

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para detecção de bumetanida e hidroclorotiazida em amostras de interesse farmacêutico e biológico.

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

Tese de Doutorado
2015

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para detecção de bumetanida e hidroclorotiazida em amostras de interesse farmacêutico e biológico.

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

R985d Ruy, Mayara Regina dos Santos
Desenvolvimento de sistemas biomiméticos para
detecção de bumetanida e hidroclorotiazida em amostras de
interesse farmacêutico e biológico / Mayara Regina dos
Santos Ruy – Araraquara : [s.n], 2015
150 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

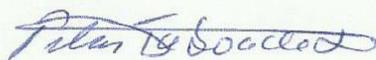
1. Diuréticos. 2. Biomimetismo. 3. Análise eletroquímica.
4. Dopagem em esportes. 5. Polímeros. I. Título.

MAYARA REGINA DOS SANTOS RUY

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 10 de setembro de 2015.

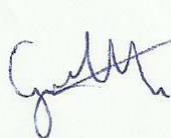
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP.



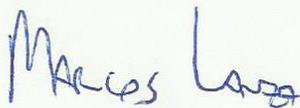
Prof^a. Dr^a. FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP.



Prof. Dr. GUSTAVO TROIANO FELICIANO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP.



Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE MAZO
Instituto de Química / USP / São Carlos – SP.



Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE VASCONCELOS LANZA
Instituto de Química / USP / São Carlos – SP.

DADOS CURRICULARES

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1.1 Graduação:

Licenciatura em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período:
03/2004 a 12/2008

1.2 Pós-graduação:

Doutorado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período:
08/2011 a 09/2015

Mestrado em Química - Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Período:
08/2009 a 07/2011

2. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

-RUY, M. R S; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T., Determinación amperométrica de hidroclototiazida en formulaciones farmacéuticas utilizando un electrodo de pasta de carbono modificado con hemina. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ-2014, 2014.

-RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T., Determinación electroanalítica de bumetanida empleando un sensor biomimético para la detección del dopaje en el deporte. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ-2014, 2014

- FIGUEIRA, E. C.; RUY, M. R. S.; SOTOMAYOR, M. P. T., Estudio y aplicación de sensor biomimético en la reducción electrocatalítica de metribuzin. In: 31 Congreso Latino Americano de Química, 2014, Lima. 31st Latin American Chemistry Congress CLAQ-2014, 2014.

- RUY, M. R. S.; SOTOMAYOR, M. P. T, “Desenvolvimento de sensor voltamétrico à base de CuPc para detecção de um diurético para monitoramento de *doping*.”, 17^o Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte/MG, outubro de 2013.

3. ARTIGOS PUBLICADOS

RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T.; Biomimetic sensor for detection of hydrochlorothiazide employing amperometric detection and chemometry for application in doping in the sport. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2015. (<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150187>)

RUY, M. R. S.; FIGUEIRA, E. C.; SOTOMAYOR, M. P. T.; Electroanalytical determination of bumetanide employing a biomimetic sensor for detection of doping in sports. Analytical Methods, v. 6, p. 5792-5798, 2014.

Eu Dedico este trabalho...

Primeiramente a Deus por me amar incondicionalmente.

*A minha mãe, que sempre me incentiva, apoia, acredita e encoraja a
seguir em frente.*

*Ao amor da vida, que me inspira e me faz querer ser cada dia
melhor.*

A minha princesa e já muito amada Isabela.

*A minha querida irmã Roberta, cunhado Israel e as sobrinhas mais
lindas Gabriela e Manuela, pelo amor e apoio sempre.*

*Aos demais da minha família e amigos que torceram pelo meu
doutorado.*

A minha querida família Figueira, por todo carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua fidelidade e infinita misericórdia.

A minha família, que sempre me incentivou, apoiou e acreditou em mim. Amo vocês!

Ao meu marido, pela dedicação, paciência, assessoria, apoio e principalmente pelo amor por mim. Amo você imensamente!

À professora Maria Del Pilar, pela orientação, ensinamentos e ajuda neste trabalho, mas também, principalmente, por ser essa professora amiga e compreensiva.

Às professoras, Fabíola Manhas Verbi Pereira e Elisete Aparecida Batista que participaram do meu exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Aos amigos, Marcos (Harry), Lucas, Tati e Rafa por toda ajuda durante este trabalho e principalmente pela amizade construída.

Aos amigos do laboratório GEAR, por toda troca de conhecimento e pela amizade.

A todos os funcionários do IQ.

A Capes, pela bolsa concedida.

A todos, muito obrigada.

...Até aqui nos ajudou o Senhor. (I Samuel 7:12)

*Eu poderia falar todas as línguas que são faladas na terra e até no céu,
mas se não tivesse amor, as minhas palavras seriam como o som de um
gongo ou como o barulho de um sino.*

*Poderia ter o dom de anunciar mensagens de Deus, ter todo o
conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que eu poderia
tirar as montanhas do seu lugar, mas, se não tivesse amor, eu nada
seria.*

*Poderia dar tudo que tenho e até mesmo entregar meu corpo para ser
queimado, mas se eu não tivesse amor, isso não me adiantaria nada.*

1 Coríntios 13,1-3

RESUMO

O presente trabalho está baseado na construção de sensores biomiméticos para determinação sensível e seletiva dos diuréticos: bumetanida (BMT) e hidroclorotiazida (HCTZ). Para isto, eletrodos à base de pasta de carbono foram modificados com complexos, os quais são potenciais catalisadores biomiméticos das enzimas P450, que catalisam um grande número de reações incluindo os fármacos. Os complexos que apresentaram perfil biomimético e melhores resultados na determinação voltamétrica e amperométrica da bumetanida e hidroclorotiazida, respectivamente foram 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro 29-H, 31-H-ftalocianinacobre (II) [CuPc] e hemina. As condições experimentais para o desenvolvimento das metodologias propostas foram otimizadas com auxílio de planejamento de experimentos multivariados. O sensor construído para determinação do diurético bumetanida apresentou as melhores respostas em solução tampão Britton-Robinson 0,15 mol L⁻¹ pH 7,0 e 15% m/m do complexo [CuPc], usando a voltametria de onda quadrada a 60 Hz, 100 mV de amplitude e 6 mV de incremento de potencial (Δp_s). Com os parâmetros otimizados, o sensor apresentou limites de detecção e de quantificação de 0,27 e 0,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os melhores resultados obtidos para o sensor desenvolvido para a hidroclorotiazida foram em solução fosfato 0,10 mol L⁻¹ pH 8,5 e 14% m/m de hemina usando a amperometria em 800 mV, e os limites de detecção e de quantificação de 8,2 e 27 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Avaliou-se também a biomimeticidade do sensor, explorando o perfil hiperbólico da resposta nos sensores, velocidade de varredura e estudo de interferentes. Os sensores foram satisfatoriamente usados nas análises em amostras de interesse farmacêutico e biológico, assim se apresentam com alternativas vantajosas em relação a outros métodos disponíveis, pois apresentam baixo custo relativo, além de serem simples, rápidos, ambientalmente mais amigáveis (envolve o baixo consumo de reagentes e amostras) e não requerer procedimentos específicos ou complicados para o preparo das amostras. Em outra linha de trabalho, porém complementar, foi desenvolvido um polímero de impressão molecular, conhecido como MIP, para a bumetanida. Os MIPs foram sintetizados via polimerização em *bulk*. Os estudos foram baseados nos resultados obtidos na simulação computacional, na qual foi escolhida a acrilonitrila como monômero funcional de alta afinidade estrutural, para síntese do MIP. A proposta de sintetizar o MIP é para usá-lo

como material adsorvente em extração em fase sólida para melhorar a seletividade e a interferência de ambos os diuréticos.

Palavras-chave: diuréticos, sensores biomiméticos, técnicas eletroquímicas, MIP, *doping*.

ABSTRACT

This work is based on the construction of biomimetic sensors for sensitive and selective determination of diuretics for bumetanide (BMT) and hydrochlorothiazide (HCTZ). Carbon paste-based electrodes were modified with complexes, which are potential biomimetic catalysts of P450 enzymes, that catalyze a number of reactions including pharmaceuticals. The complexes Copper (II) 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29-H,31-H-phthalocyanine [CuPc] and Hemin showed biomimetic profile and better results for amperometric and voltammetric determination of bumetanide and hydrochlorotiziada, respectively. The experimental conditions for the proposed methodologies development have been optimized with the help of design of multivariate experiments. The sensor built to determine the diuretic bumetanide presented the best responses in Britton-Robinson buffer 0.15 mol L⁻¹ pH 7.0 and 15 % (m/m) of the complex [CuPc] , using the square wave voltammetry with 60 Hz, amplitude of potential of 100 mV and step potencial of 6 mV. With the optimized parameters the sensor showed limits of detection and quantification of 0.27 and 0.9 μmol L⁻¹, respectively. The best results for the sensor have been developed for hydrochlorothiazide phosphate solution 0.10 mol L⁻¹ pH 8.5 and 14 % (m/m) of the hemin, using the amperometry at 800 mV, limits of detection and quantification of 8.2 and 27 μmol L⁻¹, respectively. Studies conducted for elucidation of sensor biomimetic behavior, such as evaluation of scan rate influence using cyclic voltammetry, exploration of hyperbolic profile of the sensor response, interference and selectivity studies. In a complementary, a molecular imprinting polymer, known as MIP, was developed for bumetanide. The MIPs were synthesized by bulk polymerization. Studies were based on the results obtained from the computer simulation where monomer of high structural affinity, acrylonitrile, was chosen for synthesis of MIP, having one high and one low structural affinity. The proposal to synthesize the MIP is to use it as adsorbent material in solid phase extraction to improve the selectivity and interference for both diuretics. The developed electrochemical methods represent advantageous alternatives compared to other available methods, such as relatively low cost, simplicity, fast, environmentally friendly (due to low consumption of reagents and samples) and also does not require specific or complicated procedures to prepare samples.

Keywords: diuretics, biomimetic sensors, electrochemical techniques, MIP, doping

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema Ilustrativo das diferentes classes farmacológicas das substâncias proibidas no doping e os métodos de doping.	28
Figura 2. Estrutura química da bumetanida.	33
Figura 3. Estrutura química da hidroclorotiazida.	34
Figura 4. Esquema ilustrativo de um sensor químico.	47
Figura 5. Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.	52
Figura 6. Esquema representativo do processo de síntese de MIP.	55
Figura 7. Esquema representativo da célula eletroquímica convencional (a) e a foto real (b). Sendo A: eletrodo auxiliar, T: Eletrodo de trabalho e R: Eletrodo de referência. ...	61
Figura 8. Fluxograma Ilustrativo das etapas da preparação da pasta modificada.	65
Figura 9. Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo de trabalho adequado para montagem do sensor.	66
Figura 10. Voltamogramas cíclicos para (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) [CuPc] com (----) $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bumetanida. Medidas realizadas usando com o eletrólito suporte (—).	68
Figura 11. Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [CuPc] em diferentes concentrações de bumetanida. Branco: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	69
Figura 12. (a) Variação da corrente de pico catódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de cobre e na presença de bumetanida. (b) Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . . Medidas realizadas em solução tampão B. R. $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) concentração de bumetanida de $4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	70
Figura 13. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.	71
Figura 14. Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de corrente obtido.	74
Figura 15. Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.	75
Figura 16. Efeitos principais das variáveis estudadas no valor da sensibilidade do sensor.	76

Figura 17. Gráfico de superfície de resposta obtida a partir dos experimentos mostrados na Tabela 5.	78
Figura 18. (a) Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Voltamograma de onda quadrada típico obtido para adições sucessivas de bumetanida. (b) Curva analítica construída com os resultados obtidos na voltametria de onda quadrada.	80
Figura 19. Voltamograma de onda quadrada obtido (—) com adição de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de hidroclorotiazida (HCTZ) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de bumetanida (BMT) nas condições otimizadas. Medidas realizadas usando o eletrólito suporte (-----).	83
Figura 20. Voltamograma de onda quadrada obtido (—) com adição de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de hidroclorotiazida (HCTZ) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de bumetanida nas condições otimizadas. Medidas realizadas usando o eletrólito suporte (-----).	84
Figura 21. Perfil hiperbólico do sensor à base de ftalocianinacobre (II).	85
Figura 22. Gráfico do duplo recíproco.	86
Figura 23. Voltamogramas cíclicos para (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 14 % (m/m) [hemina] com (----) $1,96 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de hidroclorotiazida. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte (—) uma solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	94
Figura 24. Variação da corrente de pico catódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de cobre e na presença de hidroclorotiazida. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,5) concentração de hidroclorotiazida de $1,96 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	95
Figura 25. Variação da corrente de pico catódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão B. R. 0,15 mol L ⁻¹ (pH 7,0) concentração de hidroclorotiazida de $4,76 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	96
Figura 26. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.	97
Figura 27. Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de sensibilidade obtido.	100
Figura 28. Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.	100
Figura 29. Gráfico da superfície de resposta para o sensor proposta para determinação de hidroclorotiazida.	102

Figura 30. (a) Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Amperograma típico obtido para adições sucessivas de hidroclorotiazida. (b) Curva analítica construída com os resultados obtidos na amperometria da Figura 30(a).	104
Figura 31. (a) Perfil de resposta do sensor para hidroclorotiazida em voltametria de onda quadrada (VOQ), nas condições de análise previamente otimizadas para bumetanida, visando análise simultânea. (b) Curva analítica construída com os resultados obtidos na VOQ.	106
Figura 32. Perfil hiperbólico do sensor à base de hemina.	107
Figura 33. Gráfico do duplo recíproco.	108
Figura 34. Simulação computacional semi-empírica da energia de ligação (KJ mol^{-1}) da bumetanida com 20 diferentes monômeros.	118
Figura 35. Gráfico referente à formação de cavidades livres após sucessivas extrações via Soxhlet com MeOH:ácido acético (9:1, v/v).	120
Figura 36. Imagens de AFM referente ao MIP (A e C) e NIP (B e D) nas escalas de 10,000 e 50,000X.	121
Figura 37. Espectro de Infravermelho comparativo para a Bumetanida e o MIP sintetizado.	123
Figura 38. Espectro de Infravermelho comparativo para o Acrilonitrila e o MIP sintetizado.	124
Figura 39. Espectro de Infravermelho comparativo para o etilenoglicoldimetacrilato e o MIP sintetizado.	125
Figura 40. Espectro de Infravermelho comparativo para o AIBN e o MIP sintetizado.	126
Figura 41. Espectroscopia vibracional na região do IV para os polímeros.	127
Figura 42. Termogravimetria e análise térmica diferencial para o MIP sintetizado para a bumetanida.	128
Figura 43. Termogravimetria e análise térmica diferencial para o polímero de controle (NIP).	128
Figura 44. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L^{-1} e diferentes massas de MIP (2; 5, 10, 5, 20 mg) por 4 horas de agitação à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.	130
Figura 45. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L^{-1} e diferentes proporções da mistura de solvente por 4 horas de agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.	131

Figura 46. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L ⁻¹ e diferentes tempos de interação à 25 °C.	132
Figura 47. Cromatogramas de soluções padrões de Furosemida e Bumetanida com fase móvel de ACN/solução tampão fosfato (25 mM) a pH 2,5 (80:20).	133
Figura 48. Cromatogramas de soluções padrões de Hidroclorotiazida e Bumetanida com fase móvel de ACN/solução tampão fosfato (25 mM) a pH 2,5 (80:20).	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Complexos analisados em estudos preliminares	67
Tabela 2. Variáveis usadas no planejamento fatorial fracionário e os respectivos níveis estudados.....	72
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial completo $2^{(7-3)}$ com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva. Número de replicatas = 3.	73
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial completa 2^3 com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.	76
Tabela 5. Matriz de ensaios utilizados no planejamento composto central com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.....	77
Tabela 6. Condições otimizadas do método para determinação de Bumetanida.....	79
Tabela 7. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de bumetanida.	81
Tabela 8. Fármacos analisados no estudo da seletividade com o sensor proposto.....	82
Tabela 9. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas.	87
Tabela 10. Recuperação de bumetanida adicionada em amostras de urina.....	87
Tabela 11. Variáveis usadas no planejamento fatorial completo e os respectivos níveis estudados.....	98
Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial completa 2^4 com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva. Número de replicatas = 3.	99
Tabela 13. Matriz de ensaios utilizados no planejamento composto central com os respectivos valores de sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.....	101
Tabela 14. Condições otimizadas do método para determinação de hidroclorotiazida.	103
Tabela 15. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de hidroclorotiazida.	105
Tabela 16. Determinação de hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas.	109
Tabela 17. Recuperação de hidroclorotiazida adicionada em amostras de urina.	110
Tabela 18. Lista dos 20 monômeros funcionais utilizados na simulação computacional referente à interação com a tetraciclina.....	116

Tabela 19. Parâmetros obtidos pelo método BET para os MIP/NIP sintetizados bumetanida.	122
Tabela 20. Bandas do espectro de IV da Figura 37 com as respectivas atribuições.	124
Tabela 21. Bandas do espectro de IV da Figura 38 com as respectivas atribuições.	125
Tabela 22. Bandas do espectro de IV da Figura 39 com as respectivas atribuições.	125
Tabela 23. Bandas do espectro de IV da Figura 45 com as respectivas atribuições.	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN - 2,2'-azo-bis-isobutironitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMT - Bumetanida
B.R. - Britton-Robinson
CE - *Chemical/Electrochemical*
COB - Comitê Olímpico Brasileiro
CG - Cromatografia gasosa
CL- Cromatografia líquida
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CuPc - Ftalocianinacobre(II)
C18 - Grupo octadecilsilano ligado à sílica
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EC - Eletroforese capilar
EDGMA - Etilenoglicoldimetacrilato
EM - Espectroscopia de massas
E_{Pc} -Potencial de pico catódico
E_{Pa} - Potencial de pico anódico
EPC - Eletrodo de pasta de carbono
FIA - Análise por injeção em fluxo
FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HCTZ - Hidroclorotiazida
I_{Pc} - Corrente de pico catódica
I_{Pa} - Corrente de pico anódica
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
MIP - *Molecularly Imprinted Polymers* (polímero molecularmente impresso)
NIP - Polímero não impresso
p-DAC - *p*-dimetilaminocinamaldeído
ppb - Partes por bilhão
ppm - Partes por milhão
RNA - Ácido ribonucleico

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

VC - Voltametria Cíclica

VOQ - Voltametria de onda quadrada

WADA – *World Anti-doping Agency*

LISTA DE SÍMBOLOS

A - ampères

°C - graus Celsius

Δi - variação de corrente elétrica

ΔE_p - amplitude do pulso

ΔE_s - incremento de potencial

δ - movimento vibracional de dobramento

i - corrente elétrica

nm - nanômetros

V - volts

v - velocidade de varredura

v - movimento vibracional de estiramento

λ - comprimento de onda

μ - micro

t - tempo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	25
I. 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	26
I.1.1 <i>Doping</i>	26
I.1.2. Métodos de <i>Doping</i>	28
I.1.2.1. Aumento da transferência de oxigênio	28
I.1.2.2. Manipulação química e física.....	29
I.1.2.3. <i>Doping</i> genético	29
I.1.3. O exame antidoping	30
I.2 DIURÉTICOS.....	31
I.2.1 Diuréticos de alça	32
I.2.1.1 Bumetanida	32
I.2.2 Diuréticos Tiazídicos.....	33
I.2.2.1 Hidroclorotiazida.....	34
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO.....	36
II. 1. BUMETANIDA.....	37
II.1.1. Métodos Espectrofotométricos/Reflectométricos.....	37
II.1.2. Métodos cromatográficos	37
II.1.3. Eletroforese Capilar e outros métodos	39
II.1.4. Métodos Eletroquímicos	40
II.2. HIDROCLOROTIAZIDA	40
II.2.1. Métodos Espectrofotométricos/Reflectométricos.....	41
II.2.2. Métodos cromatográficos	42
II.2.3. Eletroforese Capilar e outros métodos	44
II.2.4. Métodos Eletroquímicos	44
CAPÍTULO III. SENSORES QUÍMICOS	46
III.1. SENSORES QUÍMICOS	47
III.1.1. Sensores eletroquímicos.....	48
III.1.1.1. Sensores biomiméticos.....	51
III.1.1.1.1 Polímeros de impressão molecular – MIP.....	54
CAPÍTULO IV. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	57
CAPÍTULO V. SENSOR ELETROQUÍMICO BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DE BUMETANIDA EM URINA E EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.....	60
V. 1. PARTE EXPERIMENTAL.....	61
V. 1.1. Equipamentos	61
V. 1.2. Reagentes e solventes	62
V. 1.3. Preparo das soluções	62
V. 1.4. Preparo das Amostras	63
V. 1.5. Construção do sensor biomimético de pasta de carbono modificada	64
V. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
V. 2.1. Caracterização eletroquímica do sensor.....	66
V. 2.2. Estudo e otimização das condições experimentais	71

V. 2.2.1. Planejamento Fatorial de Experimentos	72
V. 2.2.2. Planejamento Composto Central	77
V. 2.3. Características analíticas do sensor	79
V. 2.4. Estudo de seletividade/interferência	81
V. 2.5. Verificação do caráter biomimético do sensor	84
V. 2.6. Aplicação do sensor biomimético em amostras reais	86
V.2.7. Conclusões	88
CAPÍTULO VI. SENSOR ELETROQUÍMICO BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA EM URINA E EM.....	89
VI.1. PARTE EXPERIMENTAL	90
VI.1.1. Equipamentos.....	90
VI.1.2. Reagentes e solventes	90
VI.1.3. Preparo das soluções.....	91
VI. 1.4. Preparo das Amostras	91
VI. 1.5. Construção do sensor biomimético de pasta de carbono modificada.....	92
VI. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
VI. 2.1. Caracterização eletroquímica do sensor	93
VI. 2.2. Estudo e otimização das condições experimentais.....	97
VI. 2.2.1. Planejamento Fatorial de Experimentos	97
VI. 2.2.2. Planejamento Composto Central	101
VI. 2.3. Características analíticas do sensor	103
VI. 2.4. Estudo de seletividade/interferência	106
V. 2.5. Verificação do caráter biomimético do sensor	107
VI. 2.6. Aplicação do sensor biomimético em amostras reais.....	108
VI. 2.7. Conclusões	110
CAPÍTULO VII. DESENVOLVIMENTO DE POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO (MIP) PARA BUMETANIDA	112
VII. 1. PARTE EXPERIMENTAL	113
VII. 1.1. Equipamentos.....	113
VII. 1.2. Reagentes e solventes.....	114
VII. 1.3. Simulação computacional.....	114
VI. 1.4. Síntese do MIP/NIP	116
VII. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
VII. 2.1. Simulação Computacional	117
VII. 2.2. Remoção do analito	119
VII. 2.3. Caracterização física	120
VII. 2.3.1. Microscopia de Varredura Eletrônica.....	121
VII. 2.3.2. Análise da porosidade pelo método de BET	122
VII. 2.3.3. Análises dos polímeros sintetizados por FTIR	123
VII. 2.3.4. Análises Térmicas dos polímeros sintetizados.....	128
VII. 2.4. Otimização e avaliação dos estudos de religação	129
VII. 2.4.1 Estudo da massa de religação.....	129
VII. 2.4.2 Estudo do solvente de religação	130
VII. 2.4.3 Estudo do tempo de religação	131
VII. 2.5. Estudos Preliminares da seletividade	132
VII. 2.6. Conclusões parciais	135
CAPÍTULO VIII. CONCLUSÕES GERAIS.....	136
CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS	138

CAPÍTULO IX. REFERÊNCIAS	140
---------------------------------------	------------

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

I. 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

I.1.1 *Doping*

Em busca de desempenhos e resultados melhores, o uso excessivo de fármacos no meio esportivo tem sido crescente no âmbito nacional e internacional. Entretanto, essa prática configura uma atitude contrária aos ideais preconizados no esporte (gerar saúde e qualidade de vida) e de potencial risco à integridade física do atleta.

