



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA FARINHA VALEZI

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE LISINOPRIL COM
SUAS ASSOCIAÇÕES HIDROCLOROTIAZIDA OU
ANLODIPINO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
EMPREGANDO UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO**

CAMILA FARINHA VALEZI

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE LISINOPRIL COM
SUAS ASSOCIAÇÕES HIDROCLOROTIAZIDA OU
ANLÓDIPINO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
EMPREGANDO UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina
2017

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

Valezi, Camila Farinha.

Determinação voltamétrica de lisinopril com suas associações hidroclorotiazida ou anlodipino em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de pasta de carbono / Camila Farinha Valezi. - Londrina, 2017.

61 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, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Voltametria - Tese. 2. Eletrodo de pasta de carbono - Tese. 3. Determinação simultânea - Tese. 4. Anti-hipertensivos - Tese. I. Romão Sartori Braz, Elen Julciléia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CAMILA FARINHA VALEZI

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE LISINOPRIL COM SUAS
ASSOCIAÇÕES HIDROCLOROTIAZIDA OU ANLODIPINO EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO UM ELETRODO
DE PASTA DE CARBONO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elen Julciléia Romão
Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Débora Nóbile Clausen Peraro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de dezembro de 2017.

Dedico este trabalho a minha família,
em especial aos meus pais, Cássia e
Natal, por todo apoio e incentivo,
sempre me amparando com muito
amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por toda força, sabedoria e coragem para seguir, portas que se abriram e por colocar no meu caminho pessoas maravilhosas e especiais.

À minha orientadora Profa. Dra. Elen Sartori, por todo ensinamento e dedicação ao longo desses anos, pela paciência, amizade e carinho. Por toda força e apoio em minha vida acadêmica.

À Profa. Dra Ieda Scarmínio pelo empréstimo da coluna cromatográfica e ao Prof. Dr. Dimas Zaia pela disponibilidade do uso do cromatógrafo nas análises das amostras para a aplicação do método comparativo.

Agradeço aos meus pais, Cássia e Natal, que com confiança e amor, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Pelo apoio e suporte que foram fundamentais. Obrigada por sempre me incentivarem, por não deixar eu desistir e por todo carinho. Amo vocês.

A todos os meus familiares, em especial, ao meu irmão Daniel pelo cuidado e por sempre estar presente; à minha vizinha Dulce pela dedicação e amor incondicional; à Tia Janaína e Maria Clara pelo apoio e carinho e ao meu segundo pai, tio Berto pela dedicação, cuidado e amor. Eu amo vocês.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Carlos, Débora, Eduardo, Gabriel, Jaqueline, Jessica, João, Louise e Max, por todos os momentos juntos, dia a dia. Por toda amizade, companheirismo e apoio. Um agradecimento especial à Ana, pela força e amizade nesses anos, e por ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Gente, vocês são demais.

Às minhas amigas, irmãs de coração, Isis, Isadora, Laura, Mayara, Natália, Renata, Talitha e Vanessa, por tudo que sempre passamos juntas, por todo amor e carinho.

Minha gratidão a todos vocês.

“Que a força esteja com você”

VALEZI, Camila Farinha. **Determinação voltamétrica de lisinopril com suas associações hidroclorotiazida ou anlodipino em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de pasta de carbono**. 2017. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Lisinopril (LNP) é o inibidor da enzima conversora da angiotensina, a hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético e o anlodipino (AML) um bloqueador dos canais de cálcio, e esses fármacos são encontrados em doses combinadas para o tratamento da hipertensão. Nesse trabalho, pela primeira vez, são propostos dois métodos analíticos para a determinação dos pares de anti-hipertensivos (HCTZ e LNP ou AML e LNP). Ambos os métodos se baseiam no uso do eletrodo de pasta de carbono (EPC) acoplado com a voltametria de pulso diferencial (VPD). Os voltamogramas cíclicos apresentaram três picos de oxidação bem definidos e reprodutíveis em um potencial de 0,65 V, 0,76 V e 0,99 V (vs. Ag / AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) para AML, HCTZ e LNP, respectivamente, que estão relacionados aos processos irreversíveis e a corrente é principalmente controlada pela difusão das três espécies na superfície do EPC. O pH, eletrólito suporte e os parâmetros instrumentais da VPD foram otimizados. Os parâmetros analíticos foram avaliados, tais como linearidade, coeficientes de correlação e limites de detecção. A viabilidade do método proposto foi determinada com sucesso pela quantificação simultânea dos anti-hipertensivos estudados em formulações farmacêuticas comerciais. Esses métodos mostraram-se eficazes, de baixo custo, não necessitam de procedimentos de extração ou pré-concentração, de fácil acessibilidade e uma alternativa para a determinação de LNP com suas associações (HCTZ ou AML) para análises de rotina analíticas.

Palavras-chave: Determinação simultânea. Eletrodo de pasta de carbono. Determinação de hidroclorotiazida. Determinação anlodipino. Determinação de lisinopril.

VALEZI, Camila Farinha. **Determinação voltamétrica de lisinopril com suas associações hidroclorotiazida ou anlodipino em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de pasta de carbono.** 2017. 61 pp. Dissertation (Master in Chemistry) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Lisinopril (LNP) is the angiotensin converting enzyme inhibitor, a hydrochlorothiazide (HCTZ) is a diuretic and amlodipine (AML) a calcium channel blocker, and these drugs are found in combination dosages for the treatment of hypertension. In this work, for the first time, two analytical methods are proposed for the determination of pairs of antihypertensives (HCTZ and LNP or AML and LNP). Both methods are based in the use of a carbon paste electrode (CPE) coupled with differential pulse voltammetry (DPV). In the cyclic voltammetry measurements, three very well-resolved and reproducible oxidative processes of AML, HCTZ and LNP were found at 0.65 V, 0.76 V and 0.99 V (vs Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹ KCl)), respectively, which were related to irreversible redox processes and the current is mostly controlled by diffusion of the three drugs to the CPE surface. The pH, supporting electrolyte and instrumental parameters of DPV were optimized. Analytical parameters such as linearity ranges, correlation coefficients and detection limits were evaluated. The viability of the proposed methods was successfully assessed by simultaneous quantification of the studied drugs in commercially available pharmaceutical formulations. These methods represent an effective, inexpensive, no extraction or preconcentration procedures, easily accessible and alternative tool for the determination of LNP with its associations (HCTZ or AML) for analytical routine analysis.

Keywords: Simultaneous determination. Carbon paste electrode. Hydrochlorothiazide determination. Amlodipine determination. Lisinopril determination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estruturas químicas: (A) besilato de anlodipino, (B) hidroclorotiazida e (C) lisinopril.17
- Figura 2** - Estrutura química do grafite26
- Figura 3** - Esquema demonstrativo do eletrodo de pasta de carbono utilizado no desenvolvimento do método analítico para determinação simultânea de HCTZ e LNP ou AML e LNP.....30
- Figura 4** - Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho.....31
- Figura 5** - Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) em solução tampão BR (pH 10,0) com adição: A(a) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; A(b) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e A(c) $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP; e comportamento simultâneo de B(a) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, B(b) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando EPC.....35
- Figura 6** - Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $286 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, usando um EPC em solução tampão BR com diferentes valores de pH.....37
- Figura 7** - Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de $97 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP em diferentes soluções tampão a pH 10,0, utilizando um EPC.....38
- Figura 8** - Voltamogramas cíclicos para a comparação entre EPC e ECV em solução tampão BR (pH 10,0) para o comportamento simultâneo de: (A) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP e (B) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} ; área eletroativa de $0,149 \text{ cm}^2$ e $0,065 \text{ cm}^2$ para EPC e ECV, respectivamente.41
- Figura 9** - Voltamogramas cíclicos em solução tampão BR (pH 10,0) para (A) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, (B) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (C) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando um EPC em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150, (h) 175, (i) 200 mV s^{-1}44
- Figura 10** - Relação linear entre logaritmo da intensidade de corrente de

pico versus o logaritmo da velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos: (A) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, (B) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (C) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando um EPC em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150, (h) 175, (i) 200 mV s^{-1}45

Figura 11 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação de HCTZ e LNP em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. As concentrações de HCTZ e LNP foram alteradas simultaneamente (2 – 7): 1,99 – 70,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e 9,97 – 442 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP. Inserido: curva analítica (A) HCTZ e (B) LNP. VPD: $\alpha = 50 \text{ mV}$, $v = 7,5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 5 \text{ ms}$47

Figura 12 - Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de (A) HCTZ (2 – 7): 1,97 – 73,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 148 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP. (B) LNP (2 – 7): 9,70 – 443 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 29,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. VPD: $\alpha = 50 \text{ mV}$, $v = 7,5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 5 \text{ ms}$48

Figura 13 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação de AML e LNP em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. As concentrações de AML e LNP foram alteradas simultaneamente (2 – 7): 1,99 – 54,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e 19,9 – 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP. Inserido: curva analítica (A) AML e (B) LNP. VPD: $\alpha = 50 \text{ mV}$, $v = 7,5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 5 \text{ ms}$54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência do pH na determinação simultânea de AML e LNP, nas concentrações de 49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e 195 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, em tampão BR pH 10,0	39
Tabela 2 - Parâmetros instrumentais da VPD avaliados para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC.....	46
Tabela 3 - Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC	47
Tabela 4 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas para determinação simultânea de HCTZ e LNP em solução tampão BR (pH 10,0)	49
Tabela 5 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por cromatografia e espectrofotometria em comparação com o método voltamétrico proposto para a determinação simultânea de HCTZ e LNP	51
Tabela 6 - Resultados obtidos para determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas combinadas utilizando o método proposto em comparação com a CLAE.....	53
Tabela 7 - Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de AML e LNP, utilizando um EPC	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D_0	Coeficiente de difusão
E_p	Potencial de pico
$E_p/2$	Potencial de meio pico
α	Coeficiente de transferência eletrônica
a	Amplitude de pulso
AMI	Cloridrato de amilorida
AML	Besilato de anlodipino
ATN	Atenolol
BR	Britton – Robinson
CIS	Cromatografia de injeção sequencial
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência- com fase reversa
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
DPR	Desvio padrão relativo
E-CM	Espectrofotometria-calibração multivariada
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
ED- ² D	Espectrofotometria derivativa-segunda derivada
ED- ³ D	Espectrofotometria derivativa-terceira derivada
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
EDDB-PTA	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anódicamente
EDDB-PTC	Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catódicamente
ED-MQC	Espectrofotometria derivativa-mínimos quadrados clássicos
ED-RE	Espectrofotometria derivativa-razão de espectros
ENA	Enalapril
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EPNTC	Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono
E-RCP	Espectrofotometria-regressão por componentes
HCTZ	Hidroclorotiazida
LD	Limite de detecção
LNP	Lisinopril
MTP	Metoprolol

RMP	Ramipril
t	Tempo de modulação
v	Velocidade
VAL	Valsartana
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VARdOQ	Voltametria adsortiva de redissolução de onda quadrada
VARdPD	Voltametria adsortiva de redissolução de pulso diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2	ANTI-HIPERTENSIVOS.....	16
1.3	DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DOS PARES DE ANTI-HIPERTENSIVOS HCTZ E LNP OU AML E LNP	17
1.3.1	DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE HCTZ E LNP.....	18
1.3.2	DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE AML E LNP	20
1.4	PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS - VOLTAMETRIA.....	21
1.5	ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO (EPC).....	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	REAGENTES QUÍMICOS E SOLUÇÕES	29
3.2	PREPARO DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO (EPC)	29
3.3	INSTRUMENTAL	30
3.4	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	32
3.5	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	32
3.6	MÉTODO COMPARATIVO	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE AML, HCTZ E LNP SOBRE O EPC	34
4.2	EFEITO DO PH E ELETRÓLITO SUPORTE	36
4.3	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA PASTA DE GRAFITE NO EPC	39
4.4	COMPARAÇÃO COM ECV	40
4.5	EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA	42
4.6	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP UTILIZANDO UM EPC	46
4.7	COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP	49

4.8	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	52
4.9	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AML E LNP UTILIZANDO UM EPC..	53
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hipertensão é uma doença na qual os vasos sanguíneos se contraem aumentando a pressão arterial e em muitos casos é necessário o uso contínuo de fármacos anti-hipertensivos para o seu tratamento. O besilato de anlodipino (AML), hidroclorotiazida (HCTZ) e lisinopril (LNP) são fármacos muito utilizados para essa finalidade. Dessa forma, esses fármacos podem ser encontrados em formulações farmacêuticas de forma individual ou em associação. A associação de anti-hipertensivos vem sendo muito empregada, uma vez que aumenta a eficácia no controle da pressão arterial e diminui a quantidade diária de comprimidos ingeridos, facilitando assim o dia a dia do paciente (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Um dos quesitos mais importante para a comercialização de formulações farmacêuticas, bem como a associação de anti-hipertensivos, é o controle de qualidade, uma vez que garante a confiabilidade do conteúdo rotulado pelos seus fornecedores. Esse controle em formulações farmacêuticas é essencial, visto que doses excessivas ou abaixo do recomendado podem ocasionar efeitos colaterais e serem nocivos à saúde e bem-estar do paciente durante o tratamento. Com isso, há a necessidade de se desenvolver métodos acessíveis, de relativo baixo custo, instrumentação simples, ambientalmente amigável, reduzindo o uso de reagentes tóxicos e de fácil aplicabilidade para análises de rotina.

Os métodos analíticos mais empregados para esse fim são os métodos cromatográficos e espectrofotométricos. A cromatografia é amplamente utilizada devido à possibilidade de determinar simultaneamente analitos, sem interferência, porém são de alto custo de aquisição e manutenção de equipamentos, demanda muito tempo em procedimentos gerais e há a utilização de solventes orgânicos e de alta pureza. As técnicas espectrofotométricas são relativamente simples e de baixo custo, mas, no entanto, o preparo de amostras é demorado e em alguns casos é necessário empregar tratamentos matemáticos para determinações simultâneas quando ocorre sobreposição dos picos, o que torna o método mais complexo e demorado (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Com a necessidade de se ter um método mais simples e de fácil aplicabilidade para análises de rotina, as técnicas voltamétricas são alternativas viáveis para o desenvolvimento de procedimentos analíticos, uma vez que com o emprego dessa técnica pode-se obter respostas rápidas, facilidade de operação da instrumentação, relativo baixo custo, não necessidade ou minimização do uso de solventes orgânicos e o preparo simplificado da amostra (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Os eletrodos de trabalho mais utilizados nessa técnica, são os eletrodos a base de carbono, como o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), eletrodo de carbono vítreo (ECV) e os eletrodos de pasta de carbono (EPC). Devido à simplicidade, fácil aplicabilidade e relativo baixo custo, os EPCs destacam-se entre os citados. Ademais, os EPCs não necessitam de qualquer tipo de pré-tratamento, polimento ou modificação de sua superfície, o que o torna uma alternativa simples e viável para o desenvolvimento de procedimentos analíticos.

