VAL em amostras ternárias. Para comparação, entre o método proposto e o método contido na literatura, foi aplicado o teste-*t* pareado [72], com valor de *t* calculado de 0,117, valor este menor que o valor crítico (1,796 ; $\alpha = 0,05$), indicando que não existe diferença significativa entre os métodos em um nível de confiança de 95%.

Tabela 4. Resultados obtidos na determinação de ANL, HCZ e VAL em mistura ternária em doses combinadas utilizando o método voltamétrico (com EDDB) comparado com CLAE.

Amostra	Anti-hipertensivo	Quantidade (mg capsula ⁻¹) ^a			E (%) ^b
		Rotulado	CLAE	VOQ	
A	ANL	5	4,8 ± 0,5	4,9 ± 0,8	4,0
	HCTZ	12,5	11,7 ± 0,3	11,9 ± 0,9	1,7
	VAL	160	168,5 ± 3,3	177,3 ± 3,2	5,3
B	ANL	10	9,7 ± 0,6	10,4 ± 0,4	7,3
	HCTZ	12,5	12,6 ± 2,0	12,4 ± 1,9	-2,0
	VAL	160	166,4 ± 4,2	163,8 ± 7,2	-2,0
C	ANL	5	5,1 ± 0,5	5,5 ± 0,4	7,4
	HCTZ	25	25,8 ± 1,5	25,2 ± 1,2	-2,3
	VAL	160	167,7 ± 5,6	171,6 ± 5,0	2,3
D	ANL	10	10,8 ± 0,9	10,7 ± 1,2	-0,92
	HCTZ	25	24,3 ± 0,9	22,7 ± 0,8	-6,5
	VAL	160	156,4 ± 2,3	167 ± 1,7	7,0

^aMédia das 3 medidas.

^bErro relativo (%) = 100 × [(Método VOQ – método CLAE / método CLAE)].

5.4. Teste de interferentes e recuperação de ANL, HCZ e VAL em amostras binárias e ternárias.

Primeiramente, diversos excipientes presentes nas dosagens farmacêuticas foram avaliados como possíveis interferentes nas faixas de concentração (solução padrão:composto interferente) de 1:1, 1:10 e 10:1 (m/m), os excipientes celulose microcristalina, dióxido de silício, dióxido de titânio e estearato

de magnésio foram avaliados. O sinal de corrente elétrica obtido foi comparado com o sinal das amostras com apenas solução padrão de cada analito, obtendo-se um erro padrão relativo (EPR) de valor menor que 1%, indicando que esses excipientes presentes nas amostras comerciais não possuem interferência significativa na determinação em amostra binária e ternária.

Experimentos de adição e recuperação foram realizados para avaliar os efeitos de matriz após adições de alíquotas de solução padrão dos anti-hipertensivos, obtendo-se boa recuperação média para os compostos (97,3 – 103 % para ANL, 95,1 – 103 % para HCZ e 97,4 – 105% para VAL), indicando que não houve interferência de matriz para as amostras analisadas pelo método proposto.

6 CONCLUSÃO

Com o emprego do EDDB pré-tratado catodicamente foi possível estudar o comportamento eletroanalítico de cada anti-hipertensivo, como potencial de oxidação, número de elétrons envolvidos, mecanismo de oxidação, etapa determinante do processo oxidativo e coeficiente de difusão. Foi possível desenvolver dois métodos analíticos para determinação simultânea de anti-hipertensivos com o auxílio de técnicas voltamétricas, como a VC e a VOQ empregando o EDDB. Foi estudada a influência do pré-tratamento no EDDB, mostrando diferença de sensibilidade e repetitividade da superfície condicionada em hidrogênio (hidrofóbica), por meio do PTC. O método eletroanalítico proposto para a determinação simultânea de ANL, HCZ e VAL se mostrou eficiente, obtendo sucesso na aplicação em formulações farmacêuticas binárias e ternárias, com um preparo de amostras simples e rápido. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se CLAE, indicando que não houve diferença significativa entre os métodos no nível de confiança de 95%.