O uso de métodos e substâncias exógenas ao organismo com o intuito de aumentarem o desempenho e o sucesso esportivo ou atenuarem os mecanismos geradores de fadiga no indivíduo é tão antigo quanto o surgimento da humanidade. A não aceitação de suas limitações físicas e mentais leva o homem a buscar alternativas no anseio de incrementar de todas as formas possíveis suas potencialidades naturais^{1,2}.

Para controlar esse crescimento desses fármacos, houve uma unificação das políticas internacionais, durante a Conferência Mundial de Doping no Esporte em Copenhague no ano de 2003, aprovando de um Código Mundial Antidoping, que posteriormente foi corroborado pela Convenção Antidoping da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO)^{3,4}. No Brasil, a Convenção Internacional Contra o Doping nos Esportes transformou-se em lei em 18/11/2008 pelo Decreto da Presidência da República número 6.653⁵.

O Código determina, basicamente, que qualquer substância, meio ou método utilizado por atletas que aumente o desempenho, submeta a risco a sua saúde, ou seja, antagônico aos princípios do jogo limpo, será considerado *doping*. Tais recursos, diferenciados por categorias farmacológicas e por momento de uso são publicados anualmente em listagem suplementar ao Código pela Agência Mundial Antidoping (WADA - *World Anti-Doping Agency*). Dentre as categorias descritas na lista, encontram-se as substâncias de uso permanentemente proibido, as de uso restrito para algumas modalidades e ainda fármacos de livre utilização⁵.

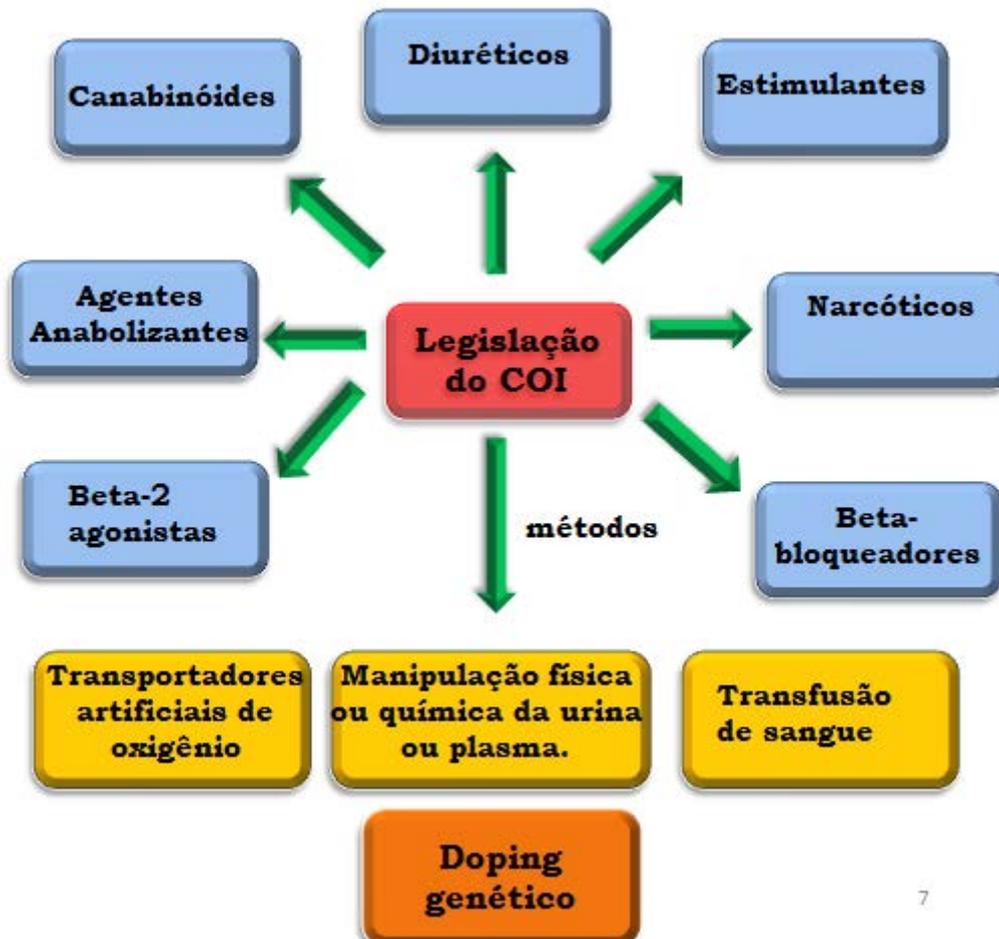
Em linhas gerais, as substâncias proibidas dividem-se em sete classes farmacológicas:

- **Classe A – Estimulantes:** substâncias capazes de acelerar o funcionamento do cérebro, e com esta hiperexcitabilidade aumenta o estado de alerta, diminui o sono e o apetite, e aumenta a capacidade física.

- **Classe B – Narcóticos:** variedades de substâncias que fazem adormecer, reduzir ou eliminar a sensibilidade, são mais utilizados para amenizar dor.
- **Classe C - Agentes anabolizantes:** substâncias sintéticas do hormônio natural masculino com o propósito de aumentar a massa muscular, força e agressividade.
- **Classe D – Diuréticos:** fármacos que aumentam a eliminação de eletrólitos e água.
- **Classe E – Canabinóides:** substâncias derivadas da erva *Canabis sativa* e atuam como depressores do sistema nervoso central. Atletas utilizam canabinóides com o objetivo de reduzir a ansiedade antes e durante a competição.
- **Classe F – Beta-bloqueadores;** são bloqueadores dos receptores β -adrenérgicos, parte do sistema nervoso simpático. Este bloqueio provoca uma diminuição da contractilidade e da velocidade de contração cardíaca, diminuindo a frequência cardíaca, sobretudo no esforço ou ansiedade.
- **Classe G – Beta-2-agonistas:** fármacos que desempenham a função bronco dilatadora, causando a dilatação das vias aéreas.

A Figura 1 apresenta as classes de substâncias e alguns métodos que são classificados como *doping*.

Figura 1. Esquema Ilustrativo das diferentes classes farmacológicas das substâncias proibidas no doping e os métodos de doping.



Fonte: Elaborado pela autora.

I.1.2. Métodos de *Doping*

São considerados métodos de *doping*: o aumento da transferência de oxigênio, a manipulação química e física da urina ou plasma e o *doping* genético:

I.1.2.1. Aumento da transferência de oxigênio

É uma espécie de *doping* sanguíneo ou a utilização de transportadores artificiais de oxigênio. Neste tipo de *doping*, há o aumento artificial da captação, transporte ou aporte de oxigênio (incluindo o uso de perfluoroquímicos, efaproxiral e produtos de hemoglobina modificada como substitutos do sangue baseados em hemoglobina),

umentando a distribuição deste aos músculos, principalmente nas condições de exercícios físicos que exigem grande resistência^{6,7}.

O *doping* sanguíneo consiste em injetar em um atleta os glóbulos vermelhos de outra pessoa de modo a remover o seu próprio sangue até três meses antes da competição, guardando-o e, então, voltando a injetá-lo, resultando por fim num aumento do volume sanguíneo. Assim, este tipo de *doping* inclui a utilização de sangue autólogo (do próprio indivíduo), homólogo (de indivíduos diferentes de uma mesma espécie) ou heterólogos (de indivíduos de espécies diferentes)⁷.

I.1.2.2. Manipulação química e física

Inclui a manipulação ou a tentativa de manipulação, visando à alteração da integridade e validade das amostras coletadas no controle de dopagem, como cateterismo e substituição e/ou alteração da urina original pela de outra pessoa. Inclui também infusões intravenosas, exceto as administradas por ocasiões hospitalares ou investigações clínicas⁶.

A manipulação química e física é a última na frequência de classe de utilização de *doping*, sendo a manipulação física preferida ao invés da manipulação química. Dentre as substâncias utilizadas, existe o *Probenecid*, que bloqueia a secreção de testosterona além de ser utilizado para o bloqueio de substâncias dopantes e para o atraso da eliminação de drogas anabólicas, agindo como um agente de camuflagem. Outros agentes de camuflagens utilizados são a *finasterida* e a *epitestosterona*⁷.

I.1.2.3. *Doping* genético

O *doping* genético consiste na transferência de células ou elementos genéticos como o DNA e o RNA e o uso de agentes biológicos ou farmacológicos que modifiquem a expressão gênica⁶ ou, mais especificamente, de acordo com a WADA⁸: “o uso não terapêutico de células, genes, elementos genéticos ou da modulação da expressão de genes, com a capacidade de melhorar o desempenho atlético”. A terapia genética em si é utilizada para reparar um gene com defeito, porém, também é possível,

aumentar, por exemplo, as proteínas musculares, o que dentro do esporte é considerado um abuso⁷.

No *doping* genético, genes modificados são implantados em vetores (vírus inofensivos, alterados para não transmitirem doenças). Então esses vetores são injetados no corpo do atleta, levando gene modificado para o destino desejado nas células que passam a produzir quantidades maiores de substâncias que melhoram o desempenho esportivo⁹.

I.1.3. O exame antidoping

Para identificar se o atleta fez ou está fazendo uso de algumas das substâncias ou métodos proibidos no esporte, a WADA, escolhe aleatoriamente os competidores para fazerem exames antidopings. Os exames são realizados, normalmente, pela análise de sangue e/ou urina, os quais podem ser coletados em todo término de prova ou durante toda e qualquer hora da vida ativa em campeonatos e competições do atleta¹⁰. No Brasil, o Comitê Olímpico Brasileiro (COB) deixa a disposição dos competidores uma cartilha que informa quais são as substâncias e métodos proibidos no esporte¹¹.

As regras atuais que governam o uso de *doping* no esporte consideram que uma violação por *doping* ocorre ao se encontrar nos fluidos do corpo uma substância proibida, um metabólito de uma substância proibida ou um composto quimicamente ou farmacologicamente relacionado a uma substância proibida¹². Na maioria dos casos, a urina é a matriz escolhida para os exames de *doping* devido ao grande volume e por não ser um método invasivo¹³, sendo que o principal método de identificação consiste na cromatografia geralmente acoplada a um espectrômetro de massas.

A maior parte das organizações esportivas adota a mesma lista de substâncias proibidas, porém, alguns esportes podem ter uma ligeira variação, como no automobilismo e no arco e flecha, onde o uso de álcool e de betabloqueadores também é proibido⁶.

Além da urina e do sangue, estudos vêm sendo feitos também para detecção destas mesmas substâncias nos cabelos uma vez que estes compostos possuem um maior tempo de permanência neles que podem ser semanas ou meses, dependendo do comprimento da haste capilar. Porém, nenhuma análise deve ser substituída uma vez que elas se completam. As análises em sangue e urina fornecem informações de curto

prazo do uso de drogas por um indivíduo enquanto o cabelo fornece informação em longo prazo do histórico de uso desta mesma pessoa¹².

I.2 DIURÉTICOS

No esporte é proibido o uso de diuréticos, pois há atletas que fazem uso dessas substâncias para perderem peso antes de competições ou para esconderem que fizeram uso de outras substâncias dopantes, alterando sua concentração na urina. A proibição é devido aos diferentes mecanismos de ação envolvidos: eles aumentam o fluxo e o volume da urina. Como consequência, quando há o uso de outras substâncias suas concentrações podem ser drasticamente reduzidas abaixo do limite de detecção da metodologia usada, levando a um falso negativo da amostra analisada¹⁴. O uso abusivo dos diuréticos pode levar a redução do volume total do sangue tendo o risco de hipotensão ou o aumento da viscosidade do mesmo causando uma eventual trombose¹⁵.

Além disso, os diuréticos são usados no tratamento de problemas como a hipertensão e diversos tipos de edema causados por situações como a insuficiência cardíaca e a cirrose hepática¹⁶. Como anti-hipertensores, os diuréticos são agentes potentes para a redução da pressão arterial, e desta forma, reduzem a morbidade e mortalidade cardiovasculares¹⁷. O grande benefício da redução da pressão arterial está relacionado com a redução do risco de ocorrência de um acidente vascular cerebral e de insuficiência cardíaca¹⁸.

De maneira geral, diuréticos são drogas que aumentam a excreção de sódio e de água do corpo atuando sobre os rins. Seu efeito primário consiste em diminuir a reabsorção de sódio e cloreto do filtrado, sendo o aumento da perda de água secundário à excreção aumentada de sal¹⁹. O NaCl no organismo é o principal determinante do volume de líquido extracelular, e a maioria das aplicações clínicas dos diuréticos visa a redução deste volume ao diminuir o conteúdo corporal total de NaCl²⁰.

Atualmente, esta categoria de fármacos pode ser subdividida, principalmente, em diuréticos de alça, tiazidas e diuréticos poupadores de potássio. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de diuréticos apenas das duas primeiras classes, portanto as considerações gerais serão apenas sobre estas classes e os respectivos diuréticos estudados.

I.2.1 Diuréticos de alça

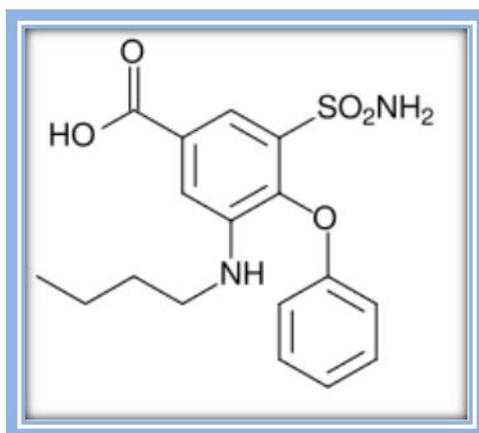
Os diuréticos de alça são os mais poderosos de todos os diuréticos, capazes de provocar a excreção de 15-25% do sódio existente no filtrado. Neste grupo encontram-se a furosemida, bumetanida, piretanida, torasemida e o ácido etacrínico¹⁹. O ácido etacrínico, a furosemida e a bumetanida apresentam em comum um grupo carboxílico e é possível que uma maior potência seja decorrente desta propriedade ácida²¹.

A principal ação dos diuréticos de alça consiste em inibir a reabsorção de eletrólitos no ramo ascendente espesso da alça de Henle, isto ocorre devido à inibição do co-transporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$. A eficácia dessa classe diurética é devido a basicamente dois fatores: 1) 25% da carga filtrada de Na^+ é reabsorvida pelo ramo ascendente espesso e 2) os segmentos do néfron após o ramo ascendente espesso não tem capacidade de reabsorção para recuperar o fluxo de produtos rejeitados que saem do ramo ascendente espesso. Portanto, os inibidores do co-transporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ atuam primariamente no ramo ascendente espesso e aumentam imensamente a excreção urinária de Na^+ e Cl^- ²⁰⁻²⁵.

I.2.1.1 Bumetanida

A bumetanida (ácido 3-aminosulfonil-5-butilamino-4-fenóxi-benzóico) (BMT), com fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ e massa molar de 364,45 g mol⁻¹ é apresentada como um pó branco, sendo pouco solúvel em água, clorofórmio e éter, tendo maior solubilidade em acetona, álcool e soluções alcalinas²⁶. Sua estrutura está representada na Figura 1.

Figura 2. Estrutura química da bumetanida.



Fonte: Elaborada pela autora.

É um medicamento utilizado no tratamento de edema associado a falhas no coração, problemas renais e hepáticos, e também como diurético⁵. Por ser um medicamento mais potente, é necessário em casos de hipertensão grave, quando são então usadas múltiplas drogas com propriedades redutoras de sódio; na insuficiência renal e em casos de cirrose, onde a retenção de sódio é acentuada²⁷.

A bumetanida é cerca de 40 vezes mais potente que a furosemida, tendo um tempo de meia-vida de 0,3 a 1,5 hora, sendo eliminada do organismo 65% por via renal e 35% é metabolizada²⁰. Dessa forma, a bumetanida se apresenta na forma de comprimidos, contendo apenas 1 mg do princípio ativo.

No Brasil este fármaco é comercializado com o nome de Burinax®, sendo também manipulado em farmácias de manipulação. É também comercializado na Europa e América do Norte com o nome de Burinex®, Fordiuran®, Fontego®, Butinat®, Farmadiuril® e Bumex®, na forma de comprimidos e injetáveis²⁷.

1.2.2 Diuréticos Tiazídicos

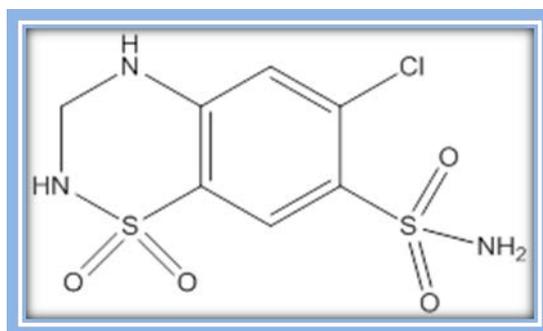
Dentre todos os diuréticos, as tiazidas ou diuréticos tiazídicos foram os primeiros anti-hipertensivos disponíveis para uso em larga escala. Lançados em meados dos anos 50, continuam a ser administrados, isolados ou em associação²⁸.

Os diuréticos tiazídicos atuam sobre o túbulo distal dos rins, diminuindo a reabsorção de sódio e cloro através de sua ligação ao sítio do cloro, inibindo sua ação e, conseqüentemente, o sistema de co-transporte Na^+/Cl^- . Os tiazídicos têm apenas eficácia moderada, pois cerca de 90% da carga filtrada é reabsorvida antes de atingir o túbulo contorcido distal. Assim, os diuréticos tiazídicos podem ser administrados uma vez ao dia e são bem tolerados²⁰.

I.2.2.1 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (1,1-dióxido-6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida) (HCTZ) apresenta ponto de fusão de 273-275°C, é solúvel em acetona, amônia diluída, metanol e etanol e é praticamente insolúvel em água²⁶. Sua estrutura está representada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química da hidroclorotiazida.



Fonte: Elaborada pela autora.

A hidroclorotiazida pertence à classe dos fármacos tiazídicos, os quais possuem um núcleo benzotiadiazina 1,1-dióxido²⁹. Tais fármacos constituem uma importante classe de agentes diuréticos que atuam no túbulo distal, diminuindo a reabsorção ativa dos íons sódio e cloreto. Entretanto, estes fármacos apresentam ação diurética moderada quando comparados aos diuréticos de alça. Os diuréticos tiazídicos levam a uma perda significativa de potássio, causando hipocalemia (diminuição nos níveis plasmáticos de potássio) que pode ser evitada pela administração concomitante de diuréticos poupadores de potássio (triantereno, amilorida, por exemplo) ou suplementos

de potássio. Assim, algumas formulações farmacêuticas contendo hidroclorotiazida em associação com diuréticos poupadores de potássio são comercialmente disponíveis.

A hidroclorotiazida é efetiva por via oral e é excretada na urina em sua forma inalterada, a duração da ação é de 8-12 horas²⁹. Os principais efeitos adversos da hidroclorotiazida resultam de algumas ações renais, sendo a depleção de potássio a mais importante. Outros efeitos incluem alcalose metabólica e aumento dos níveis séricos de ácido úrico.

O seu uso é indicado no tratamento de edemas associados a cardiopatias (insuficiência cardíaca congestiva), hepatopatias (cirrose hepática) e doenças renais (síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, glomerulonefrite aguda). Este fármaco também é muito usado no controle da hipertensão²⁰.

Dentre as classes de substâncias proibidas, a classe dos diuréticos é a mais comumente utilizada pelos atletas, pois além de serem fármacos facilmente adquiridos, há atletas que fazem uso dessas substâncias para perderem peso antes de competições ou para esconderem que fizeram uso de outras substâncias dopantes, alterando sua concentração na urina³⁰. Dessa forma, há necessidade do monitoramento constante dos níveis de concentração dessas substâncias em amostras biológicas.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a análise de bumetanida e hidroclorotiazida em diversos tipos de amostras, incluído urina humana. Entretanto, a maioria dos métodos descritos na literatura, de modo geral, envolve métodos por CLAE convencional, a qual requer instrumentação complexa e de alto custo, além de um excessivo tempo de análise e necessidade de grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos. Outra técnica muito utilizada para a determinação dos fármacos envolvidos neste estudo é a espectrofotometria na região UV e visível. Todavia, os métodos espectrofotométricos baseados em medidas diretas no UV estão sujeitos a interferências provenientes da matriz. Os métodos por espectrofotometria no visível descritos para a determinação dos fármacos em estudo apresentam problemas relacionados à necessidade de etapas de aquecimento e de derivatização, tempo de análise relativamente longo, instabilidade do composto colorido formado e alguns são métodos indiretos.

A seguir, é apresentado um levantamento bibliográfico sobre os métodos existentes para determinação dos dois diuréticos estudados durante este trabalho.

**CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO
DOS FÁRMACOS EM ESTUDO.**

II. 1. BUMETANIDA

Um cuidadoso levantamento bibliográfico foi realizado nas principais fontes de consulta eletrônica (*Scifinder Scholar* e *Web of science*) utilizando as palavras chaves: “*determination of bumetanide*” e “*analysis of bumetanide*” foram encontradas poucas publicações sobre métodos analíticos para a determinação de bumetanida no período compreendido de 1973 a 2015.

II.1.1. Métodos Espectrofotométricos/Reflectométricos.

Na revisão bibliográfica foram encontrados dois artigos que descrevem a determinação de bumetanida por espectrofotometria e um por reflectância difusa. SASTRY et al³¹ propuseram um método espectrofotométrico para a análise de 8 diuréticos, dentre os quais, a bumetanida. O método proposto é baseado na reação entre bumetanida e 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona na presença de cloreto de ferro (III). O tempo para a reação ocorrer é de 10 minutos, e o produto apresentou-se estável por aproximadamente 2 horas. O espectro mostrou absorção máxima em 660 nm. A faixa de trabalho utilizada foi de 1 a 10 mg L⁻¹.

ZIVANOVIC et al³² descreveram um método no qual a bumetanida reagiu com cloreto de ferro (III) na presença de tiocianato de amônio em pH entre 1,83 e 1,92, formando um complexo violeta solúvel em clorofórmio.