1.2 ANTI-HIPERTENSIVOS

Os anti-hipertensivos são fármacos utilizados no tratamento da hipertensão quando apenas as mudanças de hábitos como alimentação saudável e práticas de atividades físicas não são mais eficazes no tratamento da doença, sendo assim necessário o tratamento medicamentoso. Existe uma ampla variedade de anti-hipertensivos comercializados que agem de forma diferente no controle da pressão arterial, podendo-se citar os diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, β -bloqueadores, antagonistas dos receptores da angiotensina II e inibidores da enzima conversora da angiotensina (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

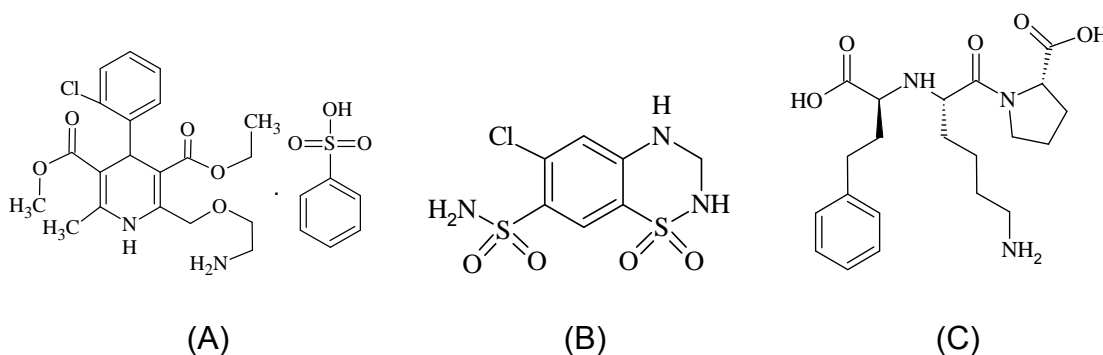
O AML (3-etil-5-metil-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4-diidro-6-metil-3,5-piridinocarboxilatobenzenosulfonato; Figura 1A) é um bloqueador dos canais de cálcio. Ele atua bloqueando a entrada do Ca^{2+} através da membrana celular, tanto das células musculares cardíacas como das paredes vasculares, porém com uma maior ação sobre o músculo liso vascular. Sendo assim, sua ação provoca vasodilatação diminuindo as resistências periféricas, reduzindo o trabalho cardíaco e secundariamente o consumo de oxigênio pelo miocárdio (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Os diuréticos são subdivididos em classes como, diuréticos de alça, tiazídicos, semelhantes aos tiazídicos, poupadores do canal de cálcio, entre outros.

A HCTZ (1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida; Figura 1B) é um diurético tiazídico que aumenta o fluxo urinário e a excreção de sódio e água, diminuindo assim o volume extracelular e/ou a composição dos líquidos corporais e dessa forma, controlando a pressão arterial (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

O LNP ((S)-1-[n2-(1-carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil]-L-prolina; Figura 1C) age como inibidor da enzima conversora da angiotensina. A angiotensina tem como função estreitar os vasos sanguíneos, aumentando a pressão arterial. Dessa forma, o LNP dilata os vasos sanguíneos para ajudar a bombear o sangue para todo o corpo com mais facilidade (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Figura 1 Estruturas químicas: (A) besilato de anlodipino, (B) hidroclorotiazida e (C) lisinopril.



Esses anti-hipertensivos podem ser encontrados em formulações farmacêuticas individuais ou em associação dos pares HCTZ e LNP ou AML e LNP. Dessa forma, o desenvolvimento de um procedimento analítico é necessário para a determinação simultânea desses pares de anti-hipertensivos para análises de rotina. Não há descrito em nenhuma farmacopeia procedimentos analíticos para a determinação simultânea dos pares de anti-hipertensivos HCTZ e LNP ou AML e LNP, apenas procedimentos para determinações individuais, no qual é empregado o método espectrofotométrico para os três anti-hipertensivos (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2009).

1.3 DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DOS PARES DE ANTI-HIPERTENSIVOS HCTZ E LNP OU AML E LNP

Com o aumento do uso de anti-hipertensivos, há a necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos para o controle de qualidade desses fármacos. Como até o momento não foi descrito nenhum procedimento nas farmacopeias para a determinação de LNP em associação com HCTZ ou AML, vários procedimentos têm sido propostos na literatura, empregando os métodos cromatográficos (ERK; KARTAL, 1999; IVANOVIĆ et al., 2007; CHAUHAN; PRAJAPATI; PATEL, 2011; RAJU; RAO, 2011; IDRIS et al., 2012; POONAM et al., 2012; WAGH et al., 2012; BANKAR; MODHA, 2013; DE DIEGO; SOTO; MENNICKENT, 2014; SHAH et al., 2016) e espectrofotométricos (ERK, 1998; PRASAD; SAHA; PARIMOO, 1999; EL-GINDY et al., 2001; RATHEE et al., 2010; DINÇ et al., 2013; KUMAR et al., 2013).

1.3.1 DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE HCTZ E LNP

Para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, são reportados alguns trabalhos empregando os métodos cromatográficos. Erk e Kartal (1999), aplicaram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar simultaneamente HCTZ e LNP, em formulações farmacêuticas. Para a separação dos analitos foi utilizada uma coluna C18 (4,6 × 200 mm, 5 µm) e como fase móvel uma mistura de acetonitrila: água (20:80 v/v, pH 3,8) em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹ com detecção UV em 213 nm. Empregando esse método foi obtida uma faixa linear de concentração de 3,36 – 134 µmol L⁻¹ para HCTZ e de 3,70 – 138 µmol L⁻¹ para LNP (ERK; KARTAL, 1999). Ivanovic e colaboradores (2007) empregaram também a CLAE na determinação simultânea de HCTZ e LNP na presença de possíveis interferentes como clorotiazida, disulfonamida e dicetopiperazina. As separações ótimas dos analitos foi obtida utilizando uma coluna C18 (4,6 mm × 20 mm, 3,5 µm) e a fase móvel foi acetonitrila:hidrogenofosfato de potássio em diferentes proporções (7:93 e 50:50 v/v; 25,0 mmol L⁻¹, pH 5,0), com fluxo 1,0 mL min⁻¹ e a detecção UV foi realizada em 215 nm. Com os parâmetros otimizados, foi obtido uma faixa linear entre as concentrações de 336 – 3360,0 µmol L⁻¹ para HCTZ e de 197 – 2470,0

$\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP e os respectivos limites de detecção (LD) de 0,017 e 0,012 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (IVANOVIĆ et al., 2007). Wagh e colaboradores (2012) determinaram os analitos simultaneamente em formulações farmacêuticas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência-com fase reversa (CLAE-FR) junto com uma coluna C18 de fase inversa (250 × 4,6 mm, 10 μm) e como fase móvel uma mistura de solução tampão fosfato de sódio:metanol (70:30 v/v; ajustado o pH 4,5 com ácido ortofosfórico). O fluxo foi de 1,0 mL min^{-1} e a detecção realizada em 225 nm. O procedimento cromatográfico apresentou um intervalo linear de concentração e LD de 33,6 – 168 e 1,23 – 61,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$; e 1,41 e 0,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e LNP, respectivamente (WAGH et al., 2012).

Já Idris e colaboradores (2012) empregaram a cromatografia de injeção sequencial (CIS), utilizando uma coluna C18 (25 × 4,6 mm) e como fase móvel uma mistura de tampão fosfato: acetonitrila (85:15, v/v; pH 5,0; 20 mmol L^{-1}), fluxo de 2,4 mL min^{-1} e detecção UV fixado em 215 nm, para a determinação dos analitos em formulações farmacêuticas. A faixa linear obtida foi de 17,0 – 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e para o LNP de 49,3 – 197 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com os respectivos LD de 4,70 e 1,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (IDRIS et al., 2012). Diego, Soto e Mennickent (2014), empregaram a cromatografia líquida (CL) com uma coluna RP-18 (150 × 4,6 mm, 5 μm), como fase móvel uma mistura de metanol:acetonitrila:tampão fosfato (15:15:70, v/v/v; pH 7,1; 0,05 mmol L^{-1}) em um fluxo de 0,8 mL min^{-1} e detecção UV em 210 nm para determinar simultaneamente HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas. O método descrito foi linear em uma faixa de concentração de 84,0 – 590 e 98,6 – 493 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e LNP, respectivamente, obtendo os seguintes LD de 1,48 e 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (DE DIEGO; SOTO; MENNICKENT, 2014). Por fim, Shah e colaboradores (2016) propuseram um método para determinação simultânea de HCTZ e LNP em plasma humano, empregando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM), utilizando uma coluna C18 (50 mm × 3,0 mm, 5 μm) e como fase móvel acetonitrila:formiato de amônio (85:15, v/v; 5,0 mmol L^{-1} ; pH 4,5). Com esse método foi obtido uma faixa linear nas concentrações de 0,0017 – 0,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e 0,0012 – 0,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o LNP (SHAH et al., 2016).

Para os métodos espectrofotométricos reportados na literatura para a determinação simultânea de HCTZ e LNP são observados sobreposição dos picos, sendo assim necessário o emprego de derivações matemáticas. Dessa forma, Erk (1998) empregou a espectrofotometria de derivada da razão de espectros (ED-RE)

para a determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas. A sobreposição dos picos foi observada na faixa de 243,6 – 280,1 nm. Aplicando a derivação matemática, foi possível determinar os analitos simultaneamente, em uma faixa de concentração de 20,0 – 469 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a HCTZ e de 38,6 – 319 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o LNP (ERK, 1998). El-Gindy e colaboradores (2001), empregaram a espectrofotometria derivativa, aplicando quatro tipos de derivações matemáticas para a determinação simultânea dos analitos, como a terceira derivada (ED^{-3}D), segunda derivada (ED^{-2}D), mínimos quadrados clássicos (E-MQC) e a de regressão por componentes principais (E-RCP). A faixa de comprimento de onda utilizado foi de 200 a 350 nm, observando sobreposição dos picos em aproximadamente 210 nm. Foram obtidos os seguintes valores de faixa linear e LD para HCTZ e LNP, respectivamente; ED^{-3}D : 8,4 – 58,8 e 19,7 – 138 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,0 e 3,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$; ED^{-2}D : 16,8 – 67,2 e 19,7 – 98,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,67 e 1,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$; E-MQC: 26,9 – 672 e 37,0 – 730 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,34 e 1,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e E-RCP: 26,9 – 672 e 37,0 – 730 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1,0 e 1,48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (EL-GINDY et al., 2001). Dinç e colaboradores (2013) aplicaram a espectrofotometria utilizando procedimentos matemáticos de calibração multivariada (E-CM) para a determinação simultânea dos analitos em formulações farmacêuticas. A faixa de comprimento de onda utilizado foi de 190 a 400 nm, observando sobreposição dos picos em aproximadamente 210 nm. Aplicando o procedimento matemático, obteve-se uma faixa linear de 10,1 – 36,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e 9,86 – 49,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP (DINÇ et al., 2013). Kumar e colaboradores (2013), utilizaram o Método de Vierordt que se baseia em um método espectrofotométrico onde são utilizadas equações simultâneas para a determinação de misturas binárias. Para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, foram utilizados comprimentos de onda de máxima absorção nos valores de 274,5 nm e 215 nm. Os resultados para esse método foram adequados para a aplicação em formulações farmacêuticas, em uma faixa linear de concentração de 16,8 – 67,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e para o LNP de 2,47 – 24,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (KUMAR et al., 2013).

1.3.2 DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE AML E LNP

Os métodos cromatográficos descritos na literatura para a determinação simultânea de AML e LNP em formulações farmacêuticas empregam a CLAE-FR com diferentes parâmetros, entre eles, a coluna de separação e a fase

móvel. Chauhan, Prajapati e Patel (2011) utilizaram uma coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) e como fase móvel uma solução com tampão fosfato: metanol (75:25 v/ v, 0,02 mol L⁻¹, pH 7,0) em fluxo de 1,0 mL min⁻¹ com detecção em 212 nm. O tempo de retenção variou entre 4,11 min e 7,29 min para AML e LNP, respectivamente, obtendo resultados satisfatórios em uma faixa linear de 17,6 – 194 µmol L⁻¹ para o AML e de 24,6 – 271,3 µmol L⁻¹ para o LNP (CHAUHAN; PRAJAPATI; PATEL, 2011). Raju e Rao (2011) determinaram simultaneamente AML e LNP a partir de uma coluna C18 (150 × 4,6 mm em modo isocrático), e como fase móvel foi utilizada uma solução de acetonitrila:tampão fosfato (60:40, com pH ajustado para 3,0) com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e com detecção UV em 215 nm. O tempo de retenção foi de 3,09 min e 4,11 min para AML e LNP, respectivamente. Com esse método foi obtido uma faixa linear na concentrações de 17,6 – 52,9 µmol L⁻¹ para o AML e de 49,3 – 147,9 µmol L⁻¹ para o LNP e aplicado em formulações farmacêuticas (RAJU; RAO, 2011). Já Bankar e Modha (2013), empregaram uma coluna RP18 (150 × 4,6 mm, 5µm), e como fase móvel foi utilizada uma mistura de fosfato monossódico:acetonitrila (50:50 v/v, 0,05 mol L⁻¹) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ com detecção UV em 258 nm. Com esse método foi obtido uma faixa linear de concentrações de 22,0 – 66,1 µmol L⁻¹ e 30,8 – 92,5 µmol L⁻¹ para AML e LNP, respectivamente (BANKAR; MODHA, 2013). Por fim, Poonam e colaboradores (2012), utilizaram como fase móvel uma solução de acetonitrila:tampão fosfato (35:65, v/v, pH 7,0 ajustado com 0,1 mol L⁻¹ trietanolamina), em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O comprimento de onda de 266 nm foi usado para a detecção. A faixa linear obtida para esse método foi de 8,81 – 88,1 µmol L⁻¹ para AML e de 123,3 – 1233,1 µmol L⁻¹ para o LNP (POONAM et al., 2012).