7 REFERÊNCIAS

1. HARDMAN, Joel et al. Goodman & Gilman's – **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9^o ed. New York: McGraw-Hill, 1996.
- [2] SBH – **Sociedade Brasileira de Hipertensão**. Disponível em <http://www.sbh.org.br/geral/oque-e-hipertensao.asp>. Acessado em: 30 nov. de 2014.
- [3] GOLAN, D.E. **Principles of Pharmacology**. 2^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008
- [4] British Pharmacopoeia Commission. **British Pharmacopoeia**, 5, ed. London, The Stationery Office, 2009
- [5] USP – **United States Pharmacopeia**. Disponível em <http://www.usp.org>. Acessado em: 10 dez. de 2014.
- [6] BARROS C.B., Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, 175-177, 2002
- [7] ANVISA – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em. Acessado em: 30 nov. de 2014.
- [8] BRETT, A.M.O. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc, 1993.
- [9] SKOOG, D. **Princípios de Análise Instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- [10] ERDEN P.E., TASDEMIR, I.H., KAÇAR C., KIHÇ, E. Simultaneous Determination of Valsartan and Amlodipine Besylate in Human Serum and Pharmaceutical Dosage Forms by Voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 9, 2208-2220, 2014.
- [11] PLESKOV, Y.V. Electrochemistry of Diamond: A Review. **Russian Journal of Electrochemistry** v. 38, 1275–1291, 2002.
- [12] SARTORI, E.R., MEDEIROS R.A., ROCHA-FILHO R.C., FATIBELLO-FILHO O. Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in

pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**. v.81, 1418–1424, 2010.

[13] ARDILA, J.A., SARTORI, E.R., ROCHA-FILHO, R.C., FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode, **Talanta**. v. 103, 201–206, 2013.

[14] PECKOVÁ, K., MUSILOVÁ, J., BAREK, J. The use of boron-doped diamond film electrodes for detection of organic compounds. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 39, 148–172, 2009.

[15] SARTORI, E.R., MEDEIROS, R.A., ROCHA-FILHO, R.C., FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, 360–366, 2009.

[16] BATISTA, E.F., SARTORI, E.R., MEDEIROS, R.A., ROCHA-FILHO, R.C., FATIBELLO-FILHO, O. Differential pulse voltammetric determination of sildenafil citrate (Viagra®) in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Analytical Letters**. v.43, 1046–1054, 2010.

[17] ZAVÁZALOVÁ, J., DEJMKOVÁ, H., BAREK, J., PECKOVÁ, K.. Voltammetric and Amperometric Determination of Mixtures of Aminobiphenyls and Aminonaphthalenes Using Boron Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis** v.25, 253–262, 2013.

[18] SVORC, L., KALCHER, K. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.194, 332-342, 2014.

[19] EISELE, A.P.P., CLAUSEN, D.N., TARLEY, C.R.T., DALL`ANTONIA, L.H., SARTORI, E.R. Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode, **Electroanalysis**. v.25, 1734-1741, 2013.

- [20] SVORC, L., SOCH, J., TOMCIK, P., RIEVAJ, M., BUSTIN, D. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**. v.68, 227-234, 2012.
- [21] YARDIMA, Y., KESKINA, E., SENTURK, Z. Voltammetric. determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**. v.116, 1010–1017, 2013.
- [22] LOURENÇAO, B.C., MEDEIROS, R.A., ROCHA-FILHO, R.C., MAZO, L.H., FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode, **Talanta**. v.78, 748-752, 2009.
- [23] YARDIM, Y., KESKIN, E., SENTURK, Z. Voltammetric determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode, **Talanta**. v.116, 1010-1017, 2013.
- [24] VALEZI, C.F., DUARTE, E.H., MANSANO, G.R., DALL`ANTONIA, L.H., TARLEY, C.R.T., SARTORI, E.R. An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. **Sensors and actuators B: Chemical**. v.205, 234-243, 2014.
- [25] SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, A.V., CODOGNOTO, L., MACHADO, S.A.S., ROCHA-FILHO, R.C., AVACA, L.A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment, **Electrochimica Acta**. v.49, 4021-4026, 2004.
- [26] SALAZAR, G.R., ANDRADE, L.S., NASCENTE, P.A.P., ROCHA-FILHO, P.S.R., AVACA, L.A. On the changing electrochemical behavior of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments, **Electrochimica Acta**. v.51, 4612-4619, 2006.
- [27] SIMON, N., GIRARD, H., BALLUTAUD, D., GHODBANE, S., DENEUVILLE, A., HARLEM, M., ETCHEBERRY, A. Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes, **Diamond & related materials**. v.14, 1179-1182, 2005.