POLLO³³ desenvolveu um procedimento analítico baseado nos princípios da química verde, usando espectroscopia de reflectância difusa, no qual a bumetanida reagiu com p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC), em meio ácido, produzindo um composto de coloração violeta. As medidas de reflectância foram realizadas em 525 nm e o limite de detecção do método foi de $3,98 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

II.1.2. Métodos cromatográficos

A técnica de cromatografia gasosa (CG) não é uma técnica muito empregada para determinação de bumetanida, sendo encontrados na literatura apenas nove artigos,

sendo a maioria deles antigos. HIOKI et al³⁴ propuseram um método para determinação de bumetanida em urina de voluntários utilizando a cromatografia gasosa. O comprimido foi administrado oralmente (1 mg) e foi encontrado excretado na maior parte inalterado na urina de seres humanos. Dentro de 24 horas após a administração, 57% da dose administrada foi recuperada.

AMENDOLA et al¹⁵ relataram um método para a determinação de uma mistura de 18 diuréticos por cromatografia gasosa com detector de massas. Foi necessária etapa prévia de derivatização utilizando uma mistura de acetona em iodeto de metila na proporção 1:10 em forno de micro-ondas, o que diminuiu o tempo de incubação de 3 horas para 10 minutos. Após a derivatização, as amostras foram eluídas em cartucho de C18 com metanol. O solvente foi evaporado em atmosfera de N₂ a 40 °C. O limite de detecção encontrado foi 50 µg L⁻¹.

HAGEDORN e SCHULZ³⁵ relataram um método para determinação de bumetanida, ácido etacrínico e furosemida em urina de cavalo para controle de doping. A detecção foi feita por cromatografia gasosa com detector de massas. O tempo de eluição foi de 15 minutos e o limite de detecção encontrado foi 40 µg L⁻¹.

CARRERAS et al³⁶ fizeram uma comparação entre 3 diferentes procedimentos de screening utilizando CG-EM para detecção de 20 diuréticos em amostras de urina fortificadas com os padrões dos medicamentos. Para a bumetanida o procedimento que apresentou melhores resultados foi a “metilação flash” que consistia da pirólise do sal de tetraalquilamônio no injetor do cromatógrafo utilizando trimetilnilina como agente derivatizante e previamente uma extração em fase sólida.

Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais empregada na determinação de bumetanida em matrizes biológicas^{37-38, 41-43} e fármacos^{39,40} devido à sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo sua ampla aplicabilidade⁴⁴, mas a técnica apresenta certas limitações como o alto custo dos equipamentos, o emprego de grandes quantidades de solventes, além da necessidade de um operador especializado.

WELLS et al³⁷ desenvolveram um método para análise de bumetanida em sangue e urina utilizando um método de cromatografia em fase reversa com detecção por fluorescência. A fase móvel consistia de metanol, água, ácido acético glacial (66:34:1) em fluxo de 1,2 mL min⁻¹. A amostra foi extraída em coluna C18 com acetonitrila após etapa prévia de precipitação das proteínas.

CAMPÍNS-FALCÓ, HERRAEZ-HERNANDEZ e SEVILLANO-CABEZA³⁸ relataram um método para quantificação de 12 diuréticos em urina utilizando CLAE com detecção ultravioleta em 230 nm. Acetonitrila e solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ foram utilizadas como fase móvel em modo de eluição em gradiente e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. LEGORBU, ALONSO, R. M.; JIMINEZ, e ORTIZ³⁹ propuseram um método de quantificação de bumetanida em medicamentos e em urina de pacientes que ingeriram o medicamento, utilizando CLAE com detecção amperométrica em +1350 mV com eletrodo de carbono vítreo. A faixa de trabalho foi de 50 a 499 µg L⁻¹, com limite de detecção de 0,25 µg L⁻¹.

CARDA-BROCH, ESTEVE-ROMERO e GARCÍA-ALVAREZ-COQUE⁴¹ também desenvolveram um método para determinação de sete diuréticos em amostras de urina. Para tanto, utilizaram uma fase móvel contendo o surfactante (SDS), propanol e solução tampão fosfato a pH 3 e detecção por fluorescência. O tempo de retenção para a bumetanida foi de aproximadamente 10 minutos. O limite de detecção encontrado foi 1,4 µg L⁻¹.

PARK e GWAK⁴² desenvolveram um método para determinar bumetanida em sangue com detecção por fluorescência, a fase móvel utilizada foi metanol, água, ácido acético glacial (65:35:1). O limite de detecção encontrado foi 5 µg L⁻¹. O método foi aplicado em amostras fortificadas com o medicamento e em amostras de pacientes que ingeriram o medicamento.

Um pouco mais recente, PATEL et al⁴³ propuseram um método rápido, seletivo e sensível para determinação de bumetanida em plasma humano utilizando a cromatografia líquida acoplada ao massas (CL-EM/EM). A recuperação foi maior que 90%.

II.1.3. Eletroforese Capilar e outros métodos

A eletroforese capilar é também um método de separação utilizado para a análise de diuréticos. GONZÁLEZ, BECERRA e LASERNA⁴⁴ propuseram um método onde 4 diuréticos considerados dopantes foram analisados simultaneamente por eletroforese capilar com detector de fluorescência em amostras de urina. A separação completa se

deu em menos de 8 minutos a pH 8, com λ de excitação em 350 nm e λ de emissão em 428 nm. O limite de detecção encontrado foi $21,6 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$.

SOLICH et al⁴⁵ descreveram um método em FIA baseado na fluorescência da bumetanida em meio alcalino para análise de medicamentos. Parâmetros como: concentração do carregador, pH da solução tampão (variáveis químicas), volume injetado de amostra, tamanho da bobina de reação, fluxo e comprimento de onda (variáveis instrumentais) foram otimizadas e as melhores condições foram: fluxo de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$, bobina de 50 cm, volume injetado de amostra de 110 μL , concentração da solução tampão aminoacetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, concentração do carregador $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e pH 11,5. A faixa de trabalho estudada foi de 0,5 a 10 mg L^{-1} , com limite de detecção de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e frequência analítica de 60 análises hora⁻¹.

II.1.4. Métodos Eletroquímicos

Em toda a revisão bibliográfica apenas um método voltamétrico⁴⁶ foi encontrado para a determinação de bumetanida em medicamentos e urina. O método consiste na determinação de bumetanida com eletrodo de pasta de carbono em meio de KNO_3 . As medidas foram feitas a pH 2,5. O limite de detecção encontrado foi $0,16 \text{ mg L}^{-1}$. Para a determinação em amostras fortificadas de urina, o método de extração para os interferentes ácido ascórbico e ácido úrico foi a extração líquido-líquido. A porcentagem de recuperação foi 71%.

II.2. HIDROCLOROTIAZIDA

O levantamento bibliográfico para a hidroclorotiazida também foi realizado de forma semelhante, as pesquisas foram realizadas nas principais fontes de consulta eletrônica (*Scifinder Scholar* e *Web of science*) utilizando as palavras chaves: “*determination of hydrochlorothiazide*” e “*analysis of hydrochlorothiazide*” no período compreendido de 1960 a 2015.

II.2.1. Métodos Espectrofotométricos/Reflectométricos.

Os métodos por espectrofotometria no UV descritos na literatura são, principalmente, para a determinação de hidroclorotiazida em associação com um ou mais fármacos. Entretanto, medidas diretas na região do UV estão sujeitas às interferências provenientes de fármacos e/ou de excipientes presentes na formulação farmacêutica, resultando em baixa seletividade, uma vez que todos os compostos insaturados apresentam uma ou mais bandas na região UV do espectro eletromagnético. Desta forma, os métodos por espectrofotometria no UV para a determinação de hidroclorotiazida associada a outros fármacos presentes em formulações farmacêuticas são baseados em medidas derivativas a fim de se obter métodos com maior seletividade do que os métodos espectrofotométricos convencionais. A Farmacopéia Britânica descreve um método por espectrofotometria no UV em 273 nm para a determinação de hidroclorotiazida em comprimidos⁴⁷.

ERK⁴⁸ propõe três novos procedimentos espectrofotométricos baseados em medidas derivativas para a determinação simultânea de fosinopril e hidroclorotiazida. Segundo os autores, os métodos desenvolvidos foram comparados com o método da razão de absorção. Os métodos foram aplicados com sucesso ao determinar os compostos em misturas sintéticas e em produtos farmacêuticos, com alta porcentagem de recuperação, boa exatidão e precisão.

KOWALCZUK e HOPKALA⁴⁹ desenvolveram um novo método de espectrofotometria derivativa baseada na técnica de cruzamento de zero para determinação da mistura de quinapril e hidroclorotiazida. O quinapril foi determinado no comprimento de onda de 211,6 nm e HCTZ foi medida a 270,8 nm. Gráficos de calibração foram construídos sobre a faixa linear de 4,0 e 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quinapril e 2,5-15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para hidroclorotiazida e os limites de detecção e de quantificação foram 0,85 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,12 e 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso para a análise de ambos os fármacos em comprimidos, com uma recuperação em torno de 100,5 a 102%.

HEMKE et al⁵⁰ desenvolveram um método simples, específico, exato, preciso e reprodutível para determinação simultânea de hidroclorotiazida e olmesartan medoxomil em forma de dosagem combinada por espectrofotometria UV. As duas

drogas seguiram a lei de Beer, a faixa de linearidade foi obtida no intervalo de concentração de 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As recuperações de ambas as drogas foram de quase 100%. A validação do método proposto foi realizada por sua exatidão, precisão, especificidade e robustez. O método proposto pode ser aplicado com sucesso em análises de rotina para a determinação de HCTZ e olmesartan medoxomil em forma de dosagem combinada.

MANISH, AJAY, e SINGH ⁵¹ desenvolveram um método espectrofotométrico UV simples, exato, preciso, rápido e econômico foi desenvolvido para determinação simultânea de cloridrato de telmisartan e HCTZ e em uma forma de dosagem de comprimido combinado. Este método foi baseado em equações simultâneas para análise dos dois fármacos, utilizando metanol como solvente. Telmisartan Cloridrato tem absorção máxima em 234 nm e Hidroclorotiazida tem absorção máxima em 273 nm em metanol. Faixa de linearidade foi obtida no intervalo de concentração de 4-24 mg mL^{-1} para telmisartan Cloridrato e 2-8 ng mL^{-1} para hidroclorotiazida; O método apresentou boa reprodutibilidade e recuperação com desvio padrão relativo inferior a 2%, sendo aplicado com sucesso nos comprimidos combinados de ambas as drogas.

GOTARDO ⁵² desenvolveu um método espectroscópico usando a reflectância difusa, utilizando *spot test*, no qual a hidroclorotiazida reagiu com p-dimetilaminocinamaldeído, em meio ácido, produzindo um composto colorido e as medidas foram realizadas em 585 nm. As variáveis foram otimizadas por planejamento fatorial. O limite de detecção foi de $1,32 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

II.2.2. Métodos cromatográficos

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais empregada na determinação de bumetanida em diversos tipos de amostras.

PEI et al⁵³ propuseram um método simples, rápido e sensível para hidroclorotiazida em amostras de plasma humano utilizando fluconazol como padrão interno. A preparação da amostra foi realizada utilizando extração líquido-líquido. A fase móvel foi constituída por um mistura de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético e água (20:40:40), o comprimento de onda foi fixado em 266 nm e os tempos de retenção de HCTZ e do padrão interno foram de 4,2 e 5,5 min, respectivamente. O limite de quantificação foi de 5 ng mL^{-1} e não foram detectadas interferências nos

cromatogramas. O método foi aplicado com sucesso em um estudo farmacocinético de comprimidos orais de HCTZ em voluntários saudáveis.

GOWEKAR e MADHEKAR⁵⁴ desenvolveram um método para determinação de HCTZ por cromatografia líquida de alta eficiência. A fase móvel foi metanol e acetonitrila numa razão de 30:70 (v/v) e os eluentes da coluna foram detectados utilizando um detector de comprimento de onda a 271 nm. O método proposto tem permitido a quantificação de hidroclorotiazida na faixa linear de 20-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a taxa de fluxo foi mantida a 0,6 mL min^{-1} . O tempo de retenção de hidroclorotiazida foi de 4,76 min. O método mostrou ser adequado para o controlo de qualidade de rotina analítica de hidroclorotiazida em medicamentos a granel e em formulação.

WANG et al⁵⁵ determinaram a presença de hidroclorotiazida em plasma humano utilizando CL-EM/EM. Sulfametoxazol foi usado como padrão interno. O limite de detecção de hidroclorotiazida foi 1,070 g L^{-1} . A repetibilidade do método foi avaliada no mesmo dia e em dias diferentes e todos os resultados foram inferiores a 13,9% e as recuperações relativas estavam todos dentro 100,5% -102,2%. Segundo os autores, o método foi preciso, sensível, específico e conveniente, que pode ser utilizado na determinação de hidroclorotiazida em plasma humano.

SUN et al⁵⁶ propuseram um método de CLAE para determinação de hidroclorotiazida em plasma humano. As análises cromatográficas foram realizadas em uma coluna (5 μm , 150 mm x 4,6 mm) à temp. 30 °C. A fase móvel consistiu de acetonitrila 15% e 85% de solução tampão fosfato de tetrametilamônio (pH = 4,90), no qual a taxa de fluxo foi de 1,0 mL min^{-1} . O comprimento de onda de detecção foi de 271 nm. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de 2,0-400 ng mL^{-1} ($r = 0,9991$). A faixa de recuperação foi 94,1-109,0 %.

SOUSA et al⁵⁷ descrevem uma metodologia rápida (2,0 min) e sensível (LOQ 5 ng mL^{-1}) para a quantificação de hidroclorotiazida (HCTZ) em plasma de sangue humano. O método baseia-se na cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas, utilizando como padrão interno a clortalidona. Para as análises, usou-se uma coluna C18 monolítica (50 x 4,6 mm) de fase reversa em coluna e uma fase móvel contendo acetonitrila e água (80:20 v / v). Os analitos alvos foram transferidos para um espectrômetro de massas de quadrupolo triplo equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização para a detecção de massa. A faixa linear foi de 5-400 ng mL^{-1} e a média de recuperação para HCTZ foi 80,46%. O método foi aplicado

com sucesso a um único estudo farmacocinético dose oral em 26 voluntários humanos saudáveis.

II.2.3. Eletroforese Capilar e outros métodos

A eletroforese capilar é também um método de separação utilizado para a análise deste diurético. ZHENG et al⁵⁸ desenvolveram um método simples e sensível por eletroforese capilar com detecção amperométrica para determinação de três diuréticos, como a indapamida, hidroclorotiazida e bumetanida. Os limites de detecção estão na faixa de ng mL⁻¹ e o método proposto foi aplicado com sucesso para analisar os diuréticos em amostras de urina humana.

HILLAERT⁵⁹ investigou a determinação de HCTZ e seis antagonistas dos receptores da angiotensina por eletroforese capilar. O método foi validado em termos de sua linearidade da resposta, reprodutibilidade e precisão.

A Farmacopéia Brasileira descreve um método para quantificar hidroclorotiazida em comprimidos utilizando titulação em meio não-aquoso⁶⁰.

Um método por FIA baseado na reação de quimiluminescência entre hidroclorotiazida e cério (IV) foi desenvolvido por OUYANG et al⁶¹. A mesma reação foi utilizada em outro método utilizando quimiluminescência para a determinação de hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas⁶².

II.2.4. Métodos Eletroquímicos

Os trabalhos que utilizam técnicas eletroquímicas são em sua maioria por determinação voltamétrica. RAZAK⁶³ utilizou um eletrodo de carbono vítreo para estudar o comportamento voltamétrico da HCTZ em solução tampão Britton-Robinson (B.R.) pH 3,3. Um pico bem definido e irreversível foi obtido em torno de +1.0 V em voltametria de pulso diferencial. A análise do diurético foi realizada em comprimidos e urina sem nenhum tratamento e a metodologia foi comparada por método oficial.

MARTIN et al⁶⁴ desenvolveram um método de determinação simultânea de amilorida e HCTZ em formulações farmacêuticas usando polarografia de pulso diferencial na presença de oxigênio utilizando calibração multivariada. MALEH,

ENSAFI e ENSAFI⁶⁵ modificaram um eletrodo de pasta de carbono com ácido ferrocenodicarboxílico para estudar a oxidação de HCTZ. Observaram a diminuição de 300 mV do potencial de pico quando comparado ao eletrodo de pasta de carbono sem modificador, a pH 9,0. O método foi aplicado com sucesso em amostras de urina e fármacos.

SANTOS et al⁶⁶ propuseram um método para determinação simultânea de HCTZ e losartan usando voltametria de pulso diferencial. Para isso, utilizaram um eletrodo de diamante dopado com boro. Dois picos de oxidação reprodutíveis muito bem resolvidos para os dois compostos, com separação de 0,23 V, foram obtidos em solução tampão Britton-Robinson, pH 9,5.

SANTOS e CAVALHEIRO⁶⁷ desenvolveram um método voltamétrico utilizado um eletrodo modificado com nanotubos de carbono e um compósito de carbono para determinação de HCTZ em formulações farmacêuticas. Com a voltametria de pulso diferencial foi possível quantificar o diurético, em solução tampão B.R. a pH 7,0. O limite de detecção foi de 2,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

BEITOLLAHI, HAMZAVI e TORKZADEH-MAHANI⁶⁸ propuseram a determinação eletroquímica de hidroclorotiazida e ácido fólico em amostras reais usando um eletrodo de pasta de óxido de grafeno modificado com um novo composto derivado de ferroceno-2-clorobenzoil. Sob condições otimizadas, a corrente de pico da voltametria de onda quadrada (VOQ) para hidroclorotiazida aumentou linearmente com a concentração e o limite de detecção da mesma foi de 20,0 nmol L^{-1} . O coeficiente de difusão e parâmetros cinéticos (tais como coeficiente de transferência de elétrons e a constante de velocidade heterogênea) também foram determinados.

Diante do exposto, verifica-se que na literatura são descritos diversos métodos para a quantificação tanto da bumetanida quanto da hidroclorotiazida em medicamentos e matrizes biológicas. Entretanto, a grande maioria dos métodos reportados envolve a utilização de equipamentos e/ou acessórios sofisticados. Além do alto custo destes equipamentos alguns empregam quantidades razoáveis de solventes de alta toxicidade oferecendo riscos ao operador, não sendo indicados para o emprego de análises de rotina. Os métodos propostos neste trabalho visam os desenvolvimentos de metodologias novas, rápidas e que usem baixas quantidades de solventes, que gerem pouca quantidade de resíduo e principalmente que possibilitem a construção de dispositivos que realizem as análises em *situ* e/ou menor tempo.

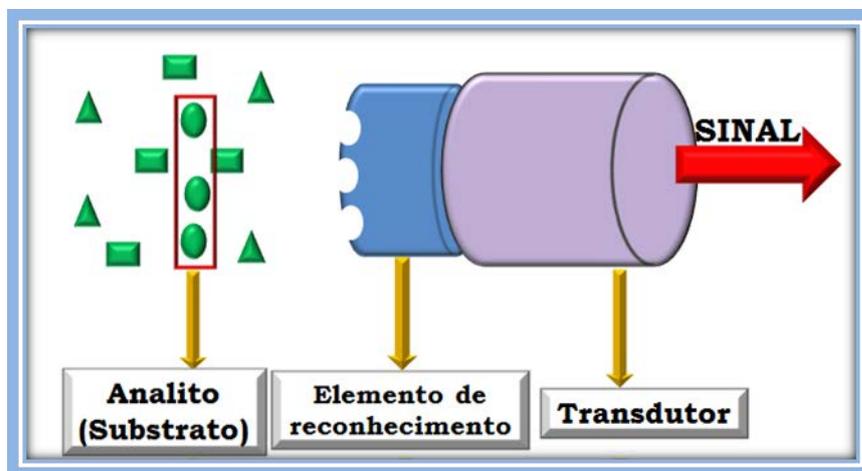
CAPÍTULO III. SENSORES QUÍMICOS

III.1. SENSORES QUÍMICOS

Em 1191, a União Internacional de química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceu uma definição para sensores químicos: “dispositivos que convertem a informação química, desde a concentração de analitos até a composição de amostras, em sinais analiticamente úteis”. A informação química pode originar-se de fenômenos químicos, bioquímicos ou físicos que envolvam a espécie de interesse⁶⁹.

Conforme a IUPAC, um sensor químico é formado por duas unidades funcionais básicas conectadas em série (Figura 4): o receptor que responde a parâmetros específicos e, em geral, interage com o analito transformando a informação química em uma forma de energia determinada capaz de ser transduzida, e o transdutor, responsável pelo processo de transdução, o qual acarreta em sinais elétricos analiticamente úteis. Ainda, os sensores químicos podem ser classificados conforme o princípio de transdução, os principais são: eletroquímicos, elétricos, ópticos, magnéticos, termométricos e sensíveis a massa⁶⁹.

Figura 4. Esquema ilustrativo de um sensor químico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, os sensores químicos apresentam-se como dispositivos pequenos, robustos, portáteis, de fácil manipulação que permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Estes dispositivos possuem características peculiares e, por isso, têm sido um elemento chave na instrumentação

analítica dispensando, em muitos casos, a utilização de aparelhos complexos e a necessidade de uma enorme infraestrutura de suporte⁷⁰.

III.1.1. Sensores eletroquímicos

Sensores eletroquímicos fazem parte de uma subclasse importante dos sensores químicos nos quais um eletrodo é utilizado como o elemento de transdução⁷¹, que dentre os vários transdutores existentes, se destaca pela sua facilidade de uso e de registro dos sinais que podem ser potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, condutométricos e impedimétricos. Eles se baseiam em reações de oxidação e redução, transformando o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos⁶⁹. Estes dispositivos têm sido amplamente explorados por apresentarem características interessantes como: resposta rápida, possibilidade de portabilidade, operação contínua, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade elevadas⁷².

Com o uso de métodos eletroquímicos, foi encontrada uma vasta quantidade de aplicações, desde monitoramento ambiental e industrial, incluindo também o controle de qualidade e análises biológicas⁷¹. Existem diversas técnicas com detecção eletroquímica, entretanto, as mais utilizadas para quantificação de uma metodologia analítica são: voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e amperometria.

A voltametria cíclica é a técnica normalmente obter informações sobre espécies químicas de interesse, e que podem ser qualitativas ou quantitativas, (corrente de pico, largura do pulso etc.) os dados são obtidos a partir do registro de curvas corrente versus potencial, registradas durante o processo de eletrólise da espécie de interesse. Ou seja, na superfície do eletrodo deve ocorrer uma oxidação ou redução nas regiões de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinâmica e cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (corrente elétrica) na interface eletrodo-solução.

A voltametria cíclica (VC) constitui-se numa técnica eficaz usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica é resultado da habilidade de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica do processo redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos⁷³. Esta técnica

frequentemente é a primeira a ser utilizada em um estudo eletroquímico, para caracterização e reconhecimento do sistema, pois oferece uma maneira simples da localização do potencial redox da espécie eletroativa, assim como permite uma avaliação conveniente do efeito do meio eletrolítico no processo redox.

A voltametria cíclica consiste na varredura de potencial em um eletrodo de trabalho utilizando uma onda de forma triangular. Para isto, inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma oxidação ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódica) ocorre a oxidação do composto na interface eletrodo/solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação. O voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos. Os parâmetros eletroquímicos mais importantes, são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}), e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido⁷⁴.