Como também observado para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, a sobreposição dos picos também ocorre para a determinação simultânea de AML e LNP empregando técnicas espectrofotométricas, sendo assim necessário o uso de derivações matemáticas. Prasad, Saha e Paraimoo (1999) observaram para o AML e LNP comprimentos de onda de 216,6 nm e 219,4 nm, respectivamente, com sobreposição dos picos, sendo empregado então a ED-²D para determinar simultaneamente os analitos em formulações farmacêuticas. Com a aplicação desse método, obteve-se uma faixa linear de concentração para AML de 4,41 – 22,0 µmol L⁻¹ e para o LNP de 12,3 – 37,0 µmol L⁻¹, com seus respectivos LD de 0,14 e 0,17 µmol L⁻¹ (PRASAD; SAHA; PARIMOO, 1999). Rathee e colaboradores (2010),

empregaram o Método de Vierordt para a determinação simultânea de AML e LNP. Os comprimentos de onda de máxima absorção usados foram de 256 nm e 216 nm para AML e LNP, respectivamente. Os resultados para esse método foram adequados para a aplicação em formulações farmacêuticas, em uma faixa linear de concentrações de 17,6 – 123 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AML e de 9,86 – 98,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o LNP, com seus respectivos LD de 0,4 e 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RATHEE et al., 2010).

1.4 PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS – VOLTAMETRIA

A voltametria baseia-se na medida da corrente em função de um potencial aplicado em um eletrodo, em uma célula eletroquímica. A velocidade de oxidação ou redução de um analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo e o sinal obtido será proporcional a concentração do analito na célula eletroquímica. Dentre as técnicas voltamétricas mais empregadas no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos, se destacam a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD), no qual a VC é mais utilizada para estudos qualitativos e a VPD predominantemente empregada para quantificação de analitos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O emprego da VC no desenvolvimento de um procedimento eletroanalítico é de suma importância, uma vez que permite fornecer um diagnóstico sobre o processo de oxidação e/ou redução que ocorre com o analito a ser estudado, através de sua varredura de potencial direta e reversa. Com o emprego da VC é possível averiguar o perfil voltamétrico do analito de interesse, processo de transferência de elétron na reação eletroquímica, se a transferência de massa é predominantemente por difusão ou adsorção da espécie, identificar características da velocidade das reações eletroquímicas como reversibilidade, quase-reversibilidade ou irreversibilidade. Ainda com o emprego da VC, conhecendo a reversibilidade ou irreversibilidade do sistema de interesse e fazendo o uso adequado de equações, é possível explorar algumas características, como a área eletroativa dos eletrodos e o coeficiente de difusão do analito para cada determinado eletrodo (GOSSER, 1993; BARD; FAULKNER, 2001).

As técnicas de pulso, como a VPD são muito empregadas em procedimentos eletroanalíticos para a quantificação de analitos, devido a sua alta sensibilidade e definição, além de proporcionar limites de detecção baixos. Na VPD

a excitação do sinal é obtida como a soma de um pulso sobre uma rampa de potencial. Nessa técnica, a corrente é medida antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso, dessa forma é plotado a diferença entre essas correntes medidas vs o potencial aplicado. O emprego da diferença entre a corrente medida antes e depois do pulso possibilita fazer a correção da corrente capacitiva. Quando se aplica o pulso, observa-se a contribuição da corrente capacitiva (não-faradaica) e da corrente faradaica (corrente de interesse), porém a corrente capacitiva diminui exponencialmente enquanto a faradaica decresce linearmente, dessa forma, com um tempo apropriado de pulso, a corrente capacitiva pode ser desconsiderada, diminuindo a corrente de fundo (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001).

Os métodos voltamétricos são amplamente aplicados em determinações de uma variedade de fármacos em formulações farmacêuticas e em fluídos biológicos (GOYAL et al., 2007; JAIN et al., 2010; MAZLOUM-ARDAKANI et al., 2010; EISELE et al., 2013; ŠVORC; RIEVAJ; BUSTIN, 2013; FIGUEIREDO-FILHO et al., 2014; KALAMBATE; SRIVASTAVA, 2016; KHAIRY et al., 2017; ŠVORC et al., 2017).

Com a necessidade de se ter um método mais simples e de fácil aplicabilidade para análises de rotina, as técnicas voltamétricas são alternativas viáveis diante às descritas na literatura para a determinação simultânea de HCTZ e LNP ou AML e LNP. Vale ressaltar que nenhum método voltamétrico para determinação simultânea desses pares de anti-hipertensivos foi relatado na literatura. Porém são reportados procedimentos eletroanalíticos para HCTZ ou AML associados a outros analitos. Em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Eletroanalítica e Sensores – LAES) esses dois anti-hipertensivos vem sendo muito explorados. Eisele e colaboradores (2014) empregando um eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catódicamente (EDDB-PTC) e a voltametria de onda quadrada (VOQ) determinaram HCTZ e valsartana (VAL) simultaneamente em formulações farmacêuticas. O método proposto exibiu respostas lineares em uma faixa de concentrações de $1,99 - 88,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e de $9,88 - 220 \mu\text{mol L}^{-1}$ para VAL, os LDs foram respectivamente de $0,639$ e $0,935 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados mostram-se concordantes quando comparados à CLAE (EISELE et al., 2014). Um procedimento eletroanalítico foi desenvolvido para a determinação simultânea de AML e enalapril (ENA) em formulações farmacêuticas por Valezi e colaboradores (2014). Foi utilizada a VOQ acoplada a um eletrodo de pasta de nanotubos de

carbono (EPNTC), na presença de um surfactante. Com os parâmetros analíticos otimizados, foi obtida faixa linear de concentração e LD de 0,58 – 5,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,049 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e para ENA de 2,0 – 57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre o método proposto e o método comparativo (VALEZI et al., 2014). Salamanca-Neto e colaboradores (2015) determinaram simultaneamente HCTZ e ENA em formulações farmacêuticas, empregando a VOQ junto com um EPNTC. A faixa linear de concentrações obtida para a HCTZ foi de 0,49 – 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,0 – 83 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o ENA, com seus respectivos LD de 0,014 e 0,041 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método proposto foi comparado com a CLAE, obtendo resultados satisfatórios (SALAMANCA-NETO et al., 2015). Mansano e colaboradores (2015) desenvolveram um método para determinação simultânea de AML e VAL utilizando a VOQ e um EDDB-PTC. O método proposto exibiu respostas lineares em uma faixa de concentração de 0,49 – 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 19,8 – 280 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e VAL, respectivamente, os valores de LDs foram de 0,076 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e de 0,133 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para VAL. O método mostrou-se eficiente para determinação simultânea de AML e VAL em formulações farmacêuticas e em urina sintética (MANSANO et al., 2015a). Mansano, Eisele e Sartori (2015) determinaram simultaneamente uma mistura ternária de AML, HCTZ e VAL em formulações farmacêuticas. Para esse método foi empregado a VOQ junto com um EDDB-PTC, obtendo resultados satisfatórios para aplicação em amostras reais. A faixa linear de concentrações foi de 0,49 – 7,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML, 2,9 – 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e de 9,7 – 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para VAL, com os respectivos LD de 0,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (MANSANO et al., 2015b). Salamanca e colaboradores (2016) desenvolveram um método para determinação simultânea de HCTZ e metoprolol (MTP) em formulações farmacêuticas empregando a VPD acoplada a um EDDB-PTC. A faixa linear obtida foi de 0,51 – 18,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,23 – 22,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e MTP, respectivamente e os LD foram de 0,376 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a HCTZ e de 0,077 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o MTP (SALAMANCA-NETO et al., 2016). Moraes e colaboradores (2016) também utilizaram o EDDB-PTC para determinar simultaneamente AML e atenolol (ATN) em formulações farmacêuticas. A técnica empregada foi a VOQ e com os parâmetros analíticos otimizados, foi possível obter uma faixa linear de 2,9 – 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AML e de 9,8 – 190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o ATN, com seus respectivos LD de 0,17 e 0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (MORAES et al., 2016). Empregando a mesma técnica voltamétrica e o mesmo eletrodo de trabalho descrito

anteriormente, Moraes e colaboradores (2017) desenvolveram um procedimento para determinação de uma mistura quaternária para AML, cloridrato de amilorida (AMI), HCTZ e ATN. Foram obtidas respostas lineares em uma faixa de concentração de 0,90 – 31, 8,7 – 125, 29 – 260 e 11- 91 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com o LD de 0,30, 0,09, 0,08 e 0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML, AMI, HCTZ e ATN, respectivamente. O método proposto foi aplicado em formulações farmacêuticas e amostras de água, obtendo-se resultados satisfatórios (MORAES et al., 2017). Por fim, Mattos e colaboradores (2017) determinaram HCTZ em associação com o ramipril (RMP) em formulações farmacêuticas, empregando um EDDB-PTC junto com a VOQ. A faixa linear de concentração foi obtida entre 2,46 – 36,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e de 1,96 – 36,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o RMP, com os respectivos LD de 0,018 e 0,027 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (MATTOS et al., 2017).

Para a determinação individual de AML, HCTZ e de LNP empregando as técnicas voltamétricas são reportados diversos trabalhos na literatura, aplicando diferentes tipos de eletrodos de trabalho. Alguns dos eletrodos de trabalho utilizados nas determinações individuais de AML foram um eletrodo de carbono vítreo (ECV) (GAZY, 2004), um eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubos de carbono (GOYAL; BISHNOI, 2010), um EDDB (ŠVORC et al., 2014), um ECV modificado com um nanocompósito de grafite/quitosana (ARKAN et al., 2014), um ECV modificado com nanopartículas de ZrO_2 (MOHAMMADIZADEH; ZIA MOHAMMADI; KAYKHAI, 2017) e um eletrodo de lápis de grafite (JADON; JAIN; PANDEY, 2017). Já para a HCTZ foram empregados um ECV (ALGHAMDI, 2014), eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com ácido ferrocenodicarboxílico (KARIMI-MALEH; ENSAFI; ENSAFI, 2009), um EPNTC modificado com benzoil-ferroceno (BEITOLLAHI; GHORBANI, 2013), ECV modificado com nanotubos de carbono multicamadas (REZAEI; DAMIRI, 2008) e um eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente (EDDB-PTA) (SANTOS et al., 2013). Para a determinação de LNP, os eletrodos aplicados foram os ECV modificado com nanotubos de carbono multicamadas (ZHAN et al., 2009), um EPC (YOU; ZHENG; GAO, 2008) e um ECV modificado com um composto de β -ciclodextrina-óxido de grafeno- SO_3H (HASANZADEH et al., 2014).

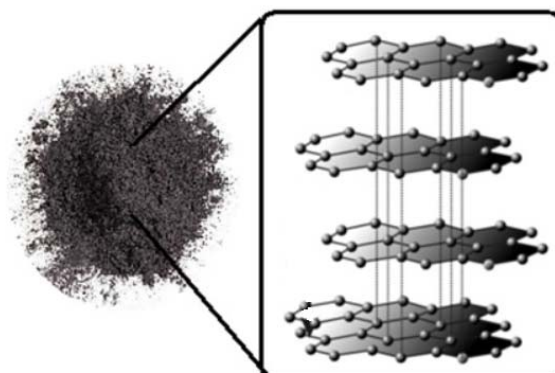
1.5 ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO (EPC)

Os EPCs baseiam-se na mistura homogênea de um material carbonáceo com um agente aglutinante. Esses eletrodos modificados ou não, vêm sendo utilizados em desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para determinações individuais ou simultâneas de uma variedade de analitos (PAPP et al., 2009; CHANDRA et al., 2010; MOKHTARI et al., 2012; GHOLIVAND; KHODADADIAN, 2013; NADIFIYINE et al., 2013; AFKHAMI et al., 2014; VALEZI et al., 2014; SALAMANCA-NETO et al., 2015; XU et al., 2016).

Os EPCs, no qual o material carbonáceo é o grafite, se destacam pela sua simplicidade e fácil aplicabilidade para determinações eletroquímicas, além de apresentar baixa corrente de fundo. Ademais, os EPC que utilizam o grafite, necessitam de menor quantidade de agente aglutinante, que é isolante, para obtenção de uma pasta homogênea quando comparado com EPC que utilizam carbon black e nanotubos de carbono. Com isso, obtém-se um EPC com maior condutância tornando-o mais atrativo e eficaz (KALCHER et al., 1995; ALBERTÚS et al., 1997).

Na Figura 2 é apresentada a estrutura química do grafite. O grafite é composto por camadas planas de carbono, no qual essas camadas formam redes de malhas hexagonais de átomos de C, como se fosse uma macromolécula formada por anéis de benzeno fundidos (LEE, 2000). Os átomos de C são ligados por ligações covalentes e as camadas são unidas por forças fracas de van der Waals. O carbono apresenta quatro elétrons na camada de valência, descrito pela configuração eletrônica C: [He] $2s^2 2p^2$. No grafite, dos quatro elétrons de valência, três estão envolvidos na formação das ligações σ (formadas a partir da sobreposição dos orbitais híbridos sp^2) e um elétron envolvido na formação das ligações π . O seu caráter condutor está relacionado diretamente à contribuição dos elétrons π deslocalizados por toda a camada de carbono (LEE, 2000; SHRIVER; ATKINS, 2008).

Figura 2 Estrutura química do grafite.



FONTE: adaptado de <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br> (2017).

Há reportado na literatura alguns trabalhos que utilizam o grafite na composição do EPC, sem nenhuma modificação em sua superfície, para a determinação de analitos em amostras reais. Fiorucci e Cavelheiro (2002) determinaram triptofano em formulações farmacêuticas utilizando um EPC juntamente com a técnica de VPD, obtendo resultados satisfatórios em uma faixa linear de $2,0 - 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIORUCCI; CAVALHEIRO, 2002). Radi (2003) desenvolveu um método para determinação de pantoprazol em formulações farmacêuticas utilizando um EPC junto com a voltametria adsortiva de redissolução de pulso diferencial (VARdPD), com tempo de acumulação de 5 min. Com os parâmetros analíticos otimizados, obteve-se resultados satisfatórios em uma faixa de concentrações de $0,1 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ (RADI, 2003). Kazemipour, Mohammadi e Ahmadi (2008) utilizando um EPC e empregando a voltametria adsortiva de redissolução de onda quadrada (VARdOQ), com tempo de acumulação de 3,7 min, desenvolveram um procedimento analítico para a determinação de AML em formulações farmacêuticas. O método proposto apresentou uma faixa linear de concentrações entre $9,9 - 140 \text{ nmol L}^{-1}$ e um LD de $0,2 \text{ nmol L}^{-1}$ e foi aplicado em amostras reais, obtendo resultados aceitáveis (KAZEMIPOUR et al., 2009). Outro anti-hipertensivo, o atenolol, foi determinado por Patil, Hegde e Nandibewoor (2009) utilizando a VPD com um EPC. O LD obtido foi de $0,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a faixa linear foi de $20 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde foi aplicado em formulações farmacêuticas e urina sintética (PATIL; HEGDE; NANDIBEWOR, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Empregar o EPC para desenvolver um procedimento voltamétrico para a determinação simultânea dos pares de anti-hipertensivos HCTZ e LNP ou AML e LNP.