- [28] MICHAUD, P.A., PANIZZA, M., QUATTARA, L., DIACO, T., FOTI, G., COMNINELLIS, C. Electrochemical oxidation of water on synthetic boron-doped diamond thin film anodes, **Journal of applied Electrochemistry**. v.33, 151-154, 2003.
- [29] DUO, I., LEVY-CLEMENT, C., FUJISHIMA, A., COMNINELLIS, C. Electron transfer kinetics on boron-doped diamond Part I: Influence of anodic treatment, **Journal of applied Electrochemistry**. v.34, 935-943, 2004.
- [30] GIRAD, H., SIIMON, N., BALLUTAUD, D., HARLEM, M., ETCHEBERRY, A. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes, **Diamond & Related Materials**. v.16, 316-325, 2007.
- [31] FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S., SARTORI, E.R., FATIBELO-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. **Analytical Methods**. v.7, 643-649, 2015.
- [32] EL-BAGARY R.I., RAMZIA, I., PATONAY, G., ELZHR, A.A., ELKADY, E.F. Ion-Pair LC Method for Simultaneous Determination of Aliskiren Hemifumarate, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide in Pharmaceuticals. **Chromatographia**. v.77, 257-264, 2013.
- [33] MOUSSA, B.A., EI-ZAHER, A.A., MAHROUSE, M.A., AHMED, M.S. Simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in binary mixture by spectrofluorimetry and HPLC coupled with fluorescence detection. **Analytical chemistry insights**. v.8, 107-115, 2013.
- [34] 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, 1137-1142, 2000.
- [35] JAIN, N., JAIN, R., JAIN, A, PANDEY, S. P., JAIN, D.K. Spectrophotometric Method Development and Validation for Quantitative Estimation of Amlodipine Besylate in Bulk Drug and Their Dosage Forms By Using Hydrotropic Agent. **Eurasian Journal of. Analytical. Chemistry**. v.5, 212-217, 2010.

- [36] PATIL, P.B., CHAVAN, C.B., JAGTAP, D.A., MOHITE, S.K., MAGDUM, C. S. Simultaneous Estimation of Nebivolol hydrochloride and Amlodipine besylate by UV Spectrophotometric Method. **International Journal of ChemTech Research**. v.4, 1241-1246, 2012.
- [37] PAWAR, P.Y., RASKAR, M.A., KALURE, S.U., KULKARNI R.B. Simultaneous spectrophotometric estimation of amlodipine besylate and telmisartan in tablet dosage form. **Der Pharma Chemica**, v.4, 725-730, 2012.
- [38] 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, 575–582, 2004.
- [39] SIKKANDER, A., MANISANKAR, P., VEDHI, C. Electrochemical Stripping Studies of Amlodipine Using Mwcnt Modified Glassy Carbon Electrode. **Chemistry and Materials Research**. v.1, 2011.
- [40] GOYAL, R.N., BISHNOI, S. Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals. **Bioelectrochemistry**. v.79, 234–240, 2010.
- [41] STOILJKOVIC, Z.Z., AVRAMOV, M.L., PETROVIC, S.D., MIJIN, D.Ž., STEVANOVIC, S.I., LACNJEVAC, U.Č. Voltammetric and Square-Wave Anodic Stripping Determination of Amlodipine Besylate on Gold Electrode. **International Journal of Electrochemistry Science**. v.7, 2288 – 2303, 2012.
- [42] SVORC, L., CINKOVÁ, K., SOCHRA, J., VOJS, M., MICHNIAK, P., MARTON, M. Sensitive electrochemical determination of amlodipine in pharmaceutical tablets and human urine using a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v.728, 86–93, 2014.
- [43] DOGAN-TOPAL, B., BOZAL, B., USLU, B., OZKAN, S.A. Electroanalytical Studies and Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatine Calcium in Binary Mixtures Using First Derivative of the Ratio-Voltammetric Methods. **Electroanalysis**, v.21, 2427-2439, 2009.
- [44] MOHAMMADI, A., MOZAFFARI, S. YAVARI, T. Electro-oxidation and simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in commercial tablets

using carbon nanotube modified electrode. **Micro & Nano Letters**, v.8, 413-417, 2013.

[45] BELAL, F., AL-ZAAGGI, I.A., GADKARIEM, E.A., ABOUNASSIF, M.A. Stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, 335–342, 2001.

[46] CARLUCCI, G., PALUMBO, G., MAZZEO, P., QUAGLIA, M.G. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.23, 185–189, 2000).

[47] MEREY, H.A., RAMADAN, N.K., DIAB, S.S., MOUSTAFA, A.A. Spectrophotometric methods for simultaneous determination of ternary mixture of amlodipine besylate, olmesartan medoxomil and hydrochlorothiazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** v.125, 138-146, 2014.

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

[49] SANTOS, M.C.G. TARLEY, C.R.T. DALL'ANTONIA, L.H. SARTORI, E.R. Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. **Sensors e Actuators B: Chemical**. v. 188, p 263-270, 2013

[50] EISELE, A.P.P., MANSANO, G.R., OLIVEIRA, F.M., CASARIN, J., TARLEY, C.R.T., SARTORI, E.R. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: Electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of electroanalytical chemistry**. v.732, 46-52, 2014.