A voltametria de onda quadrada (VOQ), do inglês “*Square Wave Voltammetry*”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas⁷⁵. Do ponto de vista prático, a maior vantagem da VOQ é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica. Além disto, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente com componente faradaica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente com componente capacitiva seja minimizada⁷⁵. Na VOQ a variação de potencial é realizada na forma de uma escada, em que pulsos de potencial (ΔE_s) de igual amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais de altura constante (ΔE_p) e duração $2t_p$ (período). As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos direto (anódico) e reverso (catódico), originando um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado^{74,76}.

A VOQ apresenta as seguintes vantagens em comparação às outras técnicas de pulso: redução no ruído de fundo em varreduras repetitivas; registro de correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, com excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a faradaica, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica, baixo consumo de espécies eletroativas e redução nos problemas de passivação dos eletrodos; em muitos casos, a interferência do O₂ dissolvido é pouco significativa em medidas com VOQ.

Na amperometria, magnitude de um sinal elétrico é medida em função do tempo. Os parâmetros elétricos medidos podem ser a corrente (como no caso da amperometria) no qual o processo é iniciado por um pulso de potencial ou potencial aplicado; ou pode ser o potencial (na cronopotenciometria), no qual o processo por sua vez é iniciado pela circulação de um fluxo de corrente no eletrodo de trabalho.

A amperometria a potencial constante é a classe das medidas eletroanalíticas nas quais a corrente que flui do eletrodo de trabalho seja monitorada em função do tempo, a um potencial fixo no qual ocorre a reação redox do substrato de interesse. Em sistemas em que a espécie eletroativa encontra-se adsorvida na superfície do eletrodo, como no caso dos eletrodos quimicamente modificados, quando aplicado um potencial fixo, ocorre a redução ou a oxidação total do mediador, a corrente estabiliza eletroquimicamente a espécie (analito) a qual se deseja determinar, observando-se uma variação de corrente devido ao processo catalítico. Se a corrente observada apresentar uma correlação linear com a concentração do analito, tal eletrodo modificado pode ser utilizado como sensor amperométrico^{77,78}. Uma vantagem importante é que métodos crono-eletroquímicos permitem o acoplamento de sensores a sistemas em fluxo, permitindo a automatização das análises, visando monitoramento *on line* e/ou em tempo real⁷⁹.

Dessa forma, utilização de sensores eletroquímicos para determinação de concentrações de substâncias e de outros parâmetros de interesse tem sido bastante referida na literatura científica. Desde que começaram a serem utilizados os sensores eletroquímicos têm permitido uma melhora nas execuções de análise que antes eram realizadas por métodos analíticos convencionais, diminuindo o tempo de preparação da amostra e a utilização de reagentes dispendiosos, permitindo a utilização de instrumentos analíticos de baixo custo.

III.1.1.1. Sensores biomiméticos

Os sensores biomiméticos, podem ser definidos como dispositivos que incorporam um elemento de reconhecimento seletivo intimamente conectado a um transdutor, sendo que este elemento de reconhecimento imita, em algum aspecto, determinado sistema biológico utilizando um sistema químico mais simples. Os elementos mais amplamente usados tem sido: (i) complexos metálicos^{80,81}, que imitam sítios ativos enzimáticos; (ii) polímeros impressos^{82,83}, que imitam receptores naturais, como os anticorpos, (iii) ciclodextrinas modificadas⁸⁴, que imitam sítios de ligação enzimáticos; (iv) monocamadas moleculares⁸⁵, que imitam membranas celulares, entre outros.

Os sensores biomiméticos mais citados na literatura baseiam-se no uso de análogos sintéticos de enzimas naturais na construção de sensores, nos quais possivelmente ocorra uma transferência direta de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo, sem a necessidade de compostos mediadores de elétrons⁸⁶, visto que as enzimas são estruturas complexas encontradas em organismos vivos, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes necessitam de cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar a catálise bioquímica. Esta catálise enzimática altamente efetiva e específica tem incentivado diversos pesquisadores a buscar sintetizar modelos e análogos sintéticos que mimetizam o sítio ativo de enzimas. Cabe ressaltar que a ideia do uso de enzimas artificiais e sensores biomiméticos não está somente relacionada em mimetizar a estrutura de enzimas naturais, mas também com compostos capazes de realizar catálises de algum tipo de reação.

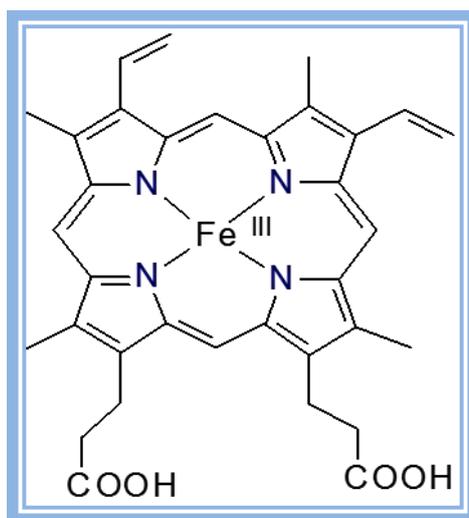
O desenvolvimento destes sensores pode ser considerado como um campo de pesquisa relativamente novo, ainda há poucos trabalhos relatados na literatura que procuram demonstrar que sintetizando e caracterizando adequadamente compostos inorgânicos simples e/ou complexos de metais de transição são capazes de catalizar substratos de forma semelhante à enzima correspondente, possibilitando desta forma a construção de sensores biomiméticos com alta seletividade e sensibilidade.

Uma condição para mimetizar uma enzima adequada para a construção de sensores biomiméticos é que a química da catálise da reação enzimática e a estrutura do

sítio ativo da enzima sejam muito bem conhecidas, e neste sentido as enzimas P450, encaixam-se perfeitamente nestes requerimentos.

Todas as enzimas P450 contêm um sítio ativo comum que é a protoporfirina de ferro IX (Figura 5), que é o grupo prostético encontrado em todas as enzimas citocromo P450. O papel deste grupo hemo nas diferentes citocromos P450, varia em função da natureza dos ligantes próximos ao grupo prostético e do substrato que será catalisado.

Figura 5. Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.



Fonte: Elaborada pela autora.

As ftalocianinas e porfirinas de Co (II), Cu (II), Fe (II) e outras ftalocianinas de metais de transição são conhecidas há muito tempo como catalisadores homogêneos e heterogêneos para uma grande variedade de reações químicas. O macrociclo funciona como catalisador redox no qual o estado de oxidação do complexo metálico varia durante o ciclo catalítico^{87,88}. Contudo, os complexos dessas estruturas são reconhecidos por sua excelente atividade eletrocatalítica em muitas reações, que são altamente dependentes do átomo central.

Geralmente, estes complexos metálicos são estáveis, até em reações redox, e apresentam estruturas similares às porfirinas de origem animal, as quais têm funções características em muitos sistemas biológicos tais como a clorofila, a hemoglobina, o citocromo e várias enzimas do tipo oxidases^{89,90}. Assim, as ftalocianinas podem ser reconhecidas como moléculas biomiméticas, que podem substituir convenientemente proteínas naturais, atuando como o centro ativo de moléculas enzimáticas, com a mesma seletividade e sensibilidade⁹¹.

Nesse contexto, a utilização destas moléculas no desenvolvimento de sensores apresenta-se com um grande campo de pesquisa a ser explorado, porque estes complexos podem facilitar a transferência eletrônica entre o substrato e a superfície do eletrodo, sem a presença de um escudo protéico, como nas enzimas, o que geraria um aumento capacitivo na resposta do sensor. Além disso, devido aos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, têm conduzido a uma crescente busca por sensores devido à necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações baixas.

Aliando as características destes materiais biomiméticos juntamente com as vantagens dos eletrodos preparados à base de pasta de carbono (EPC) podem-se desenvolver metodologias analíticas (sensores) que visam atender a demanda de análises de diversas áreas de interesse. Esses eletrodos oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície e são fáceis de preparar. Uma das maneiras de obter um EPC é misturar grafite em pó e um líquido orgânico (aglutinante) que é imiscível em contato com soluções aquosas e que fornecerá a consistência de pasta à mistura^{92,93}.

Assim, uma das principais vantagens da pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, etc., resultando em um sistema de medida que dispensa a necessidade de adição de reagentes em solução durante a análise^{92,93}.

Dessa forma, o uso de pasta de carbono continua a ser atraente porque além da versatilidade oferecida para a preparação da pasta, a qual pode ir desde a forma convencional pela mistura de pó de grafite e algum modificador seletivo (enzimas ou catalisadores redox), até dispositivos mais elaborados, como por exemplo, polímeros molecularmente impressos (MIP)⁹⁴, demonstram ter alta estabilidade química, elevada atividade eletrocatalítica e, baixas correntes capacitivas⁹⁵.

III.1.1.1.1 Polímeros de impressão molecular – MIP

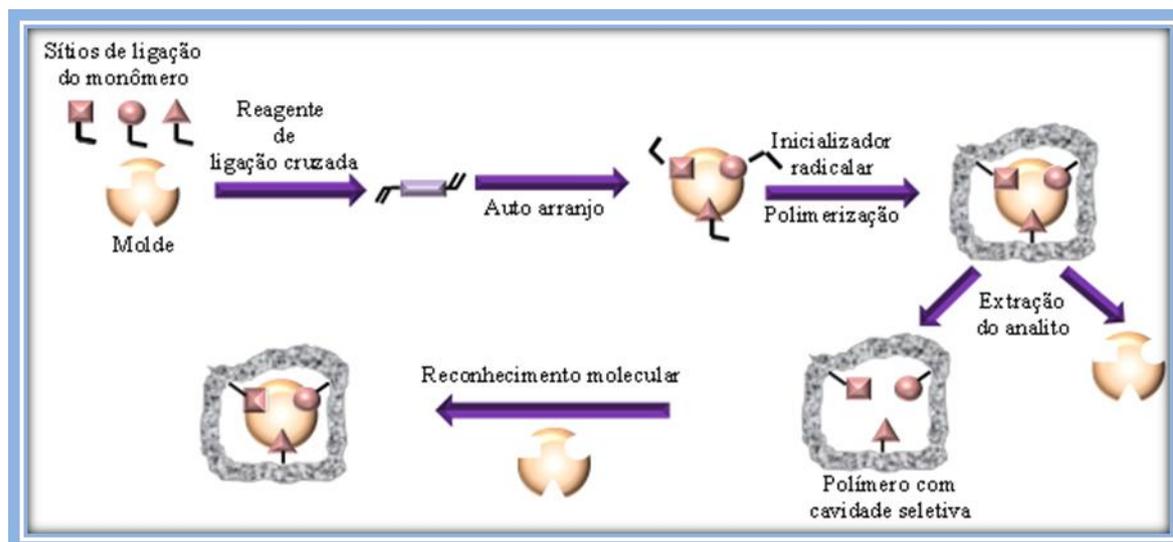
Outra estratégia para a construção de sensores biomiméticos é a utilização de polímeros de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) materiais que mimetizam a interação anticorpo-antígeno; são formados por materiais poliméricos rígidos que apresentam propriedades de reconhecimento molecular para uma molécula alvo, denominada molde⁹⁶. O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Pauling para formação de anticorpos, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos⁹⁷.

Os polímeros de impressão molecular (MIP) em relação aos materiais biológicos apresentam vantagens como o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material por longos períodos de tempo, a capacidade de ser estocado sem perder sua especificidade, a possibilidade de reutilização do polímero após a limpeza do mesmo e a possibilidade de ser empregado em condições diferentes daquelas presentes em seu ambiente nativo^{98,99}.

Os sistemas MIP, que consistem basicamente em utilizar como molde uma molécula de interesse interagir covalentemente ou não com as moléculas do monômero que compõem o polímero, têm atraído considerável atenção na última década, pois aparecem como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de sistemas de reconhecimento molecular.

Para a síntese do MIP, uma molécula utilizada como molde (analito) primeiramente deve interagir com as moléculas do monômero funcional. Posteriormente, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no polímero a fim de formar uma matriz polimérica rígida. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar. Por fim, a molécula molde é removida da matriz polimérica utilizando um solvente adequado. Com a remoção da molécula molde, o polímero resultante disporá de microcavidades, com tamanhos uniformes, capazes de reter seletivamente a molécula molde presente numa amostra complexa. O processo geral de síntese de um MIP, bem como seu mecanismo de atuação é mostrado na Figura 6.

Figura 6. Esquema representativo do processo de síntese de MIP.



Fonte: Elaborada pela autora, baseada na referência 97.

O monômero funcional desempenha um papel muito importante no processo de reconhecimento molecular, uma vez que ele está diretamente envolvido na formação de ligações químicas com a molécula molde nos sítios impressos, uma avaliação dos grupos funcionais presentes na molécula alvo deve ser realizada, e em seguida, a melhor escolha do monômero funcional que permitirá a formação de ligações químicas mais efetivas com o analito. O solvente utilizado na síntese influencia a estabilidade da formação do complexo “analito-monômero”, por isso, sua escolha torna-se uma etapa importante do processo. O solvente, além de fornecer um meio onde analitos e monômeros sejam solúveis, não deve interferir na interação analito-monômero¹⁰⁰.

Além dos parâmetros mencionados anteriormente, a seletividade destes polímeros é também assegurada face ao emprego de reagentes que promovam ligações cruzadas, permitindo assim, a estabilidade do complexo “analito-monômero” gerando uma matriz polimérica rígida que garante a estrutura do sítio seletivo formado. O reagente de ligação cruzada deve estar presente em excesso em relação à quantidade de monômero funcional. Estudos têm demonstrado que no mínimo 50% do reagente de ligação cruzada deve estar presente no meio reacional¹⁰¹. Uma vez que todos os componentes estejam presentes na mistura reacional (analito, monômero, reagente de ligação cruzada e o solvente apropriado), para que possa ocorrer à reação de polimerização é acrescentado um iniciador radicalar ao meio. Esse composto, por sua

vez, sofre clivagem em sua estrutura, ou por radiação UV ou por aquecimento, para gerar radicais que iniciam o mecanismo da reação de polimerização.

A proposta de utilização de MIP ao invés de materiais biológicos (enzimas e anticorpos) é bem vantajosa, pois são de fácil preparo, baixo custo, possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e, resistência a ambientes adversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam, como na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos, altas temperaturas e alta pressão⁹⁹⁻¹⁰³.

Observa-se atualmente uma forte tendência do seu uso como elementos de reconhecimento em sensores biomiméticos¹⁰⁴, principalmente com transdução piezelétrica ou óptica, ou mais comumente empregados em associação com técnicas de extração em fase sólida e de separação para diferentes espécies químicas^{105,106}.

CAPÍTULO IV. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A partir das considerações descritas neste trabalho, pode-se constatar a necessidade de métodos simples, rápidos, de baixo custo e com baixo consumo de reagentes e solventes torna-se evidente, especialmente para análises de interesse clínico e de controle de qualidade de bumetanida e hidroclorotiazida. Para isso, acredita-se que os sensores eletroquímicos biomiméticos são uma alternativa viável na determinação dessas substâncias, pois apresenta algumas características vantajosas, como por exemplo, boa seletividade, sensibilidade e principalmente a possibilidade de portabilidade.

A combinação da construção de sensores eletroquímicos biomiméticos com o uso de eletrodos de pasta de carbono torna-se muito atraente no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que esta combinação fornece medidas rápidas, simples, com baixo consumo de reagentes e solventes e baixa geração de resíduos. Além disso, os sensores biomiméticos são uma nova estratégia experimental que tem sido usada para obter sensores mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais que possuem como base materiais biológicos e o uso de pasta de carbono continua a ser atraente, porque além da versatilidade oferecida para a preparação da pasta, esses sensores demonstram ter alta estabilidade química e elevada atividade eletrocatalítica.

Além disso, pretende-se utilizar as características dos MIPS como materiais adsorvente em cartuchos de extração em fase sólida para extrair e pré-concentrar o analito de interesse de uma amostra complexa, permitindo aumentar a sensibilidade do método de análise.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias analíticas simples, rápidas e sensíveis para a análise dos diuréticos bumetanida e hidroclorotiazida utilizando sensores biomiméticos com detecção eletroquímica e aliar a eficiência na pré-concentração utilizando os polímeros sintéticos (MIP) com a alta seletividade dos sensores biomiméticos, de forma a obter uma metodologia analítica altamente promissora na determinação das diferentes substâncias mencionadas. E os objetivos específicos foram:

- Otimização dos parâmetros de preparação e resposta para os sensores eletroquímicos desenvolvidos usando planejamento fatorial e de superfície de resposta.

- Determinação dos principais parâmetros analíticos para as metodologias desenvolvidas.
- Aplicação em urina humana e formulações farmacêuticas e validação dos métodos.
- Síntese de polímeros molecularmente impressos para o diurético bumetanida.
- Otimização e caracterização da síntese e eficiência do MIP.

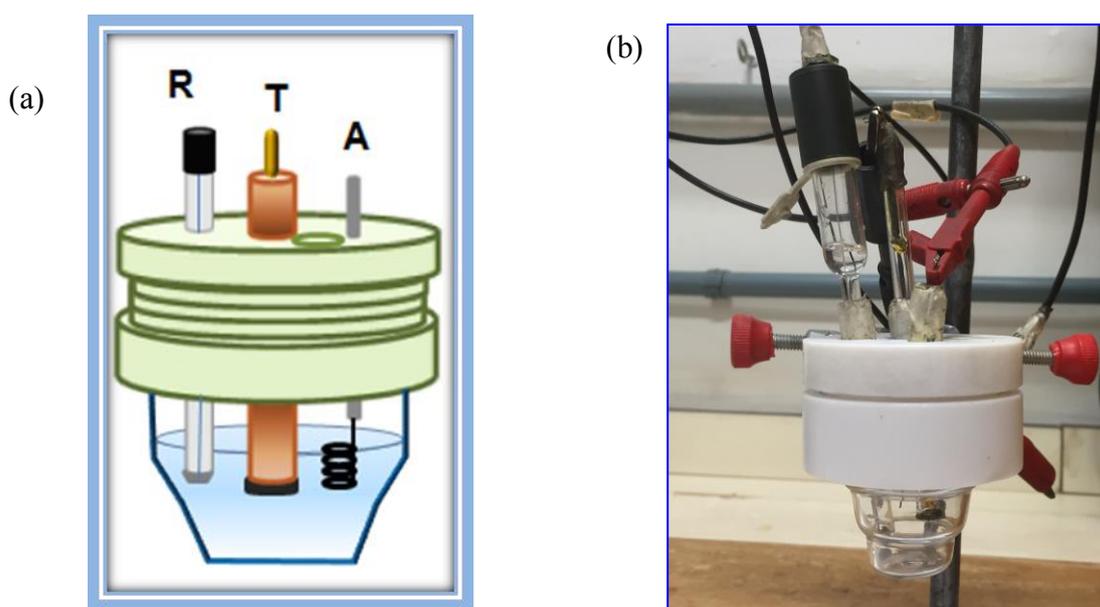
**CAPÍTULO V. SENSOR ELETROQUÍMICO
BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
BUMETANIDA EM URINA E EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS.**

V. 1. PARTE EXPERIMENTAL

V. 1.1. Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab[®] PGSTAT30 (Autolab/Eco Chemie) conectado ao software GPES versão 4.9, usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl, uma espiral de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono modificada como eletrodo(s) de trabalho. A Figura 7 ilustra de (a) forma representativa e (b) real o sistema utilizando durante a realização de toda parte eletroquímica do trabalho.

Figura 7. Esquema representativo da célula eletroquímica convencional (a) e a foto real (b). Sendo A: eletrodo auxiliar, T: Eletrodo de trabalho e R: Eletrodo de referência.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para estudos comparativos da metodologia desenvolvida, realizou-se análises de determinação do diurético em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu modelo 20A, o qual possui os seguintes componentes: detector UV-Vis modelo SPD-20A, amostrador automático modelo SIL-20A, bomba modelo LC-20AT e interface modelo SPD-20A. O método para as corridas cromatográficas utilizou uma coluna cromatográfica C18 da marca Phenomenex[®] LUNA (250 X 4,60 mm e 5 μm de tamanho da partícula), um fluxo de 1 mL min^{-1} , comprimento de onda de 230 nm, volume de injeção de $10 \mu\text{L}$, a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e 2,5 x

$10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fostato a pH 2,5, na proporção de 80:20 e o LcSolution como *software* para tratamento dos dados

Para o preparo de padrão e amostras foi necessário a utilização de diferentes instrumentos, tais como), uma balança analítica METTLER TOLEDO – modelo AG245, micropipeta de 10 – 100 μL e 100 – 1000 μL (marca Eppendorf) e um aparelho de banho ultrassônico da marca Unique[®] - modelo USC-2500 contendo um aquecimento ajustável de temperatura e um temporizador digital de 0 a 60 minutos foi utilizado para auxiliar na dissolução de amostras.

V. 1.2. Reagentes e solventes

A bumetanida utilizada neste trabalho, todos os complexos metálicos estudados e avaliados como possíveis catalisadores das enzimas P450, assim como o óleo mineral e grafite foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. O ácido bórico (H_3BO_3), hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido acético foram da Synth[®] e ácido fosfórico foi adquirido pela Mallincrodt[®], todos esses reagentes foram utilizados na preparação da solução tampão.

Os solventes utilizados no método para a determinação deste diurético foram etanol (grau p.a.) da Synth[®] e metanol (grau CLAE) da J.T. Baker. Os fármacos utilizados nos estudos de interferências foram de grau farmacêutico.

V. 1.3. Preparo das soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3) e foram preparadas no momento do uso.

a) Solução de trabalho de bumetanida: A solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ era preparada pela dissolução de 3,6 mg de bumetanida com 25,0 mL de etanol. A solução padrão foi preparada a partir de diluição adequada da solução estoque com H_2O deionizada e utilizada na construção da curva analítica.

b) Solução tampão: A solução tampão Britton-Robinson (B.R.) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da pesagem de 4,61 g de H_3BO_3 , solubilizadas em água deionizada, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL, em seguida adicionou-se 4,30 mL de ácido acético e 5,15 mL de ácido fosfórico e completou-se o balão volumétrico com H_2O deionizada. O valor do pH foi ajustado pela adição de NaOH.

c) Solução dos interferentes: Os 14 fármacos foram avaliados como possíveis interferentes e suas respectivas soluções foram preparadas de forma que todos ficassem com concentração molar 10 vezes maior que o analito em estudo. Portanto, uma massa adequada de cada interferente foi pesada e solubilizada em diferentes solventes de acordo com a solubilidade de cada um, assim a concentração de cada interferente foi de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

V. 1.4. Preparo das Amostras

A determinação de bumetanida foi realizada em amostra de urina proveniente de 4 homens (1H, 2H, 3H, 4H) e de 2 mulheres (5M e 6M), com faixa etária diferentes (entre 20-60 anos), dentre os quais um dos doadores (4H) consumia um outro diurético (não estudado neste trabalho). As amostras foram rotuladas e enriquecidas separadamente com solução padrão de bumetanida.

As amostras comerciais das formulações farmacêuticas (comprimidos) foram obtidas de farmácia convencional e de farmácia de manipulação localizadas na cidade de Araraquara/SP e foram analisadas dentro dos seus prazos de validade. O conteúdo do princípio ativo declarado no rótulo de cada comprimido é de 1 mg por comprimido/cápsula.