Aplicar o procedimento desenvolvido na análise de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas combinadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empregar a VC para estudos de diagnóstico do comportamento voltamétrico de AML, HCTZ e LNP, como perfil voltamétrico, cálculo do número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica, além de caracterizar o tipo de transporte de massa envolvido.

Estudar a influência da proporção da pasta de carbono no desenvolvimento do EPC.

Avaliar o EPC como eletrodo de trabalho para a determinação LNP associado a HCTZ ou AML, comparando-o com ECV.

Investigar o melhor valor de pH e o melhor eletrólito suporte para a determinação simultânea dos pares de anti-hipertensivos HCTZ e LNP ou AML e LNP.

Avaliar a técnica VPD para a obtenção de curvas analíticas para a determinação simultânea de HCTZ e LNP ou AML e LNP.

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras analisadas e aplicar o método desenvolvido em formulações farmacêuticas combinadas empregando a VPD acoplada a um EPC.

Comparar estatisticamente os resultados obtidos com o método proposto com aqueles obtidos com o método comparativo, empregando-se avaliações estatísticas, como testes *F* e *t*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico, as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]), com resistividade superior a 18MΩ cm. AML, HCTZ, LNP e grafite em pó ($\leq 0,1\text{mm}$) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Metanol, cloreto de amônio, hidróxido de amônio, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio foram obtidos da Anidrol. Ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sódio foram obtidos da Merck e acetonitrila foi obtida da J. T. Baker. As formulações farmacêuticas contendo HCTZ-LNP (12,5 mg:10,0 mg) foram compradas em uma farmácia em Londrina, Estado do Paraná, Brasil.

O eletrólito suporte utilizado no desenvolvimento dos experimentos foi uma solução tampão Britton – Robinson (BR) (pH 10,0). Esta solução tampão foi preparada com a mistura de ácido acético $0,04\text{ mol L}^{-1}$, ácido bórico $0,04\text{ mol L}^{-1}$ e ácido fosfórico $0,04\text{ mol L}^{-1}$. O pH da solução tampão BR foi ajustado para 10,0 com a adição de uma solução de hidróxido de sódio $2,0\text{ mol L}^{-1}$.

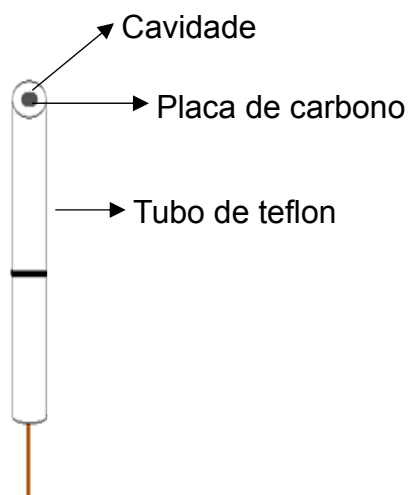
As soluções padrão dos anti-hipertensivos foram preparados a cada dia de experimento na concentração de 10 mmol L^{-1} em solução tampão BR (pH 10,0) contendo 40% de metanol.

3.2 PREPARO DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO (EPC)

O EPC (Figura 3) foi preparado com a mistura homogênea de grafite em pó e óleo mineral (Nujol[®]) na proporção de 65:35% (m/m). O grafite em pó e o óleo mineral foram cuidadosamente homogeneizados em uma placa de Petri com uma espátula de aço inoxidável por 10 minutos. Em seguida, a pasta de grafite foi cuidadosamente inserida na cavidade de um tubo de Teflon[®] com uma base de placa de carbono. A pasta foi compactada com a espátula resultando em uma superfície lisa. Antes da utilização do EPC, uma ativação eletroquímica deve ser realizada a fim de se obter respostas mais estáveis. Esta consiste em obter vinte e

cinco varreduras cíclicas em solução tampão BR (pH 10,0), na faixa de potencial de 0 a 1,2 V, com uma velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} .

Figura 3 Esquema demonstrativo do eletrodo de pasta de carbono utilizado no desenvolvimento do método analítico para determinação simultânea de HCTZ e LNP ou AML e LNP.

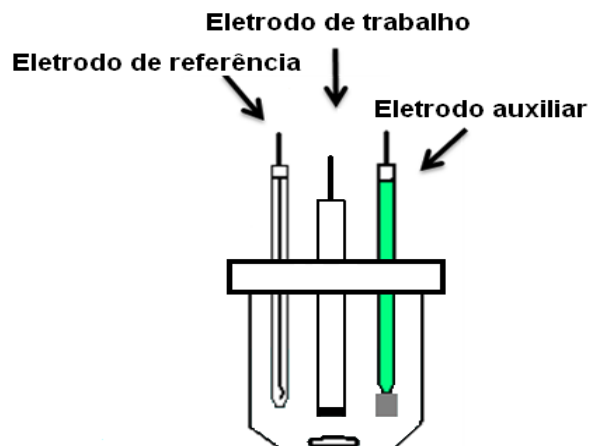


FONTE: o próprio autor.

3.3 INSTRUMENTAL

Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 15 mL, com uma tampa de Teflon[®], com encaixes para os eletrodos. O eletrodo referência foi Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e como eletrodo auxiliar foi empregado uma placa de platina $0,5 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$. O EPC descrito acima (área geométrica de $0,0707 \text{ cm}^2$) foi utilizado como eletrodo de trabalho (Figura 4).

Figura 4 Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho.



FONTE: o próprio autor.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato modelo FRA2 μ Autolab tipo III potenciostato/galvanostato controlado com o software GPES e acoplado a um microcomputador para aquisição dos dados.

Um eletrodo de carbono vítreo (ECV; 3 mm de diâmetro; Tokay Carbon Co, Japão) foi utilizado para devidas comparações propostas pelo trabalho. Antes do uso, o ECV foi mecanicamente polido com alumina em pó (0,05 μ m) e depois foi lavado com água ultrapura.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Shimadzu, modelo AY220, com precisão de $\pm 0,1$ mg. O pH foi medido a $25,0 \pm 0,5$ °C usando um pHmetro ION, modelo pHE500, empregando um eletrodo combinado de vidro com um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

O método comparativo utilizado para a determinação simultânea de HCTZ e LNP foi a CLAE (ERK; KARTAL, 1999), para o qual foi empregado um cromatógrafo da Perkin Elmer Flexar acoplado a um detector UV-Vis e uma coluna C18 (ACE, Escócia) com 250 \times 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μ m de tamanho de partícula.

3.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

A voltametria cíclica (VC) foi utilizada para estudos preliminares do comportamento eletroquímico dos anti-hipertensivos sobre o EPC e a voltametria de pulso diferencial (VPD) para a determinação simultânea.

Com os parâmetros instrumentais otimizados, a VPD foi empregada para a obtenção das curvas analíticas para HCTZ e LNP ou AML e LNP. Estas foram obtidas por adições sucessivas de alíquotas das soluções padrão dos anti-hipertensivos, na célula eletroquímica, contendo 10,0 mL de solução tampão BR (pH 10,0). Os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos após cada adição das alíquotas e todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada ponto da curva analítica.

O LD e o limite de quantificação (LQ) foram calculados conforme as equações:

$$LD = \frac{3 \times S_d}{m}$$

(1)

$$LQ = \frac{10 \times S_d}{m}$$

(2)

onde, S_d é o desvio padrão de dez medidas da solução branco e m é o coeficiente angular da curva analítica, de acordo com a recomendação da IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983).

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para aplicação do procedimento proposto foram utilizadas duas formulações farmacêuticas combinadas contendo HCTZ:LNP nas dosagens 12,5:10,0 mg por comprimido. Para isso, um total de 10 comprimidos de cada formulação foram macerados e reduzidos a um pó homogêneo em um almofariz com

auxílio de um pistilo. Em seguida, foi pesada uma massa correspondente a um comprimido e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL, contendo solução tampão BR (pH 10,0) e 40% de metanol. Feito isso, seguiu-se com a diluição dessa solução para um frasco volumétrico de 1,5 mL e por fim, uma adequada alíquota foi transferida para a célula voltamétrica contendo 10 mL de eletrólito suporte, obtendo-se os respectivos voltamogramas de pulso diferencial. As concentrações de HCTZ e LNP nas formulações farmacêuticas foram determinadas diretamente utilizando as curvas analíticas previamente construídas.

3.6 MÉTODO COMPARATIVO

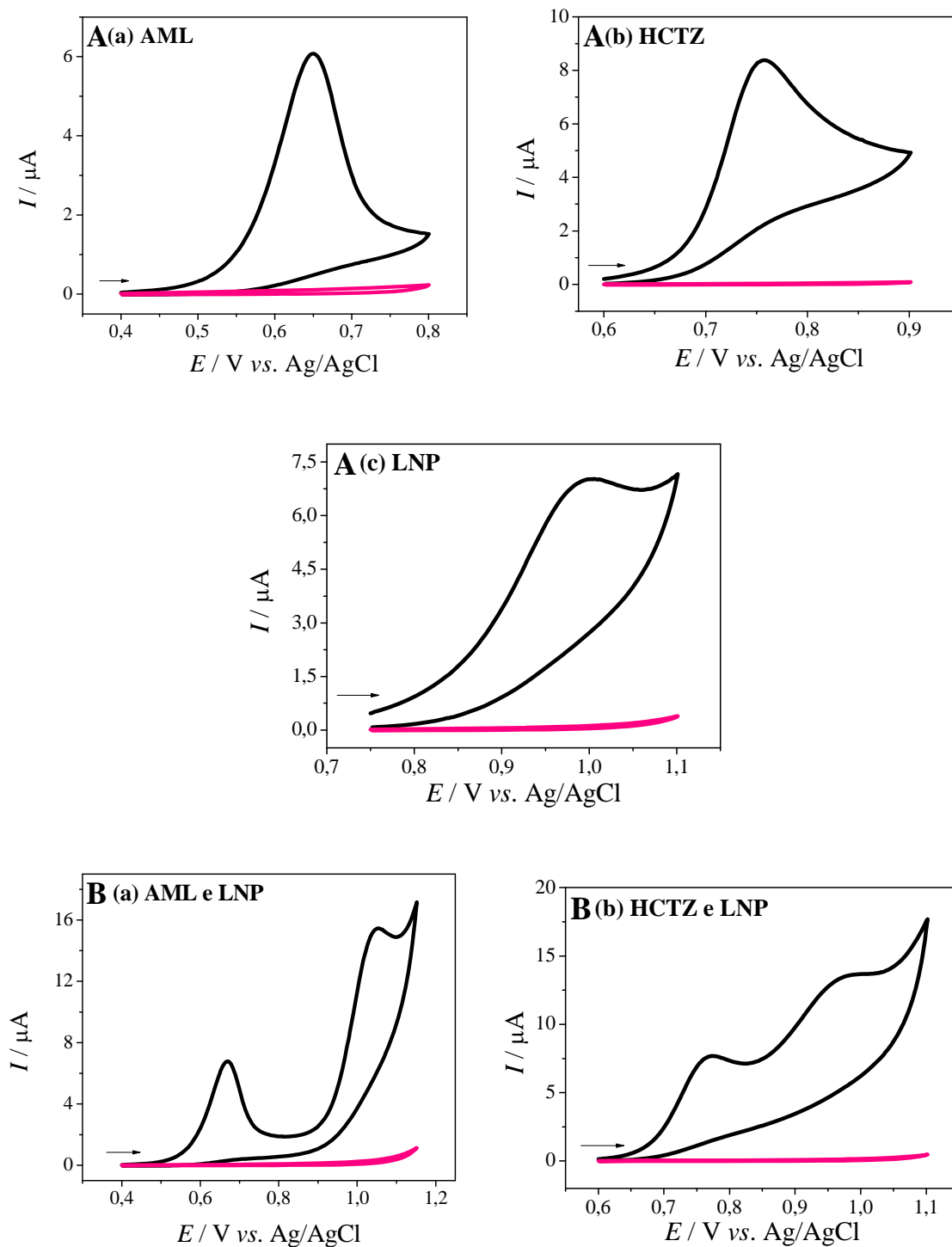
Os resultados obtidos com o método proposto para a determinação simultânea de HCTZ e LNP foi comparado com o método cromatográfico descrito por Erk e Kartal (ERK; KARTAL, 1999), com mínimas modificações. Para a separação dos fármacos foi utilizada uma coluna C18 (4,6 × 250 mm) e como fase móvel uma mistura de acetonitrila: água na proporção de 20: 80 (v/v), o pH da água foi ajustado para 3,8 com ácido acético. O fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL. A detecção foi realizada em 213 nm e os tempos de retenção foram 5,05 min para HCTZ e 3,38 min para LNP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE AML, HCTZ E LNP SOBRE O EPC

O comportamento voltamétrico de AML, HCTZ e LNP foram investigados por meio da VC (50 mV s^{-1}), utilizando o EPC. O eletrólito suporte foi a solução tampão BR (pH 10,0) e os voltamogramas cíclicos foram obtidos individualmente para $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP (Figura 5A) e foi verificado também o comportamento voltamétrico da associação dos pares de anti-hipertensivos AML e LNP; HCTZ e LNP, nas concentrações já estudadas (Figura 5B). Como pode ser visto, cada um desses anti-hipertensivos, AML, HCTZ e LNP, exibem um pico de oxidação bem definido em 0,65 V, 0,76 V e 0,99 V vs Ag/AgCl (KCl, $3,0 \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente (Figura 5A (a-c)). Na varredura reversa, não foi observado pico de redução; sendo assim, as reações eletroquímicas de AML, HCTZ e LNP sobre o EPC são caracterizadas pela irreversibilidade do processo redox. Além disso, os voltamogramas cíclicos para os pares de anti-hipertensivos AML e LNP (Figura 5B (a)) e HCTZ e LNP (Figura 5B (b)) revelaram uma separação entres os picos de oxidação de 0,34 V e 0,23 V, respectivamente, o que permite o desenvolvimento de procedimentos analíticos desses pares de anti-hipertensivos utilizando o EPC, sem alguma interferência.

Figura 5 Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) em solução tampão BR (pH 10,0) com adição: A(a) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML; A(b) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e A(c) $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP; e comportamento simultâneo de B(a) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, B(b) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando EPC.