[51] GHOLIVAND, M.B., KHODADADIAN, M. Simultaneous Voltammetric Determination of Captopril and Hydrochlorothiazide on a Graphene/Ferrocene Composite Carbon Paste Electrode. **Electroanalysis**. v.25, 1263-1270, 2013.

- [52] LAKSHMI, K.S., SIVASUBRAMANIAN, L. A Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of valsartan and Ramipril in binary combination. **Journal Chilean Chemistry Society**. v.55, 223-226, 2010.
- [53] RAMACHANDRAN, S., MANDAL, B.K., NAVALGUND, S.G. Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Valsartan and Ezetimibe in Pharmaceuticals. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v.13, 809-817, 2014.
- [54] BRUNETTO M.R., CONTRERAS, Y., CLAVIJO, S., TORRES, D., MARTIN, V.C. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.50, 194–199, 2009.
- [55] YAN, J., WANG, W., CHEN, L., CHEN, S. Electrochemical behavior of valsartan and its determination in capsules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.67, 205–209, 2008.
- [56] GÜRLER, N., BAYRAKTEPE, D.E., DURMUS, Z., DINÇ, E. Electrochemical Characterization and Voltammetric Anodic Stripping Methods for the Determination of Valsartan. **Revista De Chimie**. v.64, 1211-1217, 2013.
- [57] ÇELEBIER, M., KAYNAK, M.S.K., ALTINOZ, S., SAHIN, S. HPLC method development for the simultaneous analysis of amlodipine and valsartan in combined dosage forms and in vitro dissolution studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.46, 761-768, 2010
- [58] ALNAJJAR, A.O. Validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceuticals and human plasma. **Journal of AOAC International**. v.94,498-502, 2011.
- [59] MOHAMED, N.G. Simultaneous determination of amlodipine and valsartan. **Analytical Chemistry Insights**. v.6, 53-59, 2011.

- [60] SHARMA, M. KOTHARI, C., SHERIKAR, O., MEHTA, P. Concurrent Estimation of Amlodipine Besylate, Hydrochlorothiazide and Valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV–Spectrophotometry. **Journal of Chromatographic Science**. v.52, 27-35, 2012.
- [61] EL-GIZAWY, S.M., ABDELMAGEED, O.H., OMAR, M.A., DERYE, S.M., ABDELMEGIED, A.M. Development and validation on HPLC method for simultaneous determination of Amlodipine, Valsartan, Hydrochlorothiazide in dosage form and spike human plasma. **American Journal of Analytical Chemistry**. v.3, 422-430, 2012.
- [62] PLESKOV, Y.V., SAKHAROVA, A.Y., KROTOVA, M.D. Photoelectrochemical properties of semiconductor Diamond. **Journal. of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**. v.228, 19-27, 1987.
- [63] BARROS, R.C.M., RIBEIRO, M.C., AN-SUMODJO, P.T., JULIAO, Um.S.S., SERRANO, S.H.P. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I: Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**. v.28, 317-325, 2005.
- [64] FUJIMORI, N., IMAI, T., DOI, A. Characterization of conducting Diamond films. **Vacuum**. v.36, 99-102, 1986.
- [65] COMPTON, R.G., FOORD, J.S., MARKEN, F. Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. **Electroanalysis**, v.15, 1349-1363, 2003.
- [66] ALFARO, M.A.Q., FERRO, S., MARTINEZ-HUITLE, C.A., VONG, Y.M. Boron-Doped Diamond Electrode for the Wastewater Treatment. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v.17, 227-236, 2006.
- [67] YAGI, I., NOTSU, H., TATSUMA, T., TRYK, D.A., FUJISHIMA, A. Introduction of Oxygen-Containing Functional Groups onto Diamond Electrode Surfaces by Oxygen Plasma and Anodic Polarization. **Electrochemical and Solid-State Letters**. v.2, 522-524, 1999.

[68] GANDINI, D., MICHAUD, P., DUO, I., MACHE, E., HAENNI, W., PERRET, A., CONMINELLIS, C. **New Diamond and Frontier Carbon Technology**. v.9, 303-316, 1999.

[69] LONG, G.L., WINEFORDNER, J.D. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**. v.55, 712–724, 1983.

[70] BARD, A.J., FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2^o ed, New York, John Wiley & Sons, 2001.

[71] GOSSER, D.K. **Cyclic Voltammetry**. New York, VCH Publishers, 1994.

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