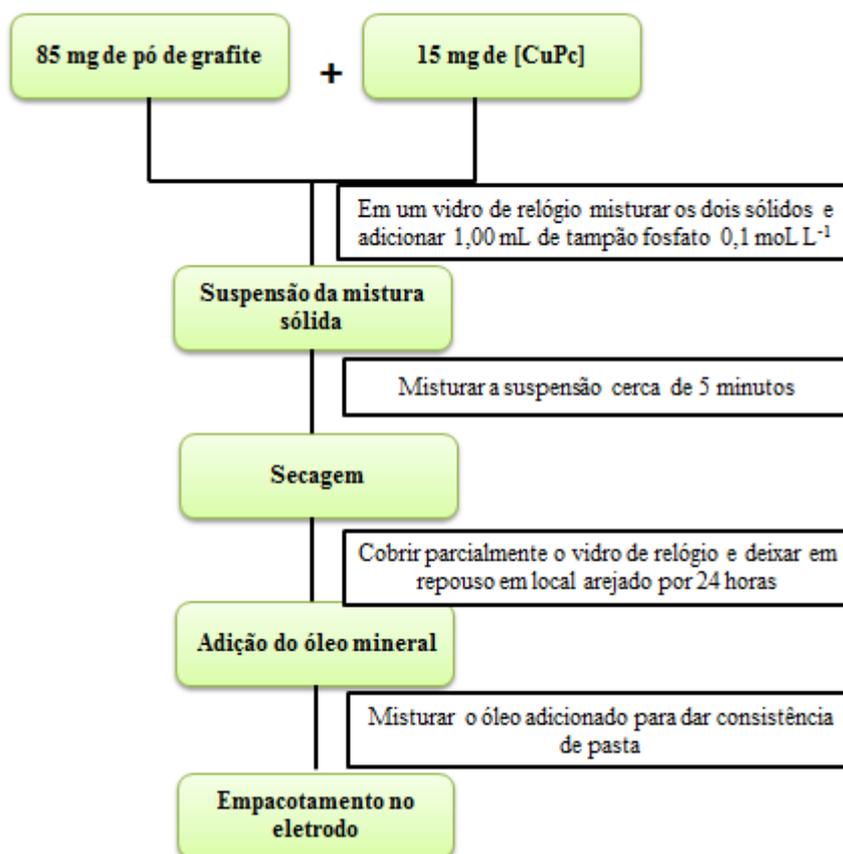
Os medicamentos foram macerados (apenas os comprimidos) e pesados. Foram utilizados 20 comprimidos ou 20 cápsulas de cada medicamento e a preparação das soluções se deu a partir de cálculos de massa referente aos fármacos do estudo presente nos comprimidos em relação a sua massa total. Depois de preparada uma concentração conhecida do fármaco, filtrou-se essa solução para a retirada de substâncias insolúveis.

V. 1.5. Construção do sensor biomimético de pasta de carbono modificada

Para a construção do sensor proposto foram testados vários complexos metálicos que poderiam atuar como possíveis catalisadores biomiméticos da enzima P450. Após terem sido avaliadas algumas ftalocianinas e porfirinas metálicas, foi escolhido o complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29-H,31-H-ftalocianinacobre (II) [CuPc] na modificação da pasta de carbono. A escolha baseou-se neste complexo pois o mesmo apresentou maior ganho de sinal em relação aos outros compostos e em relação à pasta de carbono sem modificar.

O preparo da pasta de carbono para determinação de bumetanida foi realizada misturando 85 mg de pó de grafite, 15 mg do complexo metálico [CuPc] e 1,00 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e a seguir, deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se cerca 60 µL do agente aglutinante (óleo mineral - Nujol®) para a obtenção da pasta de carbono, a qual depois de usada era armazenada a seco (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma Ilustrativo das etapas da preparação da pasta modificada.



Fonte: Elaborada pela autora.

A pasta de carbono modificada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro (0,126 cm²) e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo (Figura 9). Finalmente a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo, a fim de obter uma superfície homogênea.

Figura 9. Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo de trabalho adequado para montagem do sensor.



Fonte: Elaborada pela autora.

V. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. 2.1. Caracterização eletroquímica do sensor

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre as reações de oxidação e redução, fornecendo informações importantes sobre os processos que estão ocorrendo na superfície do eletrodo. Dessa forma, inicialmente foram estudados, utilizando a voltametria cíclica, diversos complexos (Tabela 1) a fim de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção da bumetanida.

Tabela 1. Complexos analisados em estudos preliminares

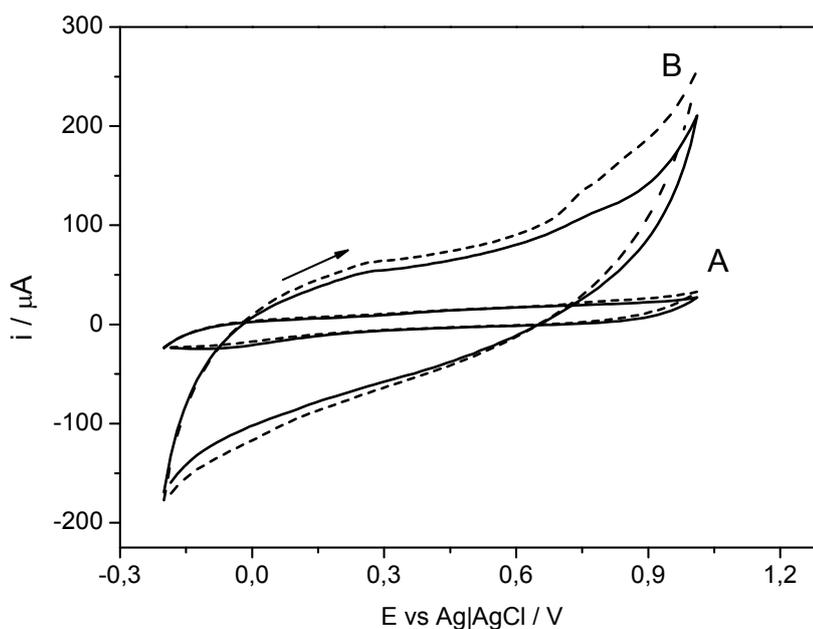
Complexos analisados
Ftalocianinacobalto (II)
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro 29-H, 31-H-ftalocianinacobre (II)
<i>Bis</i> (piridil)ftalocianinaferrosa
Ftalocianinacloradaférrica
5,10,15,20-tetraquismetoxifenilporfirinacobalto (II)
5,10,15,20-tetraquispentafluorofenilporfirinaferro (III)
Protoporfirina IX
Hemina
1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro- 29H,31H – ftalocianinacobalto (II)
5,9,14,15,18,23,27,32,36-octabutoxi-2,3- naftalocianinaniquel (II)

Para todas as análises com os diferentes complexos de ftalocianinas e porfirinas, 10,00 mL de solução tampão (eletrólito) foram adicionados na cela eletroquímica e a seguir, um volume conhecido de uma solução padrão de BMT era adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos, a varredura do potencial foi realizada a partir de -1 V até +1 V. Após a adição do analito na célula eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador por cerca de 10 segundos e obtinha-se a leitura da corrente pelo potenciostato. Entretanto, dos dez complexos

avaliados, um sinal analítico considerável somente foi obtido para a pasta de carbono modificada com ftalocianinacobre(II) [CuPc].

A Figura 10 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos realizados na ausência do modificador, e (B) apresenta os voltamogramas cíclicos na presença do complexo de [CuPc]. Observa-se que na presença da modificação da pasta com o complexo houve um aumento da condutividade do sistema, quando comparado com a pasta sem modificar. E principalmente, após a adição da BMT, há uma acentuada variação da corrente anódica a partir de 700 mV vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), caracterizando a oxidação eletroquímica da bumetanida na superfície do sensor.

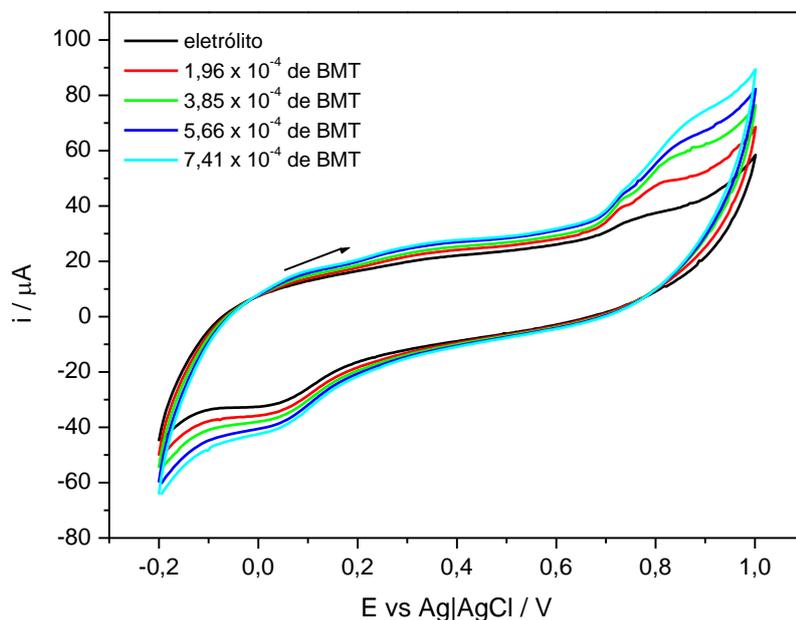
Figura 10. Voltamogramas cíclicos para (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 15 % (m/m) [CuPc] com (---) $4,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de bumetanida. Medidas realizadas usando apenas o eletrólito suporte (—).



Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente anódica, que permitisse quantificar a bumetanida, a Figura 11 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de analito.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [CuPc] em diferentes concentrações de bumetanida. Branco: solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora.

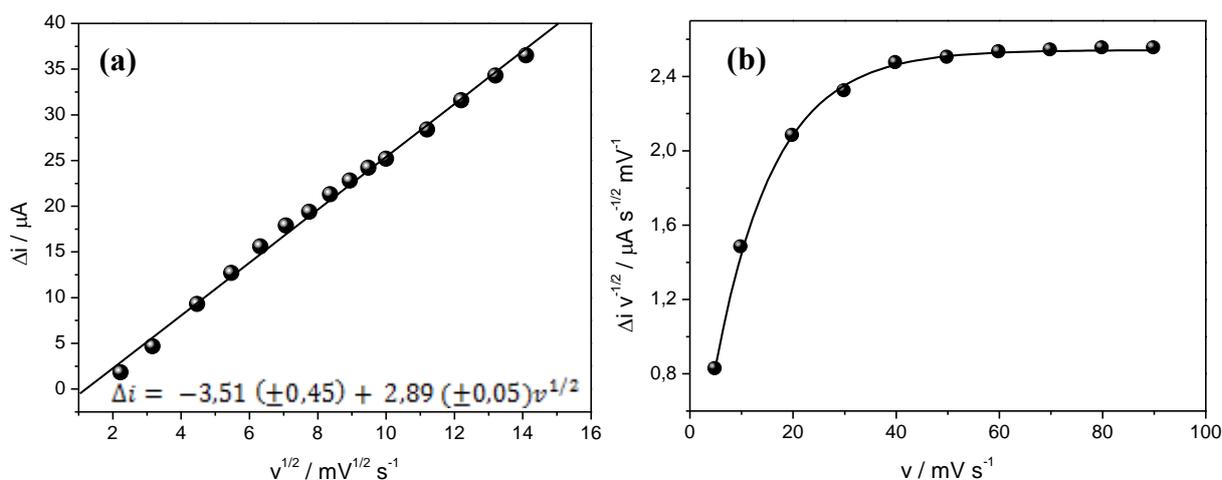
Conforme observado na Figura 11, verifica-se que há uma relação crescente entre a corrente anódica e a concentração de BMT, o que viabiliza o uso deste sensor à base de CuPc para análise quantitativa deste analito. Adicionalmente, visando avaliar a influência de nanotubos de carbono para melhor a sensibilidade do sensor proposto, foram realizados estudos do efeito do uso de nanotubos de carbono funcionalizados, obteve-se um aumento de corrente gerado pela maior área superficial do nanotubo de carbono, entretanto, ao fazer as adições sucessivas do analito, observou-se que não houve uma mudança significativa na variação de corrente quando comparada a pasta modificada apenas com o complexo. Dessa forma, neste trabalho o uso dos nanotubos de carbono não contribuiu para melhorar a sensibilidade do sensor proposto, uma justificativa para tal fato seria a excessiva quantidade de óleo mineral (Nujol®) necessária para obtenção da pasta, tornando o material mais resistivo, impedindo a melhora da corrente anódica referente à oxidação da bumetanida na superfície do eletrodo.

Na sequência, foram registrados voltamogramas cíclicos com o sensor para bumetanida em diferentes velocidades de varredura a 5 a 200 mV s⁻¹ com a finalidade de verificar quais processos ocorrem na superfície do sensor. A partir desses

experimentos, foi possível obter informações que mostram a existência de uma dependência linear entre a corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura em toda a faixa estudada (5 a 200 mV s^{-1}) indicando que a oxidação da bumetanida na superfície do sensor, tal como esperado, é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo¹⁰⁷ (Figura 12a).

Segundo BARD⁷⁶, quando plotado o gráfico da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($\Delta i_{pa} / v^{1/2}$) vs v (Figura 12b) o perfil obtido sugere que o processo de oxidação de bumetanida é electrocatalítico do tipo CE (*chemical/electrochemical*), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada a um processo eletroquímico.

Figura 12. (a) Variação da corrente de pico catódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de cobre e na presença de bumetanida. (b) Variação da corrente de pico anódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão B. R. 0,15 mol L^{-1} (pH 7,0) concentração de bumetanida de $4,76 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} .



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, com base nos resultados obtidos, foi possível propor um mecanismo para o sensor biomimético. Inicialmente, há reação química (etapa química) entre a bumetanida e a molécula de reduzida de [CuPc], promovendo a oxidação de bumetanida e redução de cobre na ftalocianina. Na etapa eletroquímica acoplada à química, a oxidação do metal (Cu^+ para Cu^{2+}) na ftalocianina sobre a superfície do eletrodo leva à

obtenção da corrente observada em função da presença de bumetanida na cela de medida. A Figura 13 apresenta o mecanismo proposto de forma esquemática.

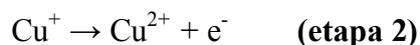
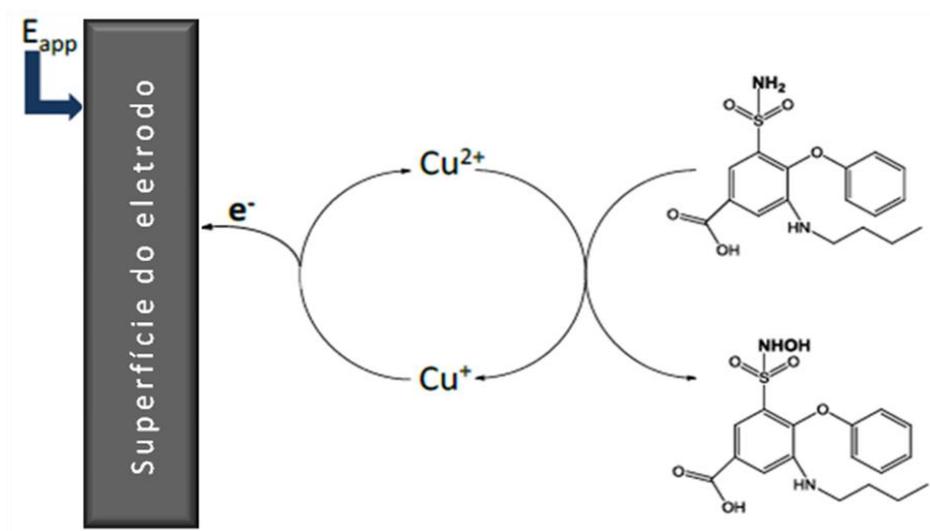


Figura 13. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.



Fonte: Elaborada pela autora.

V. 2.2. Estudo e otimização das condições experimentais

Neste trabalho o planejamento de experimentos foi aplicado com o objetivo de encontrar a melhor condição experimental, na qual um valor máximo para a intensidade de corrente pode ser obtido, ou seja, para obter uma melhor sensibilidade analítica.

A otimização das condições experimentais para a metodologia proposta foi feita utilizando o planejamento fatorial e o planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta, empregando a voltametria de onda quadrada (VOQ). Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas Minitab versão 16 e o Statistica versão 6.0.

V. 2.2.1. Planejamento Fatorial de Experimentos

Inicialmente uma triagem das variáveis que afetam a metodologia foi realizada utilizando um planejamento fatorial fracionário $2^{(7-3)}$, o qual foi realizado em triplicata e as variáveis relacionadas à preparação do sensor (% de modificador); obtenção de sinal analítico (tipo de solução tampão, concentração da solução tampão, pH); e parâmetros eletroquímicos da voltametria de onda quadrada (amplitude de pulso, frequência da aplicação de potencial e incremento de potencial) foram estudadas em dois níveis [baixo (-1) e alto (+1)], conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis usadas no planejamento fatorial fracionário e os respectivos níveis estudados.

Variáveis	Nível	
	-1	+1
Modificador / % m/m	15	30
Tipo do tampão	Fosfato	B.R.
[Tampão] / mol L ⁻¹	0,05	0,15
pH	6	8
Amplitude (ΔE_p) / V	0,05	0,1
Frequência (f) / Hz	30	50
Incremento (ΔE_s) / V	0,005	0,01

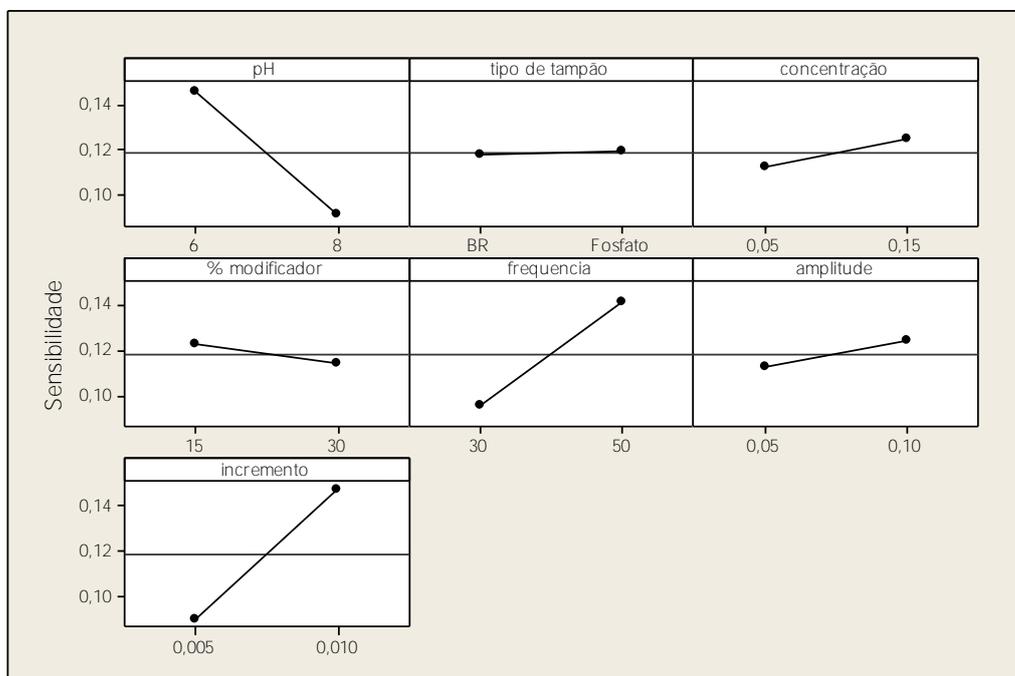
De acordo com as variáveis e os valores dos níveis escolhidos, o programa estatístico gera uma matriz de experimentos com as possíveis combinações dessas variáveis. Após realizado todos os experimentos, é possível obter a resposta em função dos valores de variação de corrente, possibilitando construir curvas analíticas e obter então, valores de sensibilidade para cada experimento executado. Na Tabela 3, encontram-se a matriz de experimentos e o valor de sensibilidade para cada ensaio.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial completo $2^{(7-3)}$ com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva. Número de replicatas = 3.

Ensaio	Parâmetros de análise			Preparação do sensor	Parâmetros Eletroquímicos			Sensibilidade
	pH	Tipo de tampão	[Tampão]	% modificador	f	ΔE_p	ΔE_s	
1	6	B.R.	0,05	15	30	0,05	0,005	0,111
2	8	B.R.	0,05	15	50	0,05	0,01	0,115
3	6	Fosfato	0,05	15	50	0,1	0,005	0,154
4	8	Fosfato	0,05	15	30	0,1	0,01	0,112
5	6	B.R.	0,15	15	50	0,1	0,01	0,232
6	8	B.R.	0,15	15	30	0,1	0,005	0,046
7	6	Fosfato	0,15	15	30	0,05	0,01	0,135
8	8	Fosfato	0,15	15	50	0,05	0,005	0,079
9	6	B.R.	0,05	30	30	0,1	0,01	0,133
10	8	B.R.	0,05	30	50	0,1	0,005	0,06
11	6	Fosfato	0,05	30	50	0,05	0,01	0,175
12	8	Fosfato	0,05	30	30	0,05	0,005	0,041
13	6	B.R.	0,15	30	50	0,05	0,005	0,142
14	8	B.R.	0,15	30	30	0,05	0,01	0,102
15	6	Fosfato	0,15	30	30	0,1	0,005	0,087
16	8	Fosfato	0,15	30	50	0,1	0,01	0,173

Após obter os resultados das sensibilidades, o programa gerou diversos gráficos, dentre os quais, foi possível avaliar a influência de cada variável na metodologia desenvolvida, que pode ser observada na Figura 14.