O número de elétrons transferidos na eletro-oxidação de AML, HCTZ e LNP foi estimado utilizando a seguinte equação (BARD; FAULKNER, 2001) para sistemas irreversíveis:

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

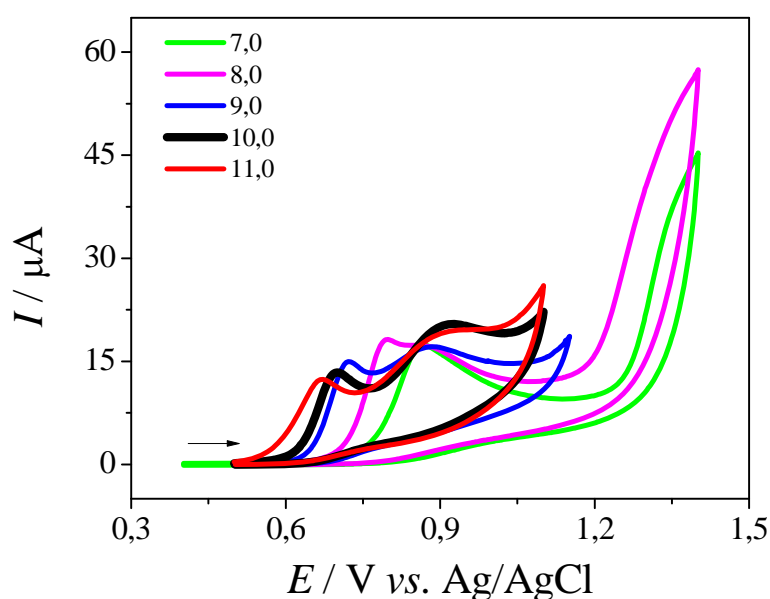
(3)

onde, E_p é o potencial de pico anódico ou catódico, $E_{\frac{p}{2}}$ é o potencial cujo valor da corrente é a metade do valor para E_p , α é o coeficiente de transferência eletrônica e n o número de elétrons transferidos na eletro-oxidação. Os valores de E_p e $E_{\frac{p}{2}}$ foram obtidos a partir dos dados mostrados na Figura 5A (a-c). Foram obtidos valores de 43 mV, 53 mV e 92 mV para a diferença entre potencial de pico e potencial de meio pico ($E_p - E_{\frac{p}{2}}$) para AML, HCTZ e LNP, respectivamente. Assim, valores iguais a 1,11, 0,90 e 0,52 foram determinados para αn . Considerando $\alpha = 0,5$ (geralmente empregado em sistemas totalmente irreversíveis) (LI, 2007), o número de elétrons transferidos na eletro-oxidação de AML, HCTZ e LNP foi calculado como sendo 2, 2 e 1, respectivamente. Os mecanismos de reações para o AML e HCTZ são bem elucidados na literatura para eletrodos a base de carbono. Dessa forma, acredita-se que a oxidação do AML ocorra no anel de 1,4-dihidropiridina, envolvendo um mecanismo com dois elétrons e dois prótons (DOGAN-TOPAL et al., 2009; ŠVORC et al., 2014; VALEZI et al., 2014). Já para a HCTZ também espera-se que dois elétrons e dois prótons estejam envolvidos na oxidação para clorotiazida (RAZAK, 2004; SALAMANCA-NETO et al., 2016). Para o LNP, não foi encontrado mecanismo de oxidação descrito na literatura, no entanto, esse mecanismo pode ser atribuído a oxidação do grupo amina secundária para hidroxilamina, com contribuição de um elétron (BRUICE, 2006); entretanto, o trabalho proposto não se concentra no esclarecimento direto do mecanismo detalhado da oxidação desses anti-hipertensivos.

4.2 EFEITO DO PH E ELETRÓLITO SUPORTE

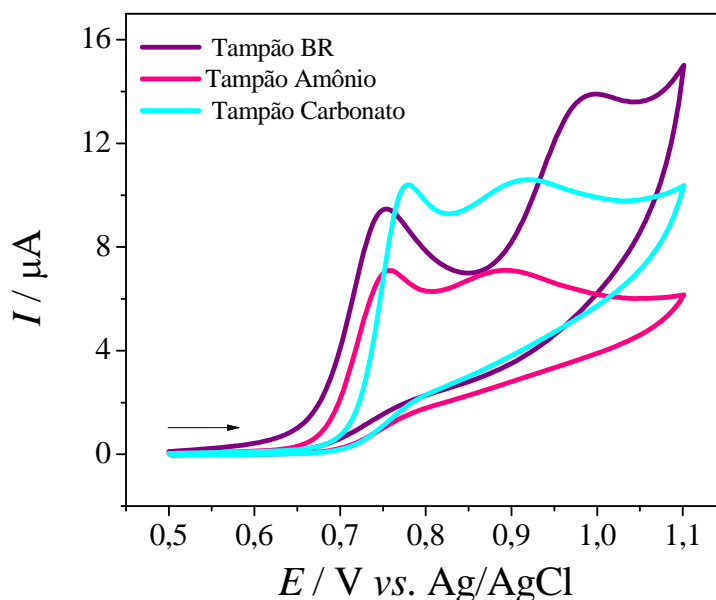
O estudo do efeito do pH se faz importante uma vez que este influencia diretamente as respostas eletroquímicas dos analitos. O estudo do pH para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, foi realizado nas concentrações de $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $286 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, empregando a VC (50 mV s^{-1}) em soluções tampão BR em uma faixa de pH entre 7,0 – 11,0 (Figura 6). Para valores de pH menores e igual a 7,0 foi observado sobreposição dos picos de oxidação. Analisando os voltamogramas cíclicos observa-se que a partir desse valor o potencial de oxidação da HCTZ desloca-se para valores menos positivos, tornando possível a determinação simultânea de HCTZ e LNP em EPC. Ainda para a HCTZ, é observado maior intensidade de corrente em pH 8,0. Para o LNP nota-se que o potencial de oxidação permanece quase constante em todos os valores de pH e demonstra um pico de maior magnitude de corrente e bem definido em pH 10,0. Portanto, o pH selecionado para a determinação simultânea de HCTZ e LNP foi o pH 10,0, visto que, as formulações farmacêuticas disponíveis para consumo apresentam uma quantidade de mol menor de LNP (HCTZ:LNP 12,5:10,0 mg por comprimido) e vale ressaltar que a sensibilidade do mesmo em EPC é menor que a de HCTZ.

Figura 6 Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $286 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, usando um EPC em solução tampão BR com diferentes valores de pH.



Selecionado o pH 10,0, foi então estudado diferentes soluções tampão, como BR ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$), amônio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e carbonato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 7). Avaliando os voltamogramas cíclicos obtidos, a solução tampão BR apresentou melhor definição de pico e maior intensidade de corrente para o LNP em relação ao tampão amônio e carbonato. É observado também que, para o tampão BR, a separação de potencial entre os picos de oxidação é maior, sendo então escolhido como eletrólito suporte para a determinação simultânea de HCTZ e LNP empregando o EPC.

Figura 7 Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de $97 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP em diferentes soluções tampão a pH 10,0, utilizando um EPC.



O estudo do pH também foi realizado para o par de anti-hipertensivos AML e LNP, nas mesmas condições do estudo para HCTZ e LNP. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1. Observa-se que para todos os valores de pH estudados ($7,0 - 11,0$) há uma separação dos potenciais de pico adequada para a determinação simultânea de AML e LNP e em pH 10,0 obtém-se uma maior magnitude de corrente para ambos os analitos e uma excelente repetibilidade entre as medidas, sendo assim, o pH 10,0 também selecionado para a determinação simultânea de AML e LNP.

Tabela 1 Influência do pH na determinação simultânea de AML e LNP, nas concentrações de $49 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $195 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, em tampão BR pH 10,0

pH	ΔE_{pa} (V)	I_{pa} (μA)	
		AML	LNP
7,0	0,28	6,25	9,73
8,0	0,30	4,68	9,75
9,0	0,38	7,57	11,57
10,0	0,34	10,12	14,58
11,0	0,46	7,82	11,93

4.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA PASTA DE GRAFITE NO EPC

O efeito da proporção de grafite na resposta eletroquímica foi estudado empregando a VC (50 mV s^{-1}) em uma faixa de potencial de 0,6 V a 1,1 V para HCTZ e LNP, ambos em uma concentração de $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 10,0). As proporções estudadas de Grafite:Nujol para a construção do eletrodo de trabalho foram de 60:40, 65:35 e 70:30 (m/m).

A intensidade do sinal analítico não apresentou diferença significativa entre as três proporções de pasta estudadas, com um desvio padrão relativo (DPR) menor que 5,0%; entretanto, maior repetibilidade foi obtida para a pasta com 65% de grafite na composição. Além disso, com a proporção selecionada é possível obter uma pasta homogênea, com uma superfície lisa do eletrodo e com boa condutividade, com repetibilidade e precisão dos resultados analíticos, sendo assim a proporção escolhida para o decorrer dos estudos.

Com a proporção da pasta de carbono selecionada (65:35 Grafite:Nujol (m/m)), foi então realizado um estudo de reprodutibilidade e estabilidade da mesma. O estudo da reprodutibilidade do preparo das pastas de carbono foi realizado comparando três pastas obtidas pelo mesmo procedimento. Para isso, foi comparado voltamogramas cíclicos do par de anti-hipertensivos HCTZ

e LNP, ambos em uma concentração de $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH 10,0). Um DPR de 3,6% foi obtido entre as três pastas, confirmando que a preparação da pasta é reprodutível. Em seguida foi realizado o estudo da estabilidade da pasta nas análises eletroquímicas. Após vinte e cinco ciclos do branco em VC (100 mV s^{-1}) a pasta apresentou maior estabilidade, sendo assim necessário realizar este procedimento depois do preparo do eletrodo de trabalho. Ainda para a estabilidade da pasta, observou-se que após realizar trinta medidas, a corrente anódica de HCTZ e LNP diminuiu em torno de 5,0 %, indicando a necessidade de renovação da superfície do eletrodo para uma maior repetibilidade das medidas.

4.4 COMPARAÇÃO COM ECV

O comportamento voltamétrico dos pares de anti-hipertensivos, AML e LNP ou HCTZ e LNP obtido com o EPC foi comparado com aquele obtido empregando-se o ECV (Figura 8A e 8B). Para uma comparação adequada, a corrente foi normalizada em relação à área utilizando a densidade de corrente (J), onde foi utilizada a área eletroativa. Essa foi calculada utilizando a equação de Randles-Sevcik descrita abaixo e solução de ferrocianeto de potássio (coeficiente de difusão de $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (GOSSER, 1993), variando-se a velocidade de varredura no intervalo de 30 a 210 mV s^{-1} :

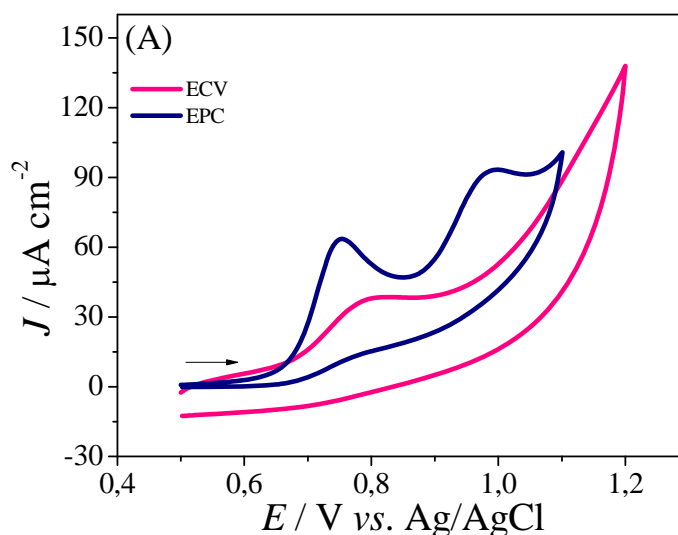
$$I_p = 2,69 \times 10^{-5} \times n^{\frac{3}{2}} \times A \times D_0^{\frac{1}{2}} \times v^{\frac{1}{2}} \times C_0 \quad (4)$$

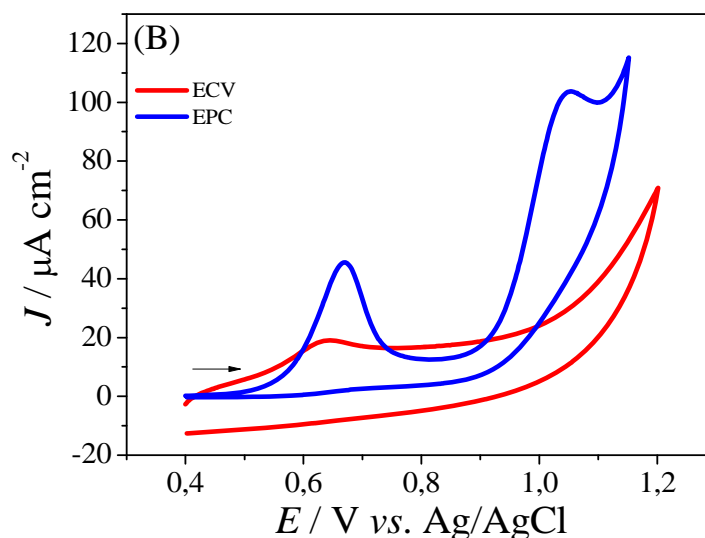
onde, I_p (A) é a corrente de pico, podendo ser catódica ou anódica, n é o número de elétrons da reação eletroquímica, A (cm^2) é a área eletroativa do eletrodo, D_0 ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) é o coeficiente de difusão da espécie envolvida, v (V s^{-1}) é a velocidade de varredura e C_0 (mol cm^{-3}) é a concentração da espécie envolvida. Valores de $0,149 \text{ cm}^2$ e $0,065 \text{ cm}^2$ foram obtidos para a área eletroativa do EPC e ECV, respectivamente. Com a corrente devidamente normalizada, foi então realizada a comparação do EPC e ECV para os pares de anti-hipertensivos. Esse estudo foi realizado aplicando a VC (50 mV s^{-1}), as concentrações foram de $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de

AML, $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP e como eletrólito suporte uma solução tampão BR (pH 10,0).

Pode-se observar que, nessas condições experimentais, para o ECV é observado apenas pico de oxidação para o AML e HCTZ e que empregando o EPC os três anti-hipertensivos AML, HCTZ e LNP apresentam picos de oxidação (Figura 8A e 8B). Ainda para o EPC, são obtidos picos de oxidação com maior intensidade de corrente e maior definição dos picos para os três anti-hipertensivos; além disso, uma menor corrente capacitiva é observada. Dessa forma, pode-se justificar a escolha do EPC para a determinação simultânea dos pares de anti-hipertensivos AML e LNP ou HCTZ e LNP.