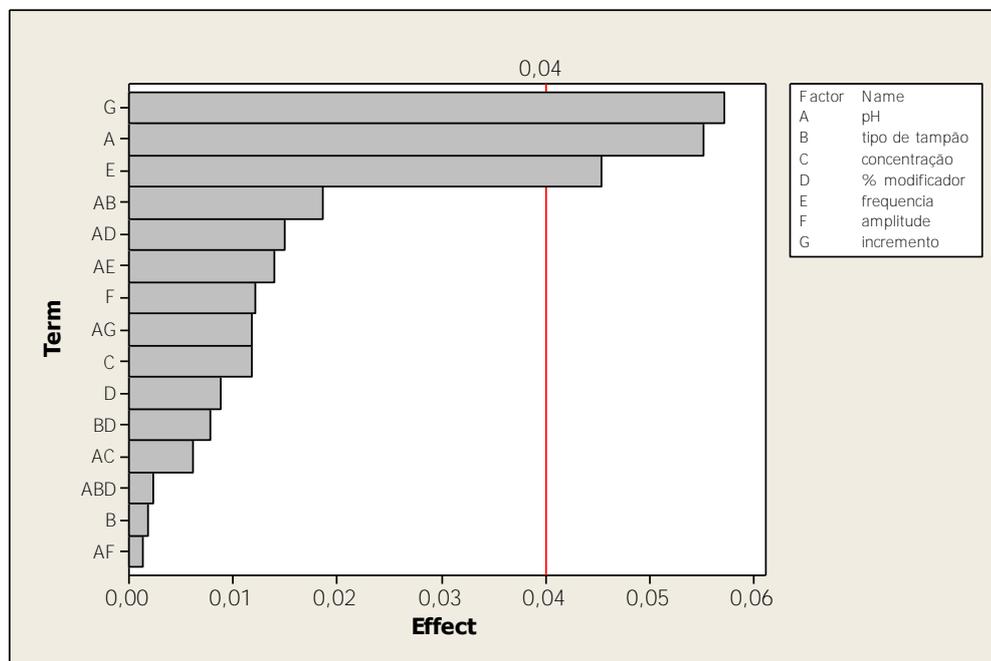
Figura 14. Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de corrente obtido.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao analisar a Figura 14, verificam-se quais são as variáveis que estão influenciando significativamente na obtenção da corrente. Observa-se que as variáveis incremento de potencial (ΔE_s), pH e frequência (f) são as mais relevantes na obtenção do sinal analítico, sendo que para obtenção de um maior sinal, deve-se diminuir o pH e aumentar a frequência e o incremento. Entretanto, para as outras variáveis em questão, os valores tanto no nível (-1) quanto no nível (+1) estão bem próximas, não alterando muito a sensibilidade da metodologia, concluindo-se então que essas variáveis não são significativas para o sistema. Essas significâncias também podem ser observadas no gráfico de pareto, apresentado na Figura 15.

Figura 15. Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.



Fonte: Elaborada pela autora.

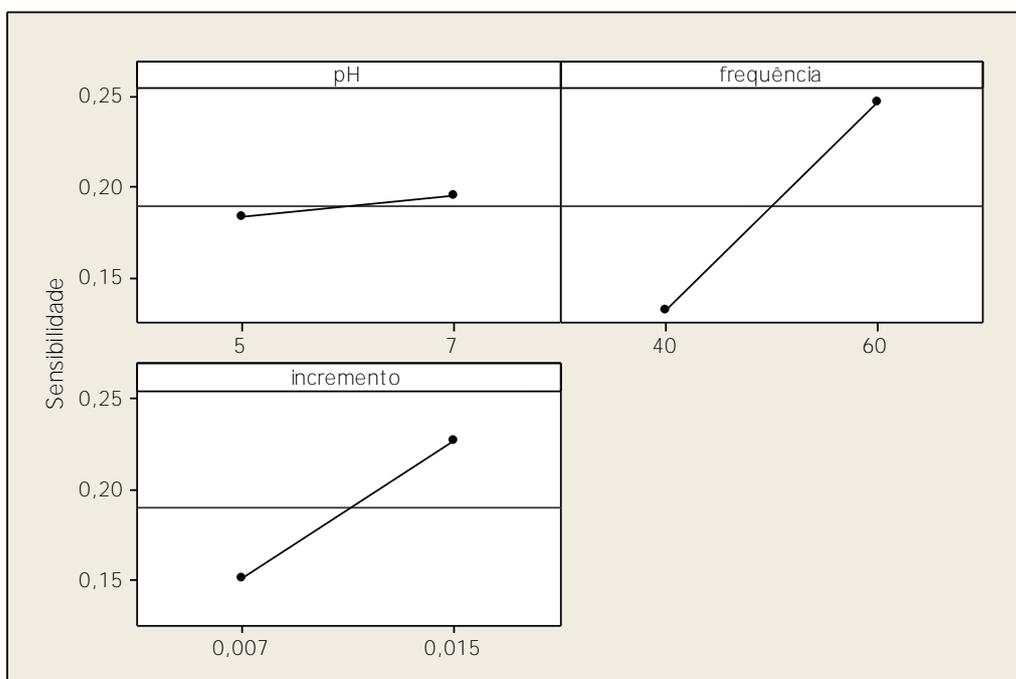
A partir destes resultados, fixaram-se os valores das variáveis menos significativas: concentração da solução tampão $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, quantidade do modificador $15\% \text{ (m/m)}$, amplitude de pulso $0,1 \text{ V}$ e tipo de tampão B.R. Com as três outras variáveis, iniciou-se o estudo de seus efeitos pelo planejamento fatorial completo 2^3 . Na Tabela 4, estão apresentados tanto a matriz dos experimentos e seus respectivos valores de sensibilidades obtidos durante a execução dos mesmos.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial completa 2^3 com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.

Ensaio	pH	F	ΔE_s	Sensibilidade
1	5	40	0,007	0,086
2	7	40	0,007	0,200
3	5	60	0,007	0,150
4	7	60	0,007	0,170
5	5	40	0,015	0,118
6	7	40	0,015	0,123
7	5	60	0,015	0,380
8	7	60	0,015	0,290

Analisando a Figura 16, verifica-se que a variável pH não está influenciando significativamente na obtenção da sensibilidade. Observa-se também, que as variáveis, incremento e frequência estão sendo mais relevantes na obtenção do sinal analítico, e que para obtenção de um maior sinal, deve-se aumentar tanto o valor da frequência quanto do incremento.

Figura 16. Efeitos principais das variáveis estudadas no valor da sensibilidade do sensor.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir destes resultados, fixou-se o valor do pH em 7 e com as duas outras variáveis, iniciou-se o estudo de seus efeitos pelo planejamento de composto central visando à obtenção da superfície de resposta.

V. 2.2.2. Planejamento Composto Central

Para a realização deste planejamento foram feitas combinações dos cinco níveis de cada uma das variáveis estudadas (frequência e incremento), totalizando-se treze ensaios, os quais são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz de ensaios utilizados no planejamento composto central com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.

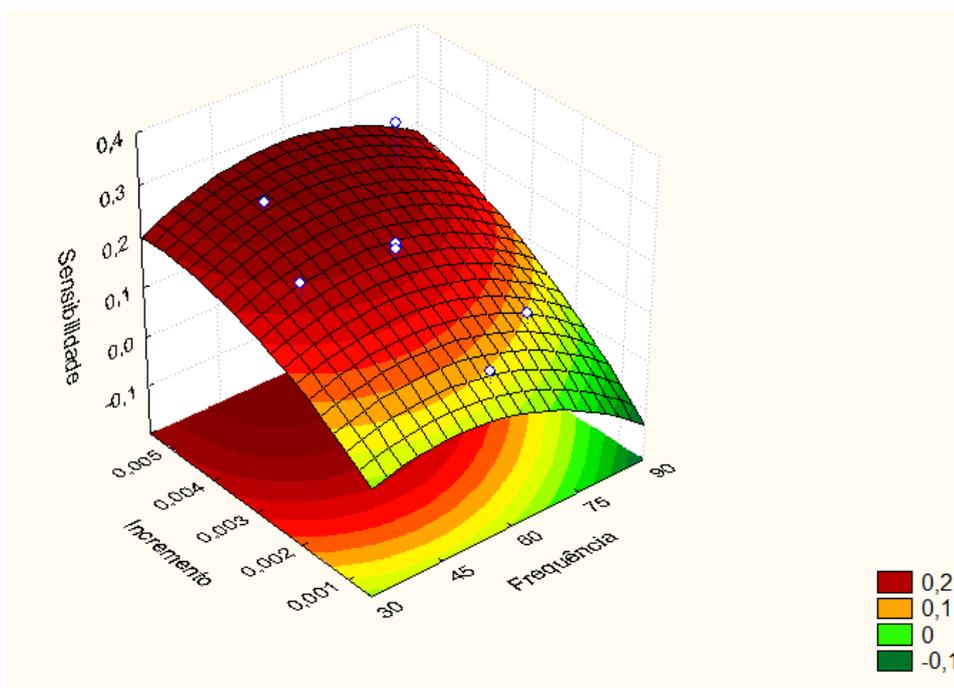
Ensaio	<i>F</i>	ΔE	Sensibilidade
1	46	0,0016	0,085
2	74	0,0016	0,101
3	46	0,0044	0,266
4	74	0,0044	0,316
5	40	0,003	0,213
6	80	0,003	0,060
7	60	0,001	0,080
8	60	0,005	0,200
9	60	0,003	0,207
10	60	0,003	0,210
11	60	0,003	0,171
12	60	0,003	0,210
13	60	0,003	0,200

Fonte: Elaborada pela autora.

Realizados os ensaios do planejamento composto central, os resultados foram analisados usando o programa Statistica[®] versão 6.0. As técnicas matemáticas e

estatísticas existentes podem ser aplicadas à exploração de informações para obtenção de dados analíticos importantes. O planejamento composto central, pode se apresentar como um modelo matemático quadrático, permitindo avaliar criticamente a condição ótima para a realização dos experimentos ao obter o gráfico de superfície de resposta.

Figura 17. Gráfico de superfície de resposta obtida a partir dos experimentos mostrados na Tabela 5.



Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico da superfície de resposta (Figura 17) referente aos dados da Tabela 5 mostra que a sua região central (cor vermelho-escuro) apresenta o sinal analítico de melhor resposta, ou seja, o valor máximo de sensibilidade encontrado para as condições em que as variáveis foram estudadas. Esta região é considerada ótima porque, considerando os fatores estudados no planejamento, apresentou um maior sinal de corrente, o que permite uma maior sensibilidade do método uma vez que, quanto maior o sinal, mais vezes o analito pode ser diluído e conseqüentemente, menores concentrações deste podem ser quantificadas.

O modelo (valor de $p < 0,0005$), em termos de fatores escalonados é dado por:

$$z = 0,200 (\pm 0,165) - 0,019x (\pm 0,131) + 0,071x^2 (\pm 0,131) - 0,018y (\pm 0,140) - 0,016y^2 (\pm 0,140) + 0,008xy (\pm 0,185). \quad (\text{equação 1})$$

em que z é o fator de resposta correspondente ao valor de sensibilidade, x é a frequência, e y é o *step* de potencial (incremento). O modelo de regressão quadrática não se aplicou neste caso, pois apenas o b_0 foi significativo em relação aos intervalos de confiança. As respostas do modelo, os valores de R^2 foram superiores 95%, o que implica que o modelo foi bem ajustado pelos dados no nível de confiança de 95% para a resposta de sensibilidade.

Depois de realizada toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta, determinou-se as melhores condições experimentais para a metodologia proposta e as mesmas podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições otimizadas do método para determinação de Bumetanida.

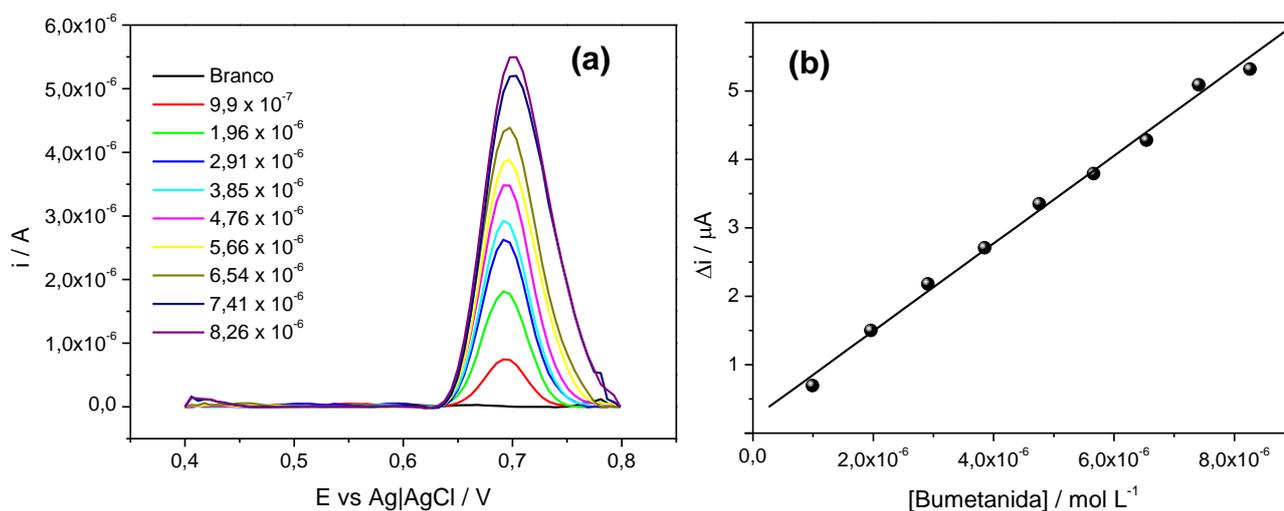
Variáveis	Valores ótimos
Modificador / % m/m	15
pH	7,0
[Tampão] / (mol L ⁻¹)	0,15
Tipo de tampão	BR
Amplitude / V	0,1
Frequência / Hz	60
Incremento / V	0,006

V. 2.3. Características analíticas do sensor

Sob as condições otimizadas usando a calibração multivariada, o sensor apresentou um perfil voltamétrico da onda quadrada tal como mostrado na Figura 18a, possibilitando a construção da curva analítica (Figura 18b), na qual a variação de

corrente é medida após cada adição do analito em relação ao branco no potencial de pico de 0,7 V.

Figura 18. (a) Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Voltamograma de onda quadrada típico obtido para adições sucessivas de bumetanida. (b) Curva analítica construída com os resultados obtidos na voltametria de onda quadrada.



Fonte: Elaborada pela autora.

A curva analítica foi construída a partir de soluções padrão de bumetanida na faixa linear de concentração de $9,9 \times 10^{-7} - 8,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Uma relação linear ($r = 0,996$) foi obtida pela representação gráfica de Δi versus concentração de bumetanida (mol L^{-1}). A equação da reta que representa os dados da Figura 18b é mostrada na equação 2.

$$\Delta i / \mu\text{A} = 0,2122 (\pm 0,1087) + 640120 (\pm 20678) [\text{BMT}] \text{ (equação 2)}$$

Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo os parâmetros estabelecidos pela ANVISA¹⁰⁸ obtendo os valores de $2,7 \times 10^{-7}$ e $9,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente para o LOD e o LOQ.

Para a verificação da repetibilidade da curva analítica, foram realizados outros experimentos no mesmo dia e em dias diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dia), coeficientes de variação obtidos foram de 2,7% e 3,5%, respectivamente. Os resultados

apresentados mostraram que as medidas são precisas e satisfatórias por apresentarem bons desvios e um bom coeficiente para a curva analítica. Adicionalmente, foi determinado experimentalmente também o tempo de vida do sensor proposto. Na Tabela 7 são mostradas todas as características analíticas apresentadas por este sensor na quantificação de bumetanida.

Tabela 7. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de bumetanida.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear (mol L ⁻¹)	9,9 x 10 ⁻⁷ – 8,3 x 10 ⁻⁶
Sensibilidade (µA L mol ⁻¹)	640120
Coeficiente de Correlação (n=10)	0,996
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	2,7 x 10 ⁻⁷
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	9,0 x 10 ⁻⁷
Repetibilidade intra-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	2,7%
Repetibilidade inter-dia (RSD, n=5 sensibilidades de curvas analíticas)	3,5%
Tempo de vida mantendo 95% sinal inicial	5 dias (105 análises)

V. 2.4. Estudo de seletividade/interferência

Para realizar este estudo, a resposta de voltametria de onda quadrada do sensor foi avaliada para 14 fármacos com diversas estruturas e classificações, cujas concentrações estavam 10 vezes maiores do que a concentração de bumetanida. Dentre todos os fármacos analisados (Tabela 8), apenas a hidroclorotiazida, uma substância também pertencente à classe dos diuréticos, apresentou uma resposta interferente.

Tabela 8. Fármacos analisados no estudo da seletividade com o sensor proposto.

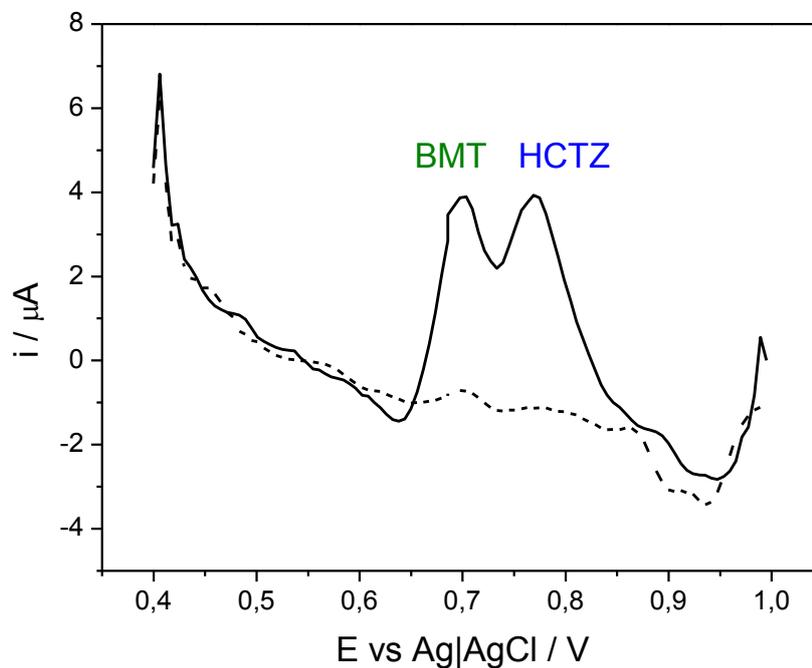
Fármacos	Sinal analítico
Furosemida	n.d
Hidroclorotiazida	SIM
Captopril	n.d
Metildopa	n.d
Ciprofloxacina	n.d
Cetoprofeno	n.d
Aminofilina	n.d
Nefidipina	n.d
Dipiriona	n.d
Paracetamol	n.d
Diclofenaco	n.d
Cloridrato de efedrina	n.d
Ácido Ascórbico	n.d
Uréia	n.d

n.d = não detectado

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 19 é possível verificar essa interferência, pois os picos do voltamograma de onda quadrada deveriam estar separados. Apesar dessa interferência, ainda é possível fazer uma análise qualitativa da bumetanida na presença da hidroclorotiazida, devido à diferença dos potenciais dos picos.

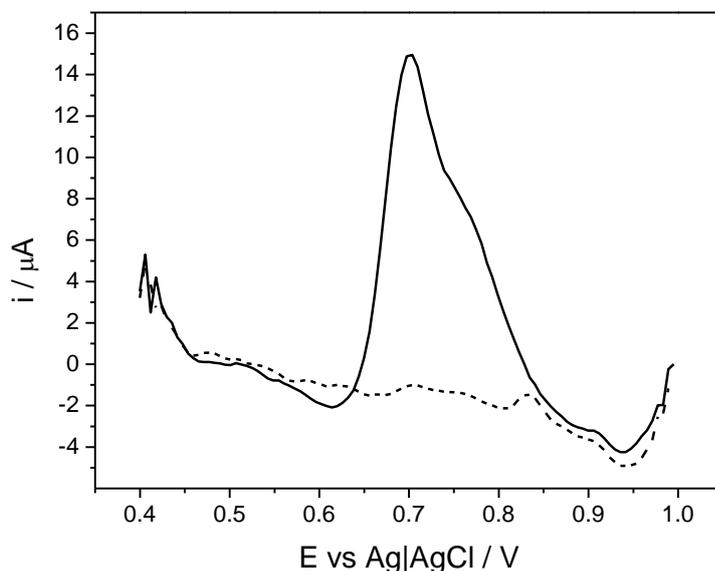
Figura 19. Voltamograma de onda quadrada obtido (—) com adição de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroclorotiazida (HCTZ) e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de bumetanida (BMT) nas condições otimizadas. Medidas realizadas usando o eletrólito suporte (-----).



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 20, é possível verificar uma pequena interferência da hidroclorotiazida na determinação de bumetanida, na proporção de 1:1. Observa-se que em concentrações menores, a hidroclorotiazida é menos sensível na voltametria de onda quadrada do que a bumetanida, não havendo a formação de um pico bem definido.

Figura 20. Voltamograma de onda quadrada obtido (—) com adição de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroclorotiazida (HCTZ) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de bumetanida nas condições otimizadas. Medidas realizadas usando o eletrólito suporte (- - - - -).



Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, sabe-se que os dois diuréticos não serão encontrados na mesma amostra de urina e que os potenciais de oxidação são diferentes para cada diurético, permitindo a identificação dos mesmos. Desta forma, estes resultados sugerem que o sensor à base de ftalocianinacobre (II) é seletivo para bumetanida em relação a outros 13 fármacos, e um pouco menos seletivo em relação à HCTZ, entretanto é possível identificá-la presente em uma amostra complexa, de acordo com a Figura 20. Essa boa seletividade do sensor já era esperada para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático.

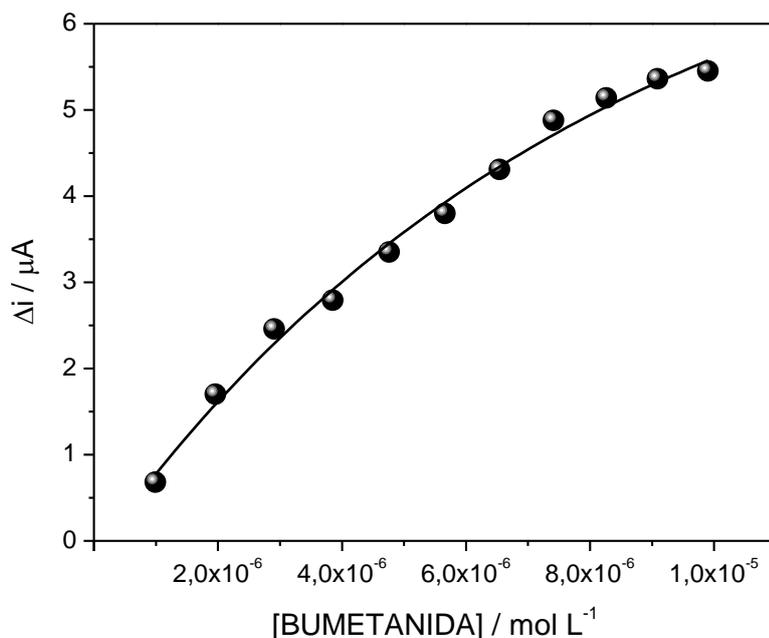
Outra proposta de eliminar essa pequena interferência causada pelo diurético hidroclorotiazida é utilizar os polímeros molecularmente impressos (MIPs) (abordados no capítulo VII) para a realização de extração em fase sólida.

V. 2.5. Verificação do caráter biomimético do sensor

O caráter biomimético do sensor proposto foi avaliado considerando que este sensor deveria apresentar características similares a de um biossensor enzimático. O perfil hiperbólico (Figura 21) que é característico de sistemas enzimáticos foi obtido a

partir de um sinal de corrente que aumenta linearmente com a concentração do substrato (BMT), até um dado valor, onde a partir dessa concentração o sinal de corrente alcança um valor máximo¹⁰⁹.

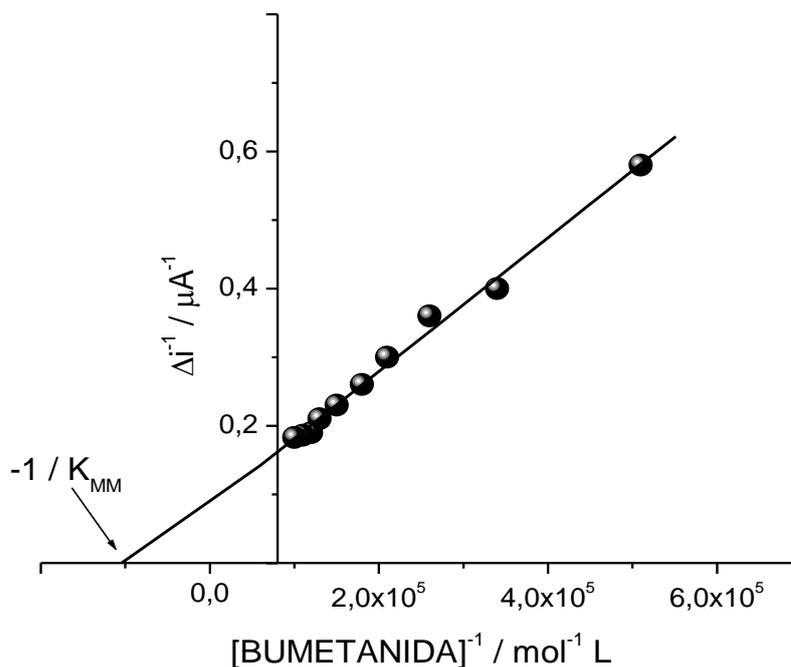
Figura 21. Perfil hiperbólico do sensor à base de ftalocianinacobre (II).



Fonte: Elaborada pela autora.

Do perfil hiperbólico pode ser obtido o gráfico de *Lineweaver-Burk* ou gráfico do duplo recíproco (Figura 22), do qual se pode determinar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}). O valor encontrado foi de $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, cujo valor indica um bom grau de afinidade entre o complexo ftalocianinacobre (II) e o analito. Sendo esse valor obtido para K_{MM}^{app} característico de biossensores enzimáticos e sensores biomiméticos^{110,111}.

Figura 22. Gráfico do duplo recíproco.



Fonte: Elaborada pela autora.

V. 2.6. Aplicação do sensor biomimético em amostras reais

Determinados os parâmetros de otimização, as características analíticas e os estudos eletroquímicos, aplicou-se o método desenvolvido em formulações comerciais de medicamentos e urina. Com o objetivo de avaliar efeitos de matriz foram realizados testes de adição de padrão. Foram construídos gráficos de Δi vs. [BMT] padrão adicionado, sendo a concentração de bumetanida na amostra diluída analisada pela extrapolação da curva, na interseção com o eixo das abscissas no lado negativo. O resultado é expresso em $mol L^{-1}$.

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos na determinação de bumetanida pelo sensor biomimético proposto, as amostras foram analisadas por um método baseado em cromatografia líquida de alta eficiência¹¹². Na Tabela 9 e 10 estão apresentados os resultados obtidos na análise dos medicamentos e urina, respectivamente, pelo sensor proposto e pelo método comparativo de análise.

Tabela 9. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas.

Amostra ^a	Método Proposto		Valor de Referência ¹¹²
	[BMT] x 10 ⁻⁴ (mol L ⁻¹)		
	Valor encontrado ^b	Valor encontrado ^b	Teste-t ^c
A (comercial)	0,96 ± 0,03	1,0020 ± 0,0002	2,54
B (manipulado)	0,96 ± 0,03	1,01400 ± 0,0001	3,29
C (manipulado)	0,99 ± 0,02	1,0320 ± 0,0002	3,10

^aValor declarado: 1mg de bumetanida / comprimido

^bDesvio padrão de três replicatas.

^cValores críticos de t ao nível de confiança de 95%, $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. Valores obtidos considerando o valor fornecido pelo método comparativo como o verdadeiro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10. Recuperação de bumetanida adicionada em amostras de urina.

Amostra ^a	Método Proposto		Valor de Referência ¹¹²		
	[BMT] x 10 ⁻⁴ (mol L ⁻¹)				
	Valor Encontrado ^b	Recuperação (%)	Valor Encontrado ^b	Recuperação (%)	Teste-t ^c
A	0,961 ± 0,023	96	1,00300 ± 0,00001	100	3,16
B	0,962 ± 0,026	96	1,00200 ± 0,00001	100	2,66
C	0,952 ± 0,031	95	1,0290 ± 0,0002	103	4,30
D	0,963 ± 0,035	96	1,01500 ± 0,00006	101	2,57
E	0,950 ± 0,035	95	1,00900 ± 0,00011	101	2,92
F	0,971 ± 0,040	97	1,0490 ± 0,0002	105	3,56

^aValor adicionado: 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

^bDesvio padrão de três replicatas.

^cValores críticos de t ao nível de confiança de 95%, $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. Valores obtidos considerando o valor fornecido pelo método comparativo como o verdadeiro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para todas as amostras analisadas, os resultados obtidos pelo método comparativo e pelo método proposto foram comparados aplicando-se teste t, com nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de t calculados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa entre os métodos com relação à precisão e exatidão.

V.2.7. Conclusões

O método proposto demonstrou ser uma interessante alternativa aos outros procedimentos existentes para a análise de bumetanida. O complexo ftalocianinacobre (II) utilizado mostrou ter maior sensibilidade ao analito do que sensor à base de pasta de carbono sem modificação, aumentando a transferência eletrônica, conseqüentemente a sensibilidade da metodologia. Os resultados do planejamento fatorial de experimentos indicaram que frequência e incremento (step de potencial) foram os fatores mais importantes para a determinação do diurético na metodologia, influenciando significativamente na resposta da corrente.

Estudos baseados na voltametria cíclica, assim como da seletividade e perfil de resposta voltamétrica, evidenciaram o comportamento biomimético do complexo na eletrooxidação catalítica do diurético. Além de apresentar boa estabilidade, possibilitando um maior número de análises.

Este método foi aplicado com sucesso na análise de bumetanida em amostras de urinas e de comprimidos de diferentes marcas comerciais. Comparando o método proposto com os outros métodos descritos, este método oferece vantagens relacionadas à simplicidade, rapidez e baixo consumo de reagentes, sendo apropriado para detecção, quantificação e monitoramento de BMT em diversos tipos de matrizes.

**CAPÍTULO VI. SENSOR ELETROQUÍMICO
BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROCLOROTIAZIDA EM URINA E EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.**

VI.1. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1.1. Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab® PGSTAT30 (Autolab/Eco Chemie) conectado ao software GPES versão 4.9, usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl, uma espiral de platina como eletrodo auxiliar e o(s) eletrodo(s) de pasta de carbono modificado(s) como eletrodo(s) de trabalho, conforme apresentado no capítulo V, seção V.1.1.

O método comparativo para validação da metodologia desenvolvida foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu, o qual possui os seguintes componentes: detector UV-Vis modelo SPD-20A, autosampler modelo SIL-20A, bomba modelo LC-20AT e interface modelo SPD-20A. O método para as corridas cromatográficas utilizou uma coluna cromatográfica C18 da marca Phenomenex® LUNA (250 X 4,60 mm e 5 µm de tamanho da partícula), um fluxo de 1 mL min⁻¹, comprimento de onda de 220 nm, volume de injeção de 10 µL, a fase móvel foi uma mistura de metanol e 2,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 8,0 e água. O LcSolution como *software* para tratamento dos dados.

Para o preparo das soluções padrão e amostras foram necessários à utilização de diferentes instrumentos, tais como, uma balança analítica METTLER TOLEDO – modelo AG245, micropipeta de 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL (marca Eppendorf) e um aparelho de banho ultrassônico da marca Unique® - modelo USC-2500 contendo um aquecimento ajustável de temperatura e um temporizador digital de 0 a 60 minutos foi utilizado para auxiliar na dissolução de amostras.

VI.1.2. Reagentes e solventes

A hidroclorotiazida utilizada neste trabalho assim como todos os complexos metálicos estudados e avaliados como possíveis catalisadores das enzimas P450, o óleo mineral e grafite foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O sal de dihidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄) e o ácido clorídrico (HCl) utilizados na preparação da solução tampão foram da Synth®.

Os solventes utilizados no método para a determinação da hidroclorotiazida, tanto no método proposto quanto no método comparativo, foram etanol (grau p.a.) da Synth[®] e metanol (grau CLAE da J.T. Baker). Os fármacos utilizados nos estudos de interferências foram de grau farmacêutico.

VI.1.3. Preparo das soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3) e foram preparadas no momento do uso.

a) Solução de trabalho de hidroclorotiazida: A solução estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 75 mg de HCTZ com 25,0 mL de etanol. A solução padrão foi preparada a partir da diluição adequada da solução estoque com H₂O deionizada e utilizada na construção da curva analítica.

b) Solução tampão: A solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado a partir da pesagem de 8,7 g de K₂HPO₄, solubilizadas em água deionizada, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. O valor do pH foi ajustado pela adição de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

c) Solução dos interferentes: Os 12 fármacos, além do ácido ascórbico e uréia foram avaliados como possíveis interferentes e suas respectivas soluções foram preparadas de forma que todos ficassem com concentração molar 10 vezes maior que o analito em estudo. Portanto, uma massa adequada de cada interferente foi pesada e solubilizada em diferentes solventes de acordo com a solubilidade de cada um, assim a concentração de cada interferente foi de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

VI. 1.4. Preparo das Amostras

A determinação de hidroclorotiazida foi realizada em amostra de urina proveniente de dos mesmos doadores de urina para análise de bumetanida apresentados

na seção V.1.4. As amostras foram rotuladas e enriquecidas separadamente com solução padrão de hidrocortisona.

As quatro amostras comerciais das formulações farmacêuticas (comprimidos) foram obtidas de farmácia convencional e de farmácia de manipulação localizadas na cidade de Araraquara/SP e foram analisadas dentro dos seus prazos de validade. O conteúdo do princípio ativo declarado no rótulo de cada comprimido é de 50 mg por comprimido.

Os medicamentos foram macerados (apenas os comprimidos) e pesados. Foram utilizados 20 comprimidos e a preparação das soluções se deu a partir de cálculos de massa referente aos fármacos do estudo presente nos comprimidos em relação a sua massa total. Depois de preparada uma concentração conhecida do fármaco, filtrou-se essa solução para a retirada de substâncias insolúveis.

VI. 1.5. Construção do sensor biomimético de pasta de carbono modificada

Inicialmente, foram testados vários complexos metálicos que poderiam atuar como possíveis catalisadores biomiméticos da enzima P450, diversos compostos de ftalocianinas e porfirinas com diferentes centros metálicos, assim como foi feito para o sensor biomimético para bumetanida. Entretanto, o complexo que apresentou maior ganho de sinal em relação aos outros compostos e em relação à pasta de carbono sem modificar foi o complexo cloro protoporfirina IX de ferro (III) (hemina).

O preparo da pasta de carbono para determinação de HCTZ foi realizada misturando 86 mg de pó de grafite, 14 mg do complexo metálico hemina e 1,00 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e, a seguir, deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se cerca 60 µL do agente aglutinante (óleo mineral - Nujol[®]) para a obtenção da pasta de carbono, a qual depois de usada era armazenada a seco. O fluxograma ilustrativo das etapas de preparação da pasta de carbono modificada já foi apresentado na seção V.1.5.

A pasta de carbono modificada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro (0,126 cm²) e colocado à profundidade

de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo. Finalmente a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo, a fim de obter uma superfície homogênea.

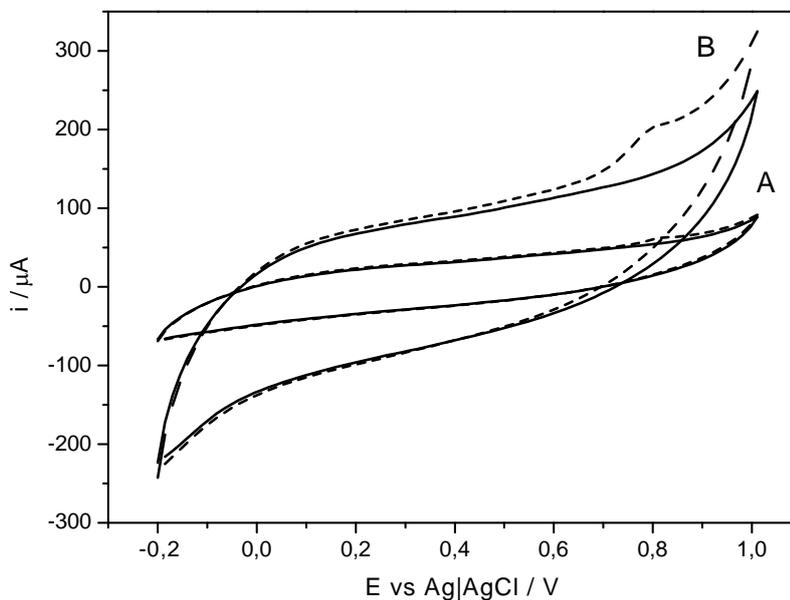
VI. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI. 2.1. Caracterização eletroquímica do sensor

Testes preliminares foram realizados utilizando a voltametria cíclica, no qual diversos complexos foram estudados no intuito de investigar qual deles apresentaria uma resposta analítica quantitativa e promissora na detecção da hidroclorotiazida. Em todas as análises, 10,00 mL de solução tampão (eletrólito) foram adicionados na cela eletroquímica e, a seguir, um volume conhecido de uma solução padrão de HCTZ foi adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos. Após a adição do analito na célula eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética acionada por um agitador por cerca de 10 segundos e obtinha-se a leitura da corrente pelo potenciostato. Entretanto, dos nove complexos avaliados, um sinal analítico mais promissor foi obtido para a pasta de carbono modificada com a hemina.

Na Figura 23, (A) apresenta os voltamogramas cíclicos realizados na ausência do modificador, e (B) apresenta os voltamogramas cíclicos na presença da hemina. Observa-se que na presença da modificação da pasta com o complexo houve um aumento da condutividade do sistema, quando comparado com a pasta sem modificar. E principalmente, após a adição da HCTZ, há uma acentuada variação da corrente anódica a partir de 800 mV vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), caracterizando a oxidação eletroquímica da hidroclorotiazida na superfície do sensor.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos para (A) Eletrodo de pasta de carbono sem modificar e (B) Sensor à base de pasta de carbono modificada com 14 % (m/m) [hemina] com (----) $1,96 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroclorotiazida. Medidas realizadas usando como eletrólito suporte (—) uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.



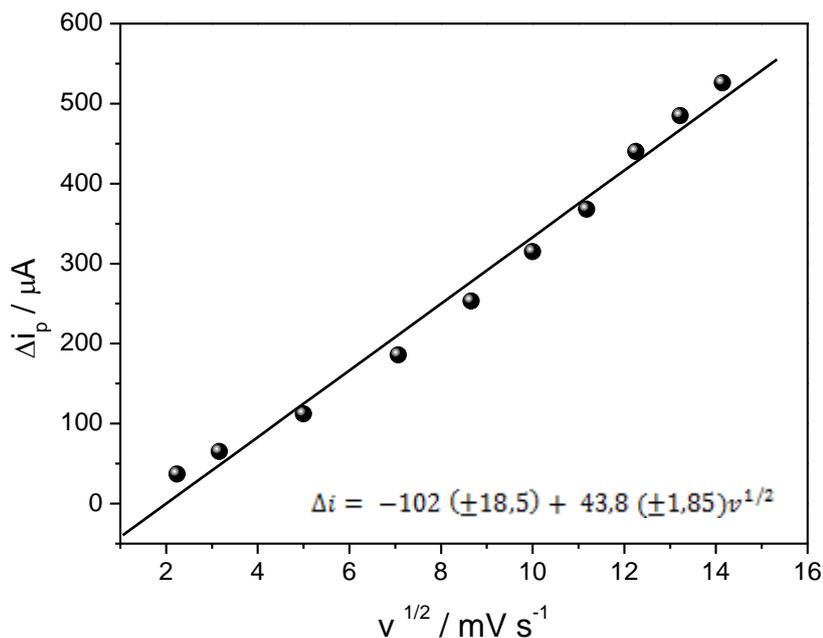
Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente anódica, que permitisse quantificar a hidroclorotiazida, realizaram-se medidas de voltametria cíclica em diferentes concentrações de analito. Podendo ser observado uma relação crescente entre a corrente anódica e a concentração de HCTZ, o que permite o uso deste sensor à base de hemina para determinação quantitativa deste analito. Em seguida, avaliou-se a possibilidade de usar os nanotubos de carbono juntamente com a pasta modificada, mas assim como no sensor desenvolvido para determinar a bumetanida, não houve um ganho significativo na variação de corrente quando comparada a pasta modificada apenas com o complexo.

Em continuidade aos estudos eletroquímicos, foram registrados voltamogramas cíclicos com o sensor para hidroclorotiazida em diferentes velocidades de varredura de 5 a 200 mV s⁻¹ com a finalidade de verificar qual processo que ocorre na superfície do sensor. A partir desses experimentos foi possível obter informações que mostram a existência de uma dependência linear entre a corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura em toda a faixa estudada (5 a 200 mV s⁻¹)

indicando que a oxidação da hidroclorotiazida na superfície do sensor, tal como esperado, é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo¹⁰⁷ (Figura 24).

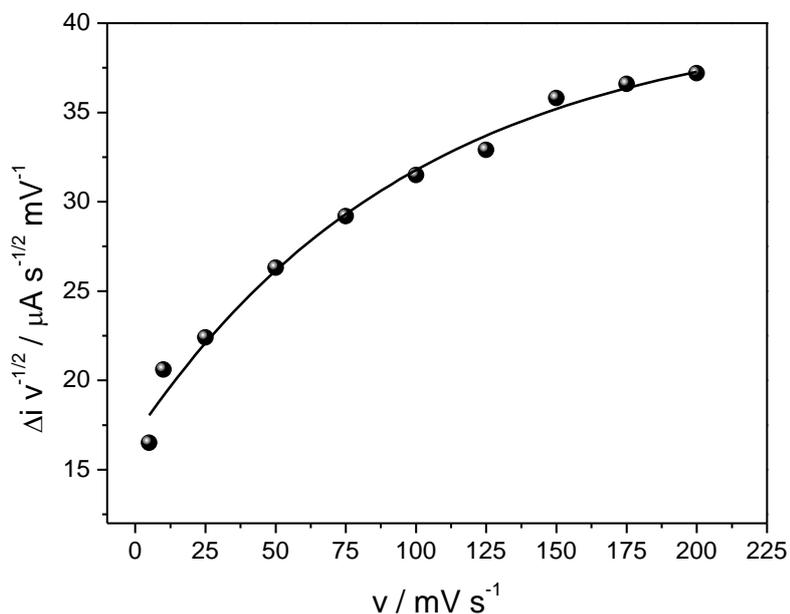
Figura 24. Variação da corrente de pico anódico (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com complexo de cobre e na presença de hidroclorotiazida. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,5) concentração de hidroclorotiazida de 1,96 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora.

Quando plotado o gráfico da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($\Delta i_p / v^{1/2}$) vs v (Figura 25) o perfil obtido sugere que o processo de oxidação da hidroclorotiazida é eletrocatalítico do tipo CE (*chemical/electrochemical*), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada a um processo eletroquímico⁷⁶.

Figura 25. Variação da corrente de pico anódico normalizada ($\Delta i v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão B. R. 0,15 mol L⁻¹ (pH 7,0) concentração de hidroclorotiazida de 4,76 x 10⁻⁶ mol L⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, foi possível propor um mecanismo para o sensor biomimético. Inicialmente, há reação química (etapa química) entre a hidroclorotiazida e a molécula de reduzida de hemina, promovendo a oxidação de hidroclorotiazida e redução de ferro III na protoporfirina IX de ferro. Na etapa eletroquímica acoplada à química, a oxidação do metal Fe²⁺ para Fe³⁺ sobre a superfície do eletrodo leva à obtenção da corrente observada em função da presença do analito na cela de medida. A Figura 26 apresenta o mecanismo proposto de forma esquemática.

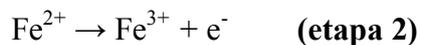
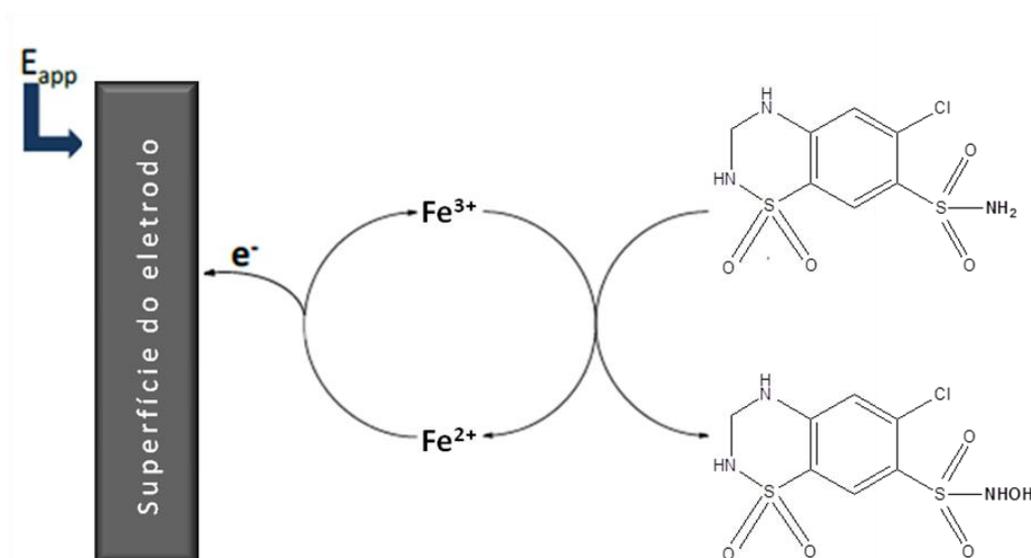


Figura 26. Representação esquemática do possível mecanismo de resposta para o sensor proposto.



Fonte: Elaborada pela autora.

VI. 2.2. Estudo e otimização das condições experimentais

A otimização das condições experimentais para a metodologia proposta foi feita com auxílio dos planejamentos fatorial e composto central para a obtenção da superfície de resposta. A técnica eletroquímica utilizada para obtenção dos melhores resultados foi a amperometria e todos os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas Minitab versão 16 e o Statistica versão 6.0.

VI. 2.2.1. Planejamento Fatorial de Experimentos

Primeiramente, uma triagem das variáveis que afetam a determinação deste analito usando amperometria foi realizada utilizando um planejamento fatorial completo 2^4 , cujos dados foram obtidos em triplicada e as variáveis: % de modificador, tipo de solução tampão, concentração da solução tampão e pH foram estudadas em dois níveis [baixo (-1) e alto (+1)], conforme ilustrado na Tabela 11.

Tabela 11. Variáveis usadas no planejamento fatorial completo e os respectivos níveis estudados.