Figura 8 Voltamogramas cíclicos para a comparação entre EPC e ECV em solução tampão BR (pH 10,0) para o comportamento simultâneo de: (A) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP e (B) $19 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML e $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} ; área eletroativa de $0,149 \text{ cm}^2$ e $0,065 \text{ cm}^2$ para EPC e ECV, respectivamente.





4.5 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

O efeito da velocidade para AML, HCTZ e LNP foi investigado utilizando uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e LNP, empregando a VC em um intervalo de $5 - 200 \text{ mV s}^{-1}$ em solução tampão BR pH 10,0 (Figura 9). Como pode ser observado, com o aumento da velocidade de varredura a magnitude da corrente de pico aumenta e desloca para valores de potenciais mais positivos para AML, HCTZ e LNP, indicando a irreversibilidade do sistema (GOSSER, 1993). Com a obtenção de linearidade entre as correntes de pico anódica versus a raiz quadrada da velocidade de varredura:

$$I_{\text{AML}} = -2,48 + 1,54 v^{1/2} \quad (r = 0,996)$$

$$(5) \quad I_{\text{HCTZ}} = 0,24 + 0,73 v^{1/2} \quad (r = 0,999)$$

$$(6) \quad I_{\text{LNP}} = -0,41 + 1,06 v^{1/2} \quad (r = 0,997)$$

(7)

indica-se um processo controlado predominantemente por difusão das espécies na reação de oxidação dos anti-hipertensivos (BRETT; BRETT, 1993; GOSSER, 1993). A Figura 10 (A – C) apresenta gráficos da linearidade do logaritmo da intensidade de corrente de pico versus o logaritmo da velocidade de varredura, para AML, HCTZ e LNP, respectivamente, sendo:

$$\log I_{\text{AML}} = -0,293 + 0,697 \log v \quad (r = 0,997)$$

(8)

$$\log I_{\text{HCTZ}} = -0,0739 + 0,475 \log v \quad (r = 0,999) \quad (9)$$

$$\log I_{LNP} = -0,0323 + 0,519 \log v \quad (r = 0,998)$$

(10)

com inclinações próximas a 0,50, confirmando assim que a oxidação dos anti-hipertensivos é controlada por difusão na superfície do EPC.

Como os fármacos possuem uma reação caracterizada por difusão, o coeficiente de difusão (D_o) de cada um foi obtido usando cronoamperometria e o EPC em solução tampão BR (pH 10,0). Os potenciais foram fixados em 0,67 V, 0,73 V e 1,0 V para AML, HCTZ e LNP, respectivamente e os cronoamperogramas foram obtidos para os intervalos de concentração de 1,99 – 54,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML, 1,99 – 70,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e 9,99 – 443 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP. Os valores de D_o foram então calculados partir dos gráficos de corrente versus o inverso da raiz quadrada do tempo e da equação de Cottrell (BARD; FAULKNER, 2001):

$$I = \frac{nFAC_oD_o^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

(11)

onde, n = é o número de elétrons envolvidos da reação de eletro-oxidação, F é a constante de Faraday (96500 C mol⁻¹), A é a área eletroativa do eletrodo (cm²), D_o é o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹) e C_o é a concentração (mol cm⁻³). Obtendo valores de D_o , iguais a $5,8 \times 10^{-4}$, $7,7 \times 10^{-5}$ e $2,4 \times 10^{-4}$ cm² s⁻¹ para AML, HCTZ e LNP, respectivamente. Na literatura são reportados valores de D_o para AML, HCTZ e LNP usando diferentes eletrólitos suporte, pH ou eletrodos; esses valores são de $2,5 \times 10^{-4}$ cm² s⁻¹ para AML em solução tampão BR (pH 5,0) com um EDDB-PTC (MANSANO et al., 2015a); $1,75 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹ para HCTZ em solução tampão fosfato (pH 7,0) com um EPNTC modificado com benzoil-ferroceno (BEITOLLAHI; GHORBANI, 2013) e $4,8 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹ para o LNP em solução tampão fosfato (pH 6,0) com um ECV modificado com um composto de β-ciclodextrina-óxido de grafeno-SO₃H (HASANZADEH et al., 2014).

Figura 9 Voltamogramas cíclicos em solução tampão BR (pH 10,0) para (A) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, (B) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (C) $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando um EPC em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150, (h) 175, (i) 200 mV s^{-1} .

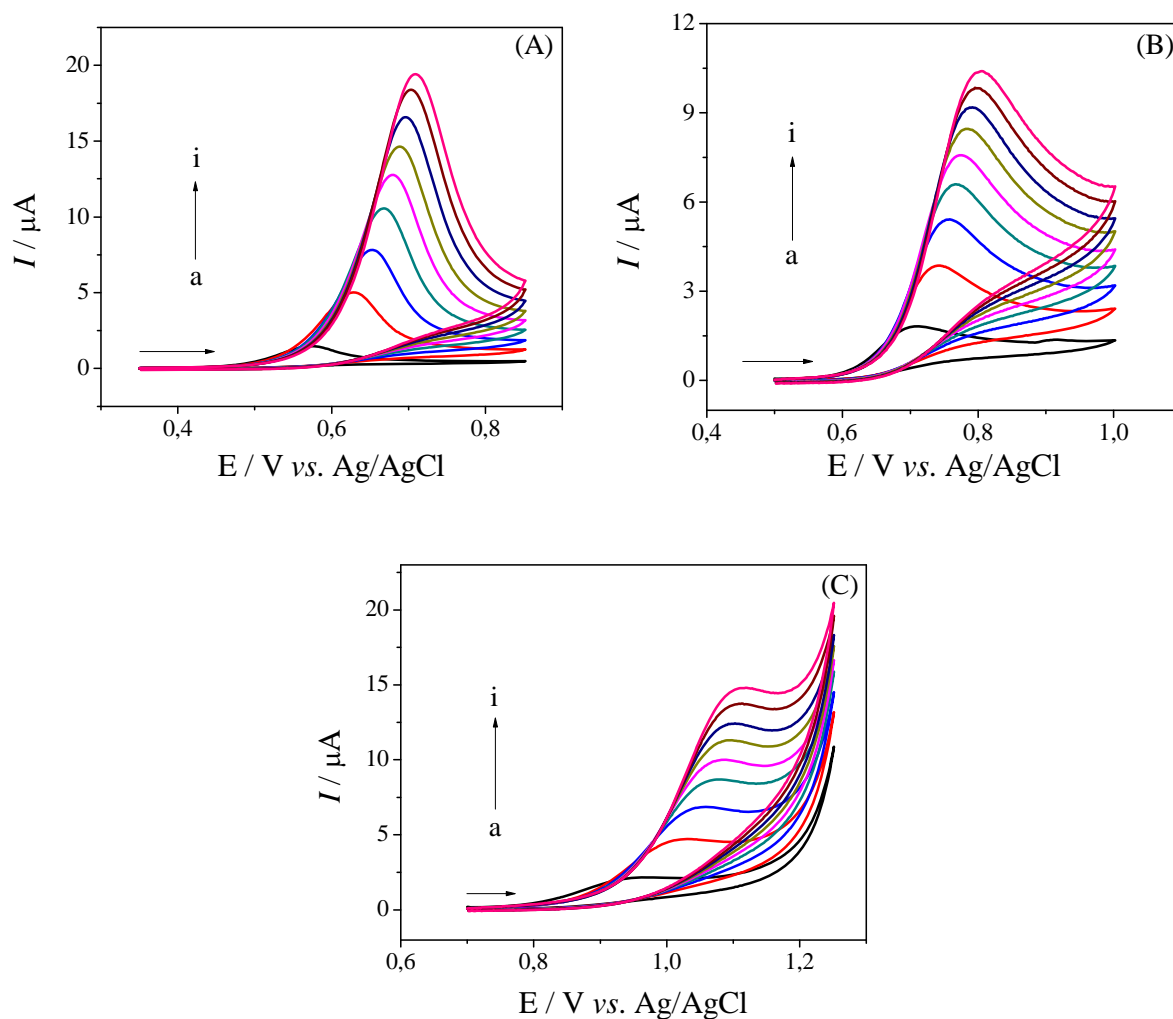
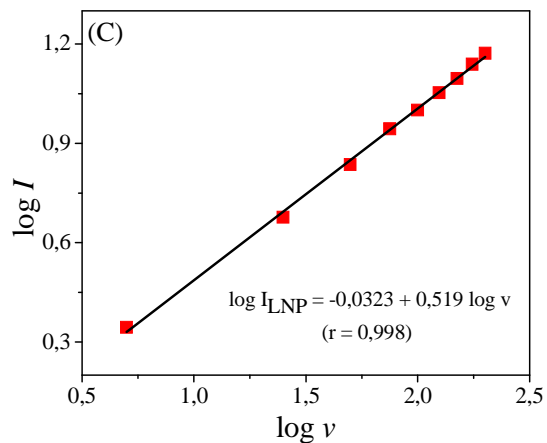
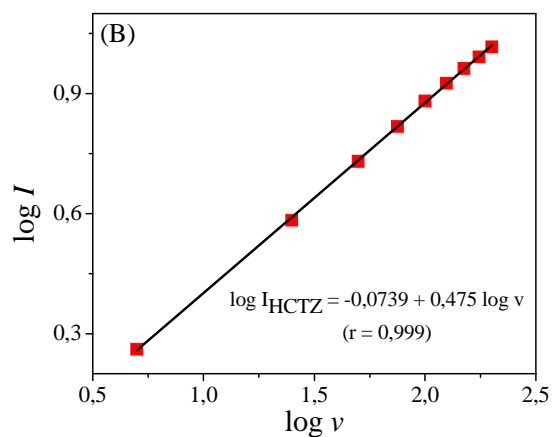
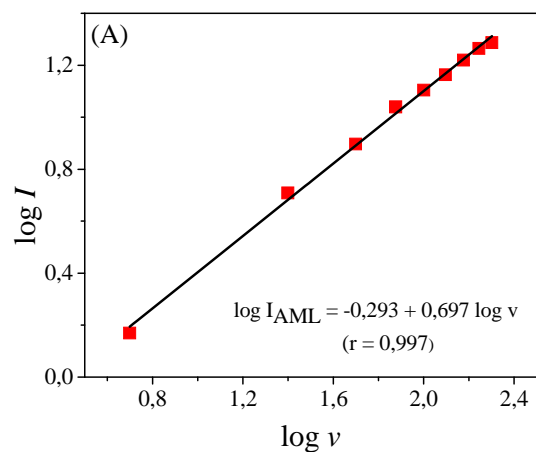


Figura 10 Relação linear entre logaritmo da intensidade de corrente de pico versus o logaritmo da velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos: (A) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AML, (B) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e (C) 99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, utilizando um EPC em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150, (h) 175, (i) 200 mV s^{-1} .



4.6 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP UTILIZANDO UM EPC

A técnica de VPD foi selecionada para o desenvolvimento do método analítico visando à determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC. A VPD é uma das técnicas mais utilizadas para fins eletroanalíticos devido a sua alta sensibilidade e definição. Sendo assim, os parâmetros da técnica de VPD foram estudados utilizando o EPC em solução tampão BR (pH 10,0) contendo HCTZ e LNP, ambos na concentração de $99 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros investigados foram amplitude de pulso (a), velocidade (v) e tempo de modulação (t) e os valores estudados e selecionados estão listados na Tabela 2. Os valores selecionados apresentaram boa repetibilidade, separação de potenciais de picos adequada e maior intensidade de corrente para o LNP, uma vez que este possui menor número de mol em formulações combinadas quando comparado com a HCTZ.

Tabela 2 Parâmetros instrumentais da VPD avaliados para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC

Parâmetros	Intervalo estudado	Valor selecionado
Amplitude de pulso (a) (mV)	10 – 60	50
Velocidade (v) (mV s^{-1})	2,5 – 10	7,5
Tempo de modulação (t) (ms)	3 – 7,5	5

Com os parâmetros da técnica de VPD definidos, foram obtidos os respectivos voltamogramas para HCTZ e LNP, como mostrado na Figura 11. Em seguida as curvas analíticas foram construídas para os anti-hipertensivos, a fim de se determinar simultaneamente HCTZ e LNP utilizando um EPC (inserido na Figura 11), obtendo as seguintes equações da reta (12 – 13) e em seguida, na Tabela 3 está sumarizado os parâmetros analíticos obtidos para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC.

$$I_{\text{HCTZ}} / \mu\text{A} = -0,144 + 9,31 \times 10^4 [\text{c} / \text{mol L}^{-1}] \quad (r = 0,995) \quad (12)$$

$$I_{\text{LNP}} / \mu\text{A} = -0,639 + 2,62 \times 10^4 [\text{c} / \text{mol L}^{-1}] \quad (r = 0,992) \quad (13)$$

Figura 11 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação HCTZ e LNP em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. As concentrações de HCTZ e LNP foram alteradas simultaneamente (2 – 7): 1,99 – 70,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HCTZ e 9,97 – 442 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP. Inserido: curva analítica (A) HCTZ e (B) LNP. VPD: $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta V = 7,5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 5 \text{ ms}$.

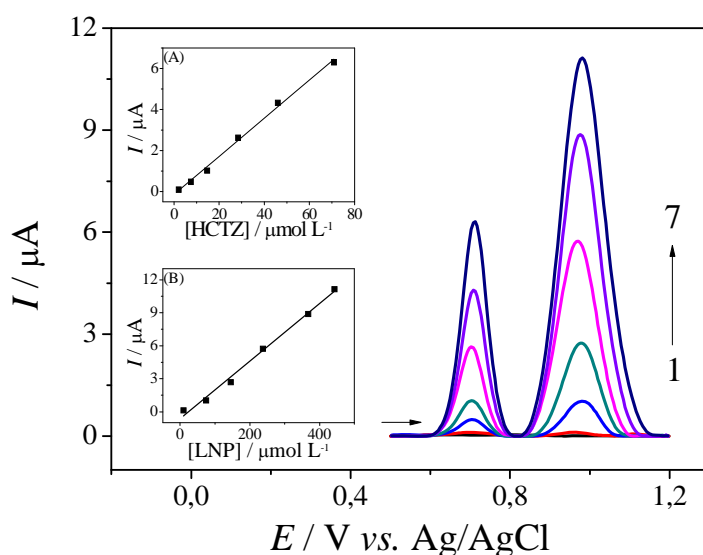


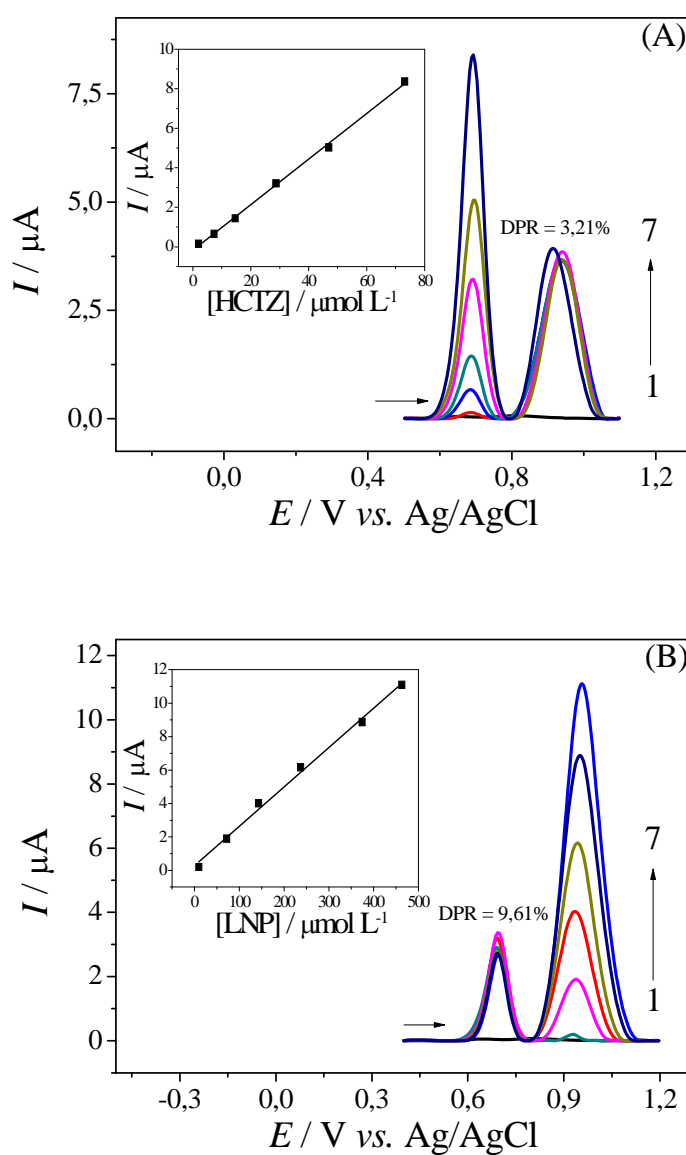
Tabela 3 Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, utilizando um EPC

Parâmetros obtidos	HCTZ	LNP
Potencial de pico (V)	0,71	0,98
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,99 – 70,8	9,97 – 442
Coefficiente de correlação (r)	0,995	0,992
Coefficiente angular ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$)	$9,31 \times 10^4$	$2,62 \times 10^4$
Coefficiente linear (μA)	-0,144	-0,639
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,78	1,70
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,59	5,67

A interferência de HCTZ ou LNP na determinação simultânea foi realizada alterando a concentração de um dos fármacos e mantendo a outra inalterada. Essas análises foram realizadas empregando a VPD, em solução tampão BR (pH 10,0). Na Figura 12A são observados os voltamogramas de pulso diferencial, onde fixou-se o LNP em uma concentração de 148 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo-

se constante com um DPR de 3,21% e variando a HCTZ em uma faixa de concentração de 1,97 – 73,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na Figura 12B, fixou-se a HCTZ em uma concentração de 29,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo-se constante com um DPR de 9,61% e variando a concentração de LNP entre 9,70 – 443 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 12 Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de (A) HCTZ (2 – 7): 1,97 – 73,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 148 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP. (B) LNP (2 – 7): 9,70 – 443 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 29,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. VDP: $\alpha = 50$ mV, $\nu = 7,5$ mV s $^{-1}$ e $t = 5$ ms.



Na Tabela 4, está sumarizado os dados analíticos obtidos para este estudo em comparação com aqueles obtidos para a determinação simultânea. Observa-se que a sensibilidade da curva analítica para HCTZ e LNP, nestas condições, não difere significativamente daquela obtida nas curvas analíticas para a determinação simultânea desse par de anti-hipertensivos. Com esses resultados, é possível garantir que tanto um quanto o outro anti-hipertensivo não interfere na determinação simultânea.

Tabela 4 Comparação entre as curvas analíticas obtidas para determinação simultânea de HCTZ e LNP em solução tampão BR (pH 10,0)

Molécula	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)
a) Dados analíticos fixando LNP em $148 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variando HCTZ 1 HCTZ	1,97 – 73,1	$I_{\mu\text{A}} = -0,174 + 11,53 \times 10^4 [c / \text{mol L}^{-1}]$	0,998
b) Dados analíticos fixando HCTZ em $29,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variando LNP 2 LNP	9,70 – 443	$I_{\mu\text{A}} = -0,279 + 2,35 \times 10^4 [c / \text{mol L}^{-1}]$	0,994
c) Dados analíticos para HCTZ e LNP determinados simultaneamente 3 HCTZ	1,99 – 70,8	$I_{\mu\text{A}} = -0,144 + 9,31 \times 10^4 [c / \text{mol L}^{-1}]$	0,995
4 LNP	9,97 – 442	$I_{\mu\text{A}} = -0,639 + 2,62 \times 10^4 [c / \text{mol L}^{-1}]$	0,992

A repetibilidade intra- e inter-dia da corrente do pico de oxidação de HCTZ e LNP foi avaliada tendo em vista o DPR obtido para 10 medidas de $29,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCTZ e $149 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP. Os valores obtidos foram de 2,7% e 4,2% para as medidas intra-dia, respectivamente para HCTZ e LNP. Valores de 5,1% e 5,5% para HCTZ e LNP, respectivamente, foram obtidos nas medidas inter-dia. Esses resultados indicam a viabilidade de determinação de HCTZ e LNP simultaneamente, uma vez que apresentam repetibilidade das medidas aceitáveis.

4.7 COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP

A Tabela 5 sumariza a comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para a determinação simultânea de HCTZ e LNP empregando VPD em

conjunto com o EPC em solução tampão BR (pH 10,0), com aqueles obtidos com outros métodos analíticos previamente descritos na literatura. Pode-se observar que os resultados analíticos obtidos no proposto trabalho estão próximos dos valores já descritos na literatura. Porém, o método aqui proposto mostrou-se mais adequado para a determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas, uma vez que apresenta vantagens como, não usar uma quantidade significativa de solventes orgânicos, o tempo em cada análise é menor do que os relatados e por não ser necessário o uso de procedimentos matemáticos, justificando o desenvolvimento do método analítico empregando a VPD para a determinação simultânea de HCTZ e LNP utilizando um EPC.

Tabela 5 Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por cromatografia e espectrofotometria em comparação com método voltamétrico proposto para a determinação simultânea de HCTZ e LNP

Técnica	Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Referência
	HCTZ	LNP	HCTZ	LNP	
CLAE	3,36 – 134	3,70 – 138	–	–	(ERK; KARTAL, 1999)
CLAE	336 – 3360,0	197 – 2470,0	0,017	0,012	(IVANOVIĆ et al., 2007)
CLAE-FR	33,6 – 168	1,23 – 61,6	1,41	0,73	(WAGH et al., 2012)
CIS	17,0 – 134	49,3 – 197	4,70	1,68	(IDRIS et al., 2012)
CL	84,0 – 590	98,6 – 493	1,48	1,11	(DE DIEGO; SOTO; MENNICKENT, 2014)
CL-EM/EM	0,0017 – 0,84	0,0012 – 0,62	–	–	(SHAH et al., 2016)
ED-RE	20,0 – 469	38,6 – 319	–	–	(ERK, 1998)
ED- ³ D	8,4 – 58,8	19,7 – 138	1,0	3,70	(EL-GINDY et al., 2001)
ED- ² D	16,8 – 67,2	19,7 – 98,7	0,67	1,73	(EL-GINDY et al., 2001)
ED-MQC	26,9 – 672	37,0 – 730	1,34	1,97	(EL-GINDY et al., 2001)
E-RCP	26,9 – 672	37,0 – 730	1,0	1,48	(EL-GINDY et al., 2001)
E-CM	10,1 – 36,9	9,86 – 49,3	–	–	(DINÇ et al., 2013)
Método de Vierordt	16,8 – 67,2	2,47 – 24,7	–	–	(KUMAR et al., 2013)
VPD	1,99 – 70,8	9,97 – 442	0,78	1,70	Este trabalho

4.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE HCTZ E LNP EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Com as condições do método otimizadas, o efeito de interferentes em potencial na determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais, como: dióxido de silício, lactose, celulose monocristalina, estearato de magnésio e dióxido de titânio. O estudo foi realizado de forma individual para os anti-hipertensivos, com concentração de $39,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a HCTZ e de $196 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LNP, as análises foram realizadas na proporção 1:1, 1:10 e 10:1 (solução padrão:excipiente) (m/m). Os sinais de corrente obtidos foram comparados com aqueles obtidos para as medidas feitas somente com as soluções padrão. Não foi observado diferença significativa, com um DPR inferior a 5,0 %, entre os valores de corrente comparados, indicando que os excipientes presentes nas formulações farmacêuticas não interferem significativamente na determinação simultânea de HCTZ e LNP, nessas condições experimentais.

Em seguida, o método proposto para determinação simultânea de HCTZ e LNP utilizando um EPC, foi aplicado em duas formulações farmacêuticas combinadas (HCTZ:LNP 12,5:10,0 mg por comprimido). A concentração de HCTZ e LNP presentes nas formulações farmacêuticas combinadas foram determinadas sem nenhum tratamento prévio, o que indica a rapidez e viabilidade do método proposto. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos pelo método proposto em comparação àqueles obtidos com método comparativo CLAE (ERK; KARTAL, 1999). Os valores encontrados empregando-se a VPD estão em concordância com os valores do método comparativo. O DPR das amostras para HCTZ demonstrou valores máximos de 3,1% e 1,6% para os métodos VPD e CLAE, respectivamente. Para o LNP, observou-se um valor máximo de DPR de 2,9% para ambos os métodos. Além disso, foi avaliada a exatidão entre os métodos aplicando o teste-*t* pareado (ANDERSON, 1987) obtendo os seguintes valores de *t* calculado, 5,0 para HCTZ e 7,0 para o LNP, no qual foi menor que o valor de *t* crítico (12,7; $\alpha = 0,05$), indicando que os métodos comparados não são estatisticamente diferentes em um nível de confiança de 95%. A análise das variâncias foi verificada com o teste *F*, onde todos os valores de *F* calculados (Tabela 6), são menores que o valor crítico de *F* tabelado (19,0), indicando precisão entre os métodos comparados em um nível de confiança

de 95%. Ademais, o estudo de adição e recuperação foi realizado nas formulações farmacêuticas de interesse, a fim de fornecer informações sobre a influência de possíveis interferentes presentes na matriz das amostras. As recuperações obtidas foram de 102 % para HCTZ e 98,5 % para LNP, indicando que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação simultânea de HCTZ e LNP pelo método proposto.

Tabela 6 Resultados obtidos para determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas combinadas utilizando o método proposto em comparação com a CLAE

Amostra	Analito	Quantidade (mg comprimido ⁻¹) ^a			E (%) ^b	F _{calc} ^c
		Rotulado	CLAE	VPD		
A	HCTZ	12,5	13,1 ± 0,2	12,8 ± 0,4	-2,3	4,0
	LNP	10,0	9,9 ± 0,1	10,2 ± 0,3	3,0	9,0
B	HCTZ	12,5	12,6 ± 0,2	12,4 ± 0,1	-1,6	4,0
	LNP	10,0	10,2 ± 0,3	9,8 ± 0,2	-3,9	2,3

^a Média de 3 medições.

^b $100 \times [(\text{método VPD} - \text{método CLAE}) / \text{método CLAE}]$.

^c Valor F crítico = 19,0 (nível de confiança de 95 %).

4.9 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AML E LNP UTILIZANDO UM EPC

O LNP pode ser encontrado em formulações farmacêuticas associado também com o AML (AML:LNP; 5,0:20 mg por comprimido) e um procedimento analítico para o seu controle de qualidade se faz importante. Empregando-se as mesmas condições experimentais descritas para a determinação simultânea de HCTZ e LNP, a Figura 13 apresenta voltamogramas de pulso diferencial para a determinação simultânea de AML e LNP. As curvas analíticas para o AML e LNP apresentaram boa correlação entre concentração e corrente de pico anódico, em faixas de concentração que possibilitam a determinação simultânea em formulações farmacêuticas combinadas (AML:LNP; 5,0:20 mg por comprimido). Ademais, o método proposto apresenta baixos valores de LD e repetibilidade intra- e

inter- dia adequadas para aplicação do método proposto para determinação simultânea de AML e LNP em formulações farmacêuticas combinadas (Tabela 7).

Figura 13 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a oxidação AML e LNP em solução tampão BR (pH 10,0), empregando um EPC. As concentrações de AML e LNP foram alteradas simultaneamente (2 – 7): 1,99 – 54,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AML e 19,9 – 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para LNP. Inseto: curva analítica (A) AML e (B) LNP. VPD: $v = 50 \text{ mV}$, $\nu = 7,5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t = 5 \text{ ms}$.

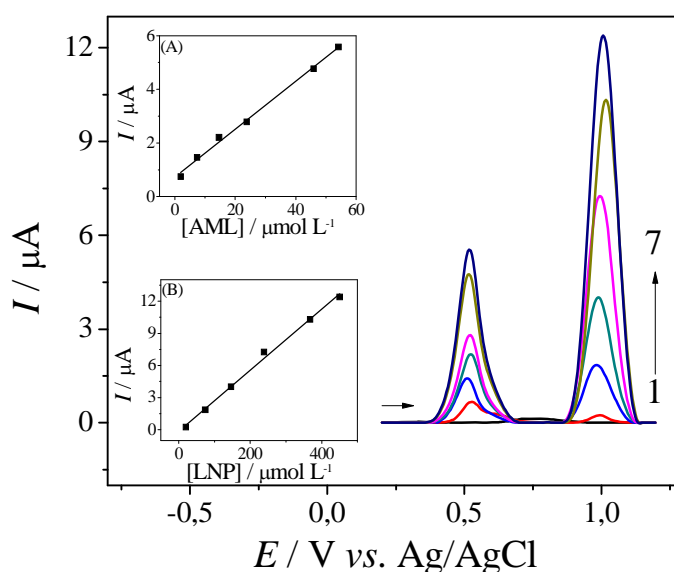


Tabela 7 Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de AML e LNP, utilizando um EPC

Parâmetros obtidos	AML	LNP
Potencial de pico (V)	0,52	0,99
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,99 – 54,1	19,9 – 450
Coefficiente de correlação (r)	0,995	0,994
Coefficiente angular ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$)	$8,95 \times 10^4$	$2,85 \times 10^4$
Coefficiente linear (μA)	0,724	0,0876
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,784	2,08
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,61	6,94
Repetibilidade Intra-dia (%)	2,8	4,3
Repetibilidade Inter-dia (%)	4,7	5,8

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, o método proposto utilizando a VPD com um EPC para determinação simultânea de HCTZ e LNP em formulações farmacêuticas demonstrou-se eficaz, simples, rápido, preciso, econômico e ambientalmente amigável, ao contrário dos métodos já descritos na literatura, indicando que o método proposto pode ser usado para análises de rotina. Além disso, o EPC mostrou robustez e aplicabilidade com facilidade de preparo, aquisição e sem a necessidade de qualquer tipo de modificação em sua superfície o que o torna mais simples e prático. Os resultados obtidos para determinação simultânea de HCTZ e LNP em amostras reais pelo método proposto foram concordantes com os obtidos pelo método cromatográfico a um nível de confiança de 95 %. Ademais, utilizando os mesmos parâmetros analíticos descritos para a determinação simultânea de HCTZ e LNP é possível determinar o LNP simultaneamente com outra associação de anti-hipertensivos, como o AML, em amostras reais.

6 REFERÊNCIAS

AFKHAMI, A.; KHOSHSAFAR; BAGHERI, H.; MADRAKIAN, T. Facile simultaneous electrochemical determination of codeine and acetaminophen in pharmaceutical samples and biological fluids by graphene–CoFe₂O₄ nanocomposite modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 203, p. 909–918, 2014.

ALBERTÚS, F.; LLERENA, A.; ALPÍZAR, J.; CERDÁ, V.; LUQUE, M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. A PVC–graphite composite electrode for electroanalytical use. Preparation and some applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 355, n. 1, p. 23–32, 1997.

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

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

ARKAN, E.; KARIMI, Z.; SHAMSIPUR, M.; SABER, R. An electrochemical sensor for determination of amlodipine besylate based on graphene–chitosan nanocomposite film modified glassy carbon electrode and application in biological and pharmaceutical samples. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 99–107, 2014.

BANKAR, R. R.; MODHA, N. A Validated stability indicating RP-HPLC method of estimation of amlodipine besylate and lisinopril in pharmaceutical dosage forms. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 7, p. 784–789, 2013.

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

BEITOLLAHI, H.; GHORBANI, F. Benzoylferrocene-modified carbon nanotubes paste electrode as a voltammetric sensor for determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical and biological samples. **Ionics**, v. 19, n. 11, p. 1673–1679, 2013.

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

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, 2009.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed ed. São Paulo: Pearson, 2006.

CHANDRA, U.; SWAMY, K. B. E.; GILBERT, O.; SHERIGARA, B. S. Voltammetric resolution of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid at poly (calmagite) film coated carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 24, p. 7166–7174, 2010.

CHAUHAN, V.; PRAJAPATI, S. T.; PATEL, C. N. A validated RP-HPLC method for

simultaneous estimation of amlodipine and lisinopril in pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Research**, v. 2, n. 7, p. 1712–1715, 2011.

DIEGO, M.; SOTO, J.; MENNICKENT, S. Stability-Indicating LC method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 10, p. 1193–1197, 2014.

DINÇ, S.; DONMEZ, O. A.; ASÇI, B.; BOZDOGAN, A. E. Spectrophotometric multicomponent resolution of a tablet formulation containing lisinopril and hydrochlorothiazide by multivariate calibration methods. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 999–1002, 2013.

DOGAN-TOPAL, B.; BOZAL, B.; DEMIRCIGIL, B. T.; 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, n. 22, p. 2427–2439, 2009.

EISELE, A. P. P.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Simultaneous square-wave voltammetric determination of paracetamol, caffeine and orphenadrine in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1734–1741, 2013.

EISELE, A. P. P.; MANSANO, G. R.; DE 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, p. 46–52, 2014.

EL-ENANY, N.; BELAL, F.; AL-GHANNAM, S. Polarographic determination of lisinopril in pharmaceuticals and biological fluids through treatment with nitrous acid. **Microchimica Acta**, v. 141, n. 1–2, p. 55–61, 2003.

EL-GINDY, A.; ASHOUR, A.; ABDEL-FATTAH, L.; SHABANA, M. M. Spectrophotometric and HPTLC-densitometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in binary mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 5, p. 923–931, 2001.

ERK, N. Comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, derivative spectrophotometry and Vierordt's method applied to the analysis of lisinopril and hydrochlorothiazide in tablets. **Spectroscopy Letters**, v. 31, n. 3, p. 633–645, 1998.

ERK, N.; KARTAL, M. Comparison of high - performance liquid chromatography and absorbance ratio methods for the determination of hydrochlorothiazide and lisinopril in pharmaceutical formulations. **Analytical Letters**, v. 32, n. 6, p. 1131–1141, 1999.

FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; SILVA, T. A.; VICENTINI, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and epinephrine in human body fluid samples using a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles and carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **The**

Analyst, v. 139, n. 11, p. 2842, 2014.

FIORUCCI, A. R.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of carbon paste electrode in the direct voltammetric determination of tryptophan in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 909–915, 2002.

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

GHOLIVAND, M. B.; KHODADADIAN, M. Simultaneous voltammetric determination of captopril and hydrochlorothiazide on a graphene/ferrocene composite carbon paste electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 5, p. 1263–1270, 2013.

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

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

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; OYAMA, M.; BACHHETI, N. Gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode for the simultaneous determination of dopamine and serotonin: Application in pharmaceutical formulations and biological fluids. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 976–983, 2007.

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

HASANZADEH, M.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; SHADJOU, N.; JOUYBAN, A. Determination of lisinopril using β -cyclodextrin/graphene oxide-SO₃H modified glassy carbon electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, n. 7, p. 821–830, 2014.

IDRIS, A. M.; NAHEID, S. A.; ELGORASHE, R. E. E.; ELTAYEB, M. A. H.; ALNAJJAR, A. O. Multi-response optimization of sequential injection chromatographic method for determination of lisinopril and hydrochlorothiazide. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 2081, 2012.

IVANOVIĆ, D.; MEDENICA, M.; JANČIĆ, B.; KNEŽEVIĆ, N.; MALENOVIĆ, A.; MILIĆ, J. Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril, and their impurities. **Acta Chromatographica**, n. 18, p. 143–156, 2007.

JADON, N.; JAIN, R.; PANDEY, A. Electrochemical analysis of amlodipine in some pharmaceutical formulations and biological fluid using disposable pencil graphite electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 788, p. 7–13, 1 mar. 2017.

JAIN, R.; GUPTA, V. K.; JADON, N.; RADHAPYARI, K. Voltammetric determination of cefixime in pharmaceuticals and biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 1, p. 79–88, 2010.

KALAMBATE, P. K.; SRIVASTAVA, A. K. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol, cetirizine and phenylephrine using a multiwalled carbon nanotube-platinum nanoparticles nanocomposite modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 237–248, 2016.

KALCHER, K.; KAUFFMANN, J.-M.; WANG, J.; ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v. 7, n. 1, p. 5–22, 1995.

KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ENSAFI, H. R. Ferrocenedicarboxylic acid modified carbon paste electrode: a sensor for electrocatalytic determination of hydrochlorothiazide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 880–887, 2009.

KAZEMIPOUR, M.; ANSARI, M.; MOHAMMADI, A.; BEITOLLAHI, H.; AHMADI, R. Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in pharmaceutical preparations. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 65–70, 2009.

KHAIRY, M.; KHORSHED, ahmed A.; RASHWAN, F. A.; SALAH, G. A.; ABDEL-WADOOD, H. M.; BANKS, C. E. Simultaneous voltammetric determination of antihypertensive drugs nifedipine and atenolol utilizing MgO nanoplatelet modified screen-printed electrodes in pharmaceuticals and human fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 1045–1054, 2017.

KUMAR, P.; SAINI, B.; DAHIYA, R.; AKHTAR, J.; SHRIVASTAV, B. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of hydrochlorothiazide and lisinopril in bulk and its formulations. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 2, p. 212–215, 2013.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5 ed ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2000.

LI, C. Electrochemical determination of dipyrindamole at a carbon paste electrode using cetyltrimethyl ammonium bromide as enhancing element. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 1, p. 77–83, 2007.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.

MANSANO, G. R.; EISELE, A. P. P.; DALL'ANTONIA, L. H.; AFONSO, S.; SARTORI, E. R. Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode: Improving the simultaneous voltammetric determination of amlodipine and valsartan in urine and combined dosage forms. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 188–194, 2015a.

MANSANO, G. R.; EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R.; PIRES EISELE, A. P.; SARTORI, E. R.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Electrochemical evaluation of a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of an antihypertensive ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan in pharmaceuticals. v. 7, n. 3, p. 1053–1060,

2015b.

MATTOS, G. J.; SCREMIN, J.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; SARTORI, E. R. The performance of boron-doped diamond electrode for the determination of ramipril and its association with hydrochlorothiazide. **Electroanalysis**, v. 29, n. 4, p. 1180–1187, 2017.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; BEIOTOLLAHI, H.; AMINI, M. K.; MIRKHALAF, F.; ABDOLLAHI-ALIBEIK, M. New strategy for simultaneous and selective voltammetric determination of norepinephrine, acetaminophen and folic acid using ZrO₂ nanoparticles-modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 151, n. 1, p. 243–249, 2010.

MOHAMMADIZADEH, N.; ZIA MOHAMMADI, S.; KAYKHAI, M. Novel electrochemical sensor based on ZrO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode for low-trace level determination of amlodipine by differential pulse voltammetry. **Analytical Bioanalytical Electrochemistry**, v. 9, n. 4, p. 390–399, 2017.

MOKHTARI, A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; BEITOLLAHI, H. Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 169, p. 96–105, 2012.

MORAES, J. T.; EISELE, A. P. P.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; SCREMIN, J.; SARTORI, E. R. Simultaneous voltammetric determination of antihypertensive drugs amlodipine and atenolol in pharmaceuticals using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1264–1272, 2016.

MORAES, J. T.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; ŠVORC, L.; SARTORI, E. R. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 173–180, 2017.

NADIFIYINE, S.; HADDAM, M.; MANDLI, J.; CHADEL, S.; BLANCHARD, C. C.; MARTY, J. L.; AMINE, A. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on to a carbon black paste electrode for phenol determination in olive oil. **Analytical Letters**, v. 46, n. 17, p. 2705–2726, 2013.

PAPP, Z.; ŠVANCARA, I.; GUZSVÁNY, V.; VYTRÁS, K.; GAÁL, F. Voltammetric determination of imidacloprid insecticide in selected samples using a carbon paste electrode. **Microchimica Acta**, v. 166, n. 1–2, p. 169–175, 2009.

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

POONAM, B.; PARIMAL, K.; MEHERE, A. P.; NIMBEKAR, T. P.; WANJARI, B. E. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of lisinopril and amlodipine besilate in tablet dosage form. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 5, n. 2, p. 210–213, 2012.

PRASAD, C. V. N.; SAHA, R. N.; PARIMOO, P. Simultaneous determination of amlodipine–enalapril maleate and amlodipine–lisinopril in combined tablet preparations by derivative spectrophotometry. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n. 6, p. 383–388, 1999.

RADI, A. Determination of pantoprazole by adsorptive stripping voltammetry at carbon paste electrode. **Il Farmaco**, v. 58, n. 7, p. 535–539, 2003.

RAJU, V. B.; RAO, A. L. Novel validated RP-HPLC method for the simultaneous estimation of lisinopril and amlodipine in bulk and tablet dosage. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v. 1, n. 1, p. 32–37, 2011.

RATHEE, P.; RATHEE, S.; THAKUR, S.; KUMAR, V. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and lisinopril dihydrate as A.P.I. and in tablet dosage forms by modified form of simultaneous equation method using derivative UV-spectrophotometry. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 556–562, 2010.

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

REZAEI, B.; DAMIRI, S. Multiwalled carbon nanotubes modified electrode as a sensor for adsorptive stripping voltammetric determination of hydrochlorothiazide. **IEEE Sensors Journal**, v. 8, n. 9, p. 1523–1529, 2008.

SALAMANCA-NETO, C. A. R.; EISELE, A. P. P.; RESTA, V. G.; SCREMIN, J.; SARTORI, E. R. Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 230, p. 630–638, 2016.

SALAMANCA-NETO, C. A. R.; HATUMURA, P. H.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**, v. 21, n. 6, p. 1615–1622, 2015.

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

SHAH, J. V.; SHAH, P. A.; SHAH, P. V.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. Fast and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 163–169, 2016.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4 ed ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SKOOG, D. .; HOLLER, F. .; NIEMAN, T. . **Princípios de Análise Instrumental**.

5ed. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SVORC, L.; BOROVSÁ, K.; CINKOVÁ, K.; STANKOVIC, D. M.; PLANKOVÁ, A. Advanced electrochemical platform for determination of cytostatic drug flutamide in various matrices using a boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 621–630, 2017.

ŠVORC, L.; CINKOVÁ, K.; SOCHR, 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, p. 86–93, 2014.

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

VALEZI, C. F.; DUARTE, E. H.; MANSANO, G. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R. An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 234–243, 2014.

WAGH, D. D.; DHORE, P.; JAIN, D. S.; MUNDHADA, D. R. Method development and validation of lisinopril and hydrochlorothiazide in combined dosage form by RP-HPLC. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1570–1574, 2012.

XU, L.; GUO, F.; YOU, Y.; HU, J.; MIAO, Y.; WU, Z.; WANG, L. Simple electrochemical sensor based on carbon-black paste electrode coupled with derivative square wave voltammetry for the determination of sulfites in rice wine. **International Journal Electrochemical Science**, v. 1106, n. 10, p. 4586–459743, 2016.

YOU, W.; ZHENG, Z.-X.; GAO, Z.-N. Electrochemical behavior of lisinopril at carbon paste electrode and its electroanalytical application. **Chinese Journal of Applied Chemistry**, v. 25, p. 578, 2008.

ZHAN, X.; YOU, W.; GAO, Z.; REN, C. Electrocatalytic oxidation of lisinopril at multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode and its electrochemical determination. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, p. 47–54, 2009.