Variáveis	Nível	
	-1	+1
Modificador / % m/m	10	30
Tipo do tampão	Fosfato	BR
[Tampão] / mol L ⁻¹	0,025	0,150
pH	5,0	8,0

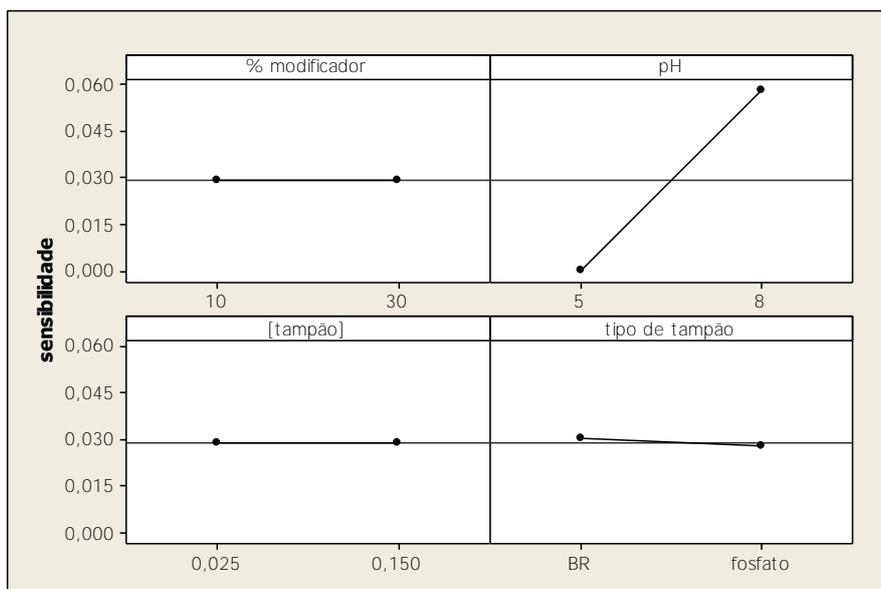
Como anteriormente mencionado, de acordo com as variáveis e os valores dos níveis escolhidos, o programa estatístico gera uma matriz de experimentos com as possíveis combinações dessas variáveis, e após realizando todos os experimentos, é possível obter a resposta em função dos valores de variação de corrente, possibilitando construir curvas analíticas e obter então valores de sensibilidade para cada experimento executado. Na Tabela 12, encontram-se a matriz de experimentos e o valor de sensibilidade para cada ensaio.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial completa 2^4 com os respectivos valores da sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva. Número de replicatas = 3.

Ensaio	Modificador	pH	[Tampão]	Tipo do tampão	Sensibilidade
1	10	5,0	0,025	BR	0
2	30	5,0	0,025	BR	0
3	10	8,0	0,025	BR	0,063
4	30	8,0	0,025	BR	0,055
5	10	5,0	0,15	BR	0
6	30	5,0	0,15	BR	0
7	10	8,0	0,15	BR	0,061
8	30	8,0	0,15	BR	0,063
9	10	5,0	0,025	Fosfato	0
10	30	5,0	0,025	Fosfato	0
11	10	8,0	0,025	Fosfato	0,055
12	30	8,0	0,025	Fosfato	0,059
13	10	5,0	0,15	Fosfato	0
14	30	5,0	0,15	Fosfato	0
15	10	8,0	0,15	Fosfato	0,053
16	30	8,0	0,15	Fosfato	0,057

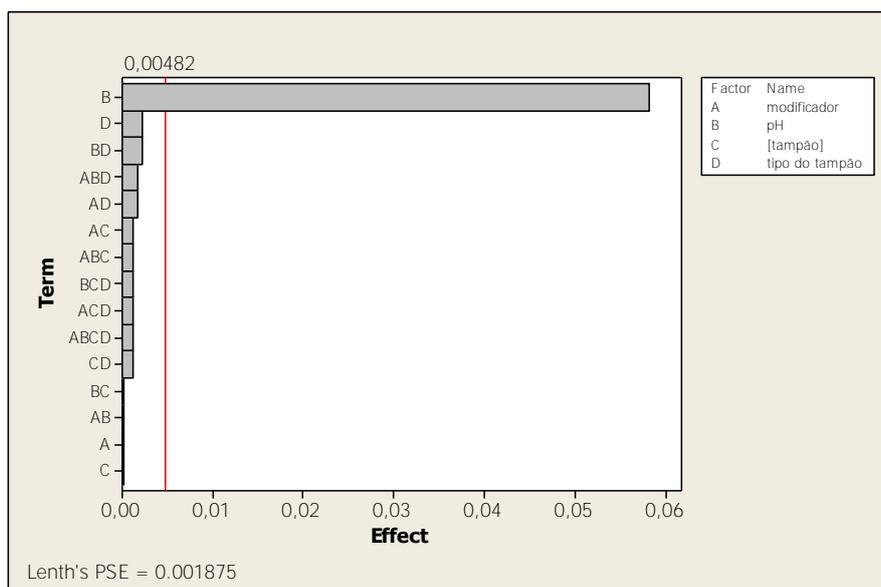
Analisando a Figura 27, verificam-se quais são as variáveis que estão influenciando significativamente na obtenção da corrente. Observa-se que apenas a variável pH está sendo mais significativa para obtenção de um maior sinal, já para as outras variáveis em questão, os valores tanto no nível (-1) quanto no nível (+1) estão bem próximas, não alterando muito a sensibilidade da metodologia, concluindo-se então que essas variáveis não são significativas para o sistema. Essas significâncias também podem ser observadas no gráfico de pareto (gráfico de barras) apresentado na Figura 28.

Figura 27. Efeitos principais das variáveis estudadas no sinal de sensibilidade obtido.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28. Gráfico de barras dos efeitos das variáveis.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir destes resultados, fixaram-se os valores das variáveis menos significativas: concentração de tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o tipo de tampão em tampão fosfato. A variável porcentagem de modificador também era possível fixar um valor, pois a mesma não estava sendo significativa, no entanto, como é necessário ter duas

variáveis para o planejamento composto central, escolheu-se esta variável por influenciar no custo de análise no sensor proposto.

Dessa forma, com as duas variáveis (porcentagem de modificador e pH), iniciou-se o estudo de seus efeitos pelo planejamento de composto central visando à obtenção da superfície de resposta.

VI. 2.2.2. Planejamento Composto Central

Para a realização deste planejamento foram feitas combinações dos cinco níveis de cada uma das variáveis estudadas (porcentagem de modificador e pH), totalizando-se treze ensaios, os quais são apresentados na Tabela 13.

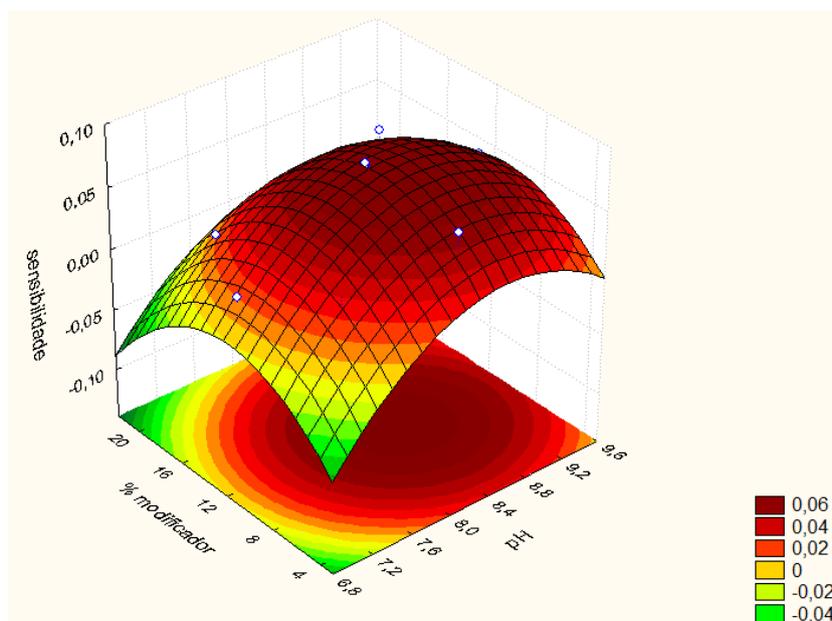
Tabela 13. Matriz de ensaios utilizados no planejamento composto central com os respectivos valores de sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) de cada curva analítica preparada em triplicata.

Ensaio	pH	Modificador (%)	Sensibilidade
1	7,4	7,2	0,012
2	9,1	7,2	0,045
3	7,4	17,8	0,017
4	9,1	17,8	0,047
5	7,0	12,5	0,013
6	9,5	12,5	0,045
7	8,3	5	0,065
8	8,3	20	0,008
9	8,3	12,5	0,075
10	8,3	12,5	0,073
11	8,3	12,5	0,076
12	8,3	12,5	0,074
13	8,3	12,5	0,076

Realizados os ensaios do planejamento composto central, os resultados também foram analisados usando o programa Statistica[®] versão 6.0. O gráfico da superfície de resposta, apresentado na Figura 29 referente aos dados da Tabela 13, mostra que a sua região central (cor vermelho-escuro) apresenta o sinal analítico de melhor resposta, ou

seja, o valor máximo de sensibilidade encontrado para as condições em que as variáveis foram estudadas, sendo desta forma a condição ótima para o experimento em questão.

Figura 29. Gráfico da superfície de resposta para o sensor proposto para determinação de hidroclorotiazida.



Fonte: Elaborada pela autora.

Esta região é considerada ótima porque, considerando os fatores estudados no planejamento, apresentou um maior sinal de corrente, o que permite uma maior sensibilidade do método uma vez que, quanto maior o sinal, mais vezes o analito pode ser diluído e conseqüentemente, menores concentrações deste podem ser quantificadas.

O modelo (valor de $p < 0,0005$), em termos de fatores escalonados é dado por:

$$z = 0,075 (\pm 0,035) - 0,014x (\pm 0,028) + 0,009x^2 (\pm 0,028) - 0,024y (\pm 0,030) - 0,020y^2 (\pm 0,030) + 0,001xy (\pm 0,039). \quad (\text{equação 3})$$

em que z é o fator de resposta correspondente ao valor de pH, x é a frequência, e y é a porcentagem de modificador. O modelo de regressão quadrática também não se aplicou neste caso, pois apenas o b_0 foi significativo em relação aos intervalos de confiança. As respostas do modelo, os valores de R^2 foram superiores 95%, o que implica que o modelo foi bem ajustado pelos dados no nível de confiança de 95% para a resposta de sensibilidade.

Depois de realizada toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se as melhores condições experimentais para a metodologia proposta, que estão apresentadas na Tabela 14.

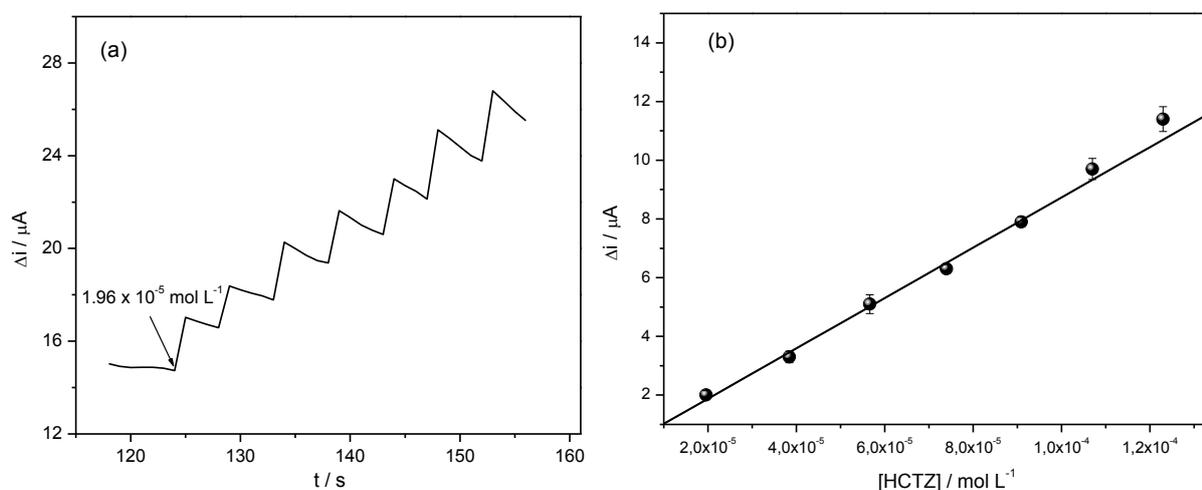
Tabela 14. Condições otimizadas do método para determinação de hidroclorotiazida.

Variáveis	Valores ótimos
Modificador / % m/m	14
pH	8,5
[Tampão] / (mol L ⁻¹)	0,1
Tipo de tampão	Fosfato

VI. 2.3. Características analíticas do sensor

Sob as condições otimizadas usando a calibração multivariada, o sensor apresentou um perfil amperométrico tal como mostrado na Figura 30a, possibilitando a construção da curva analítica (Figura 30b), na qual a variação de corrente é medida após cada adição do analito em relação ao branco.

Figura 30. (a) Perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas. Amperograma típico obtido para adições sucessivas de hidroclorotiazida. **(b)** Curva analítica construída com os resultados obtidos na



Fonte: Elaborada pela autora.

A curva analítica construída a partir de soluções padrão de hidroclorotiazida na faixa linear de concentração de $2,0 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Uma relação linear ($r = 0,993$) foi obtida pela representação gráfica de Δi versus concentração de hidroclorotiazida (mol L^{-1}). A equação da reta que representa os dados da Figura 30b é mostrada na equação 4.

$$\Delta i / \mu\text{A} = -0,0761 (\pm 0,2483) + 90741 (\pm 3083) [\text{HCTZ}] \text{ (equação 4)}$$

Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo os parâmetros estabelecidos pela ANVISA¹⁰⁸ obtendo os valores de $8,2 \times 10^{-6}$ e $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente para o LOD e o LOQ.

Para a verificação da repetibilidade da curva analítica, foram realizados outros experimentos no mesmo dia e em dias diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dia), sendo que os coeficientes de variação obtidos foram de 4,2% e 4,6%, respectivamente. Os resultados apresentados mostraram que as medidas são precisas e satisfatórias por apresentarem bons desvios e um bom coeficiente para a curva analítica. Adicionalmente, foi determinado experimentalmente também o tempo de vida do sensor proposto. Na Tabela 15 são mostradas todas as características analíticas apresentadas por este sensor na quantificação de hidroclorotiazida.

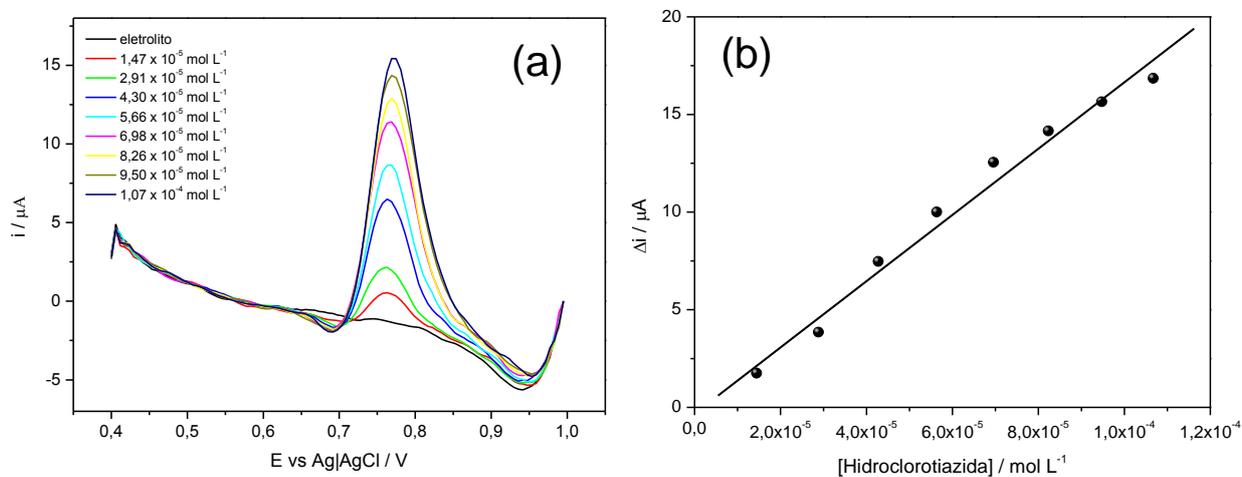
Tabela 15. Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de hidroclorotiazida.

Parâmetros / unidade	Resposta
Faixa Linear (mol L^{-1})	$2,0 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4}$
Sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	90741
Coefficiente de Correlação (n=10)	0,997
Limite de detecção (mol L^{-1})	$8,2 \times 10^{-6}$
Limite de quantificação (mol L^{-1})	$2,7 \times 10^{-5}$
Repetibilidade intra-dia (SD, n=5)	4,2%
Repetibilidade inter-dia (SD, n=5)	4,6%
Tempo de vida mantendo 95% sinal inicial	4 dias (70 análises)

Almejando a construção de um multissensor descartável, ou seja, que possibilite à determinação de ambas as substâncias, fez-se a determinação de hidroclorotiazida nas mesmas condições otimizadas para a bumetanida. Optou-se por essa escolha, pois a voltametria de onda quadrada é uma técnica mais sensível que a técnica de amperometria. Além disso, a VOQ oferece dados em um único voltamograma, enquanto na amperometria, para se obter dados de duas espécies distintas, seria necessária a aplicação de dois diferentes potenciais, requerendo assim o uso da amperometria pulsada, que é um pouco mais complexa para ser desenvolvida e para ser aplicada em potenciostatos de construção simples.

O perfil voltamétrico de resposta é mostrado na Figura 31a e a respectiva curva, na Figura 31b.

Figura 31. (a) Perfil de resposta do sensor para hidroclorotiazida em voltametria de onda quadrada (VOQ), nas condições de análise previamente otimizadas para bumetanida, visando análise simultânea. **(b)** Curva analítica construída com os resultados obtidos na VOQ.



Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar das condições não serem as ótimas para o sensor biomimético de hidroclorotiazida, os limites de detecção e quantificação obtidos foram próximos dos valores obtidos para o método amperométrico otimizado anteriormente (Tabela 15). Esses valores de LOD e LOQ foram respectivamente $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

VI. 2.4. Estudo de seletividade/interferência

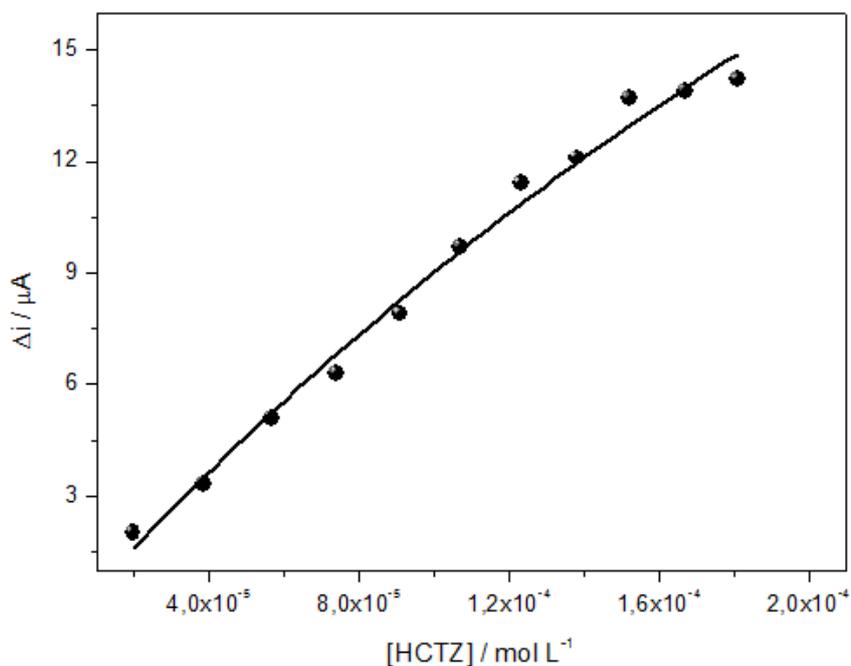
Para realizar este estudo, a resposta de amperometria do sensor foi avaliada para 14 fármacos com diversas estruturas e classificações e o, cujas concentrações estavam 10 vezes maiores do que a concentração de hidroclorotiazida. Dentre todos os fármacos analisados (Tabela 8), apenas a bumetanida (mencionado no capítulo anterior) apresentou uma resposta interferente. Desta forma, estes resultados sugerem que o sensor à base de hemina é seletivo para hidroclorotiazida em relação a outros 12 fármacos, e um pouco menos seletivo em relação à BMT. Essa boa seletividade do

sensor já era esperada para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático.

V. 2.5. Verificação do caráter biomimético do sensor

O caráter biomimético do sensor proposto foi avaliado considerando que este sensor deveria apresentar características similares a de um biossensor enzimático. O perfil hiperbólico que é característico de sistemas enzimáticos foi obtido a partir de um sinal de corrente que aumenta linearmente com a concentração do substrato (HCTZ), até um dado valor, onde a partir dessa concentração o sinal de corrente alcança um valor máximo¹⁰⁹.

Figura 32. Perfil hiperbólico do sensor à base de hemina.

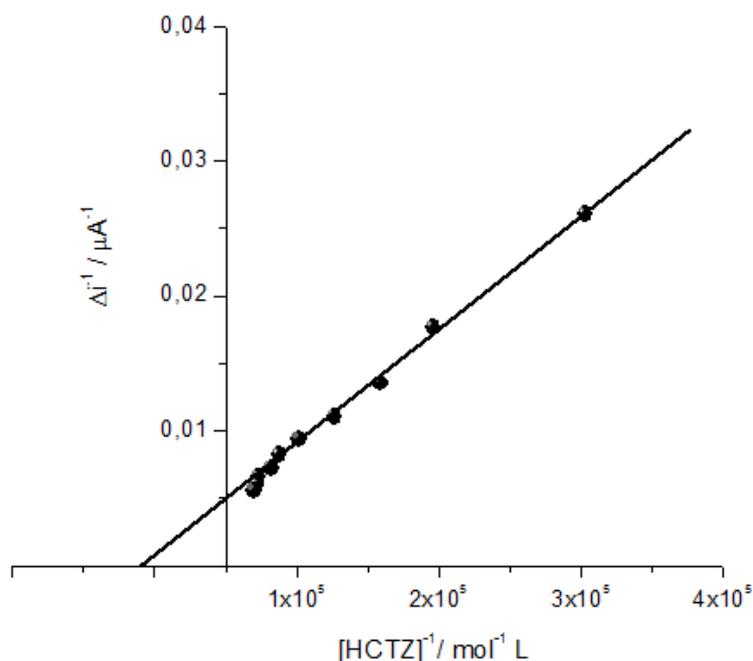


Fonte: Elaborada pela autora.

Do perfil hiperbólico pode ser obtido, o gráfico de *Lineweaver-Burk* ou gráfico do duplo recíproco (Figura 33) do qual se pode determinar a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}). O valor encontrado foi de $1,2 \times 10^{-3} mol L^{-1}$, cujo valor indica um bom grau de afinidade entre o complexo hemina e o analito. Sendo esse valor

obtido para K_{MM}^{app} característico de biossensores enzimáticos e sensores biomiméticos^{110,111}.

Figura 33. Gráfico do duplo recíproco.



Fonte: Elaborada pela autora.

VI. 2.6. Aplicação do sensor biomimético em amostras reais

Determinados os parâmetros de otimização, as características analíticas e os estudos eletroquímicos, aplicou-se o método desenvolvido em formulações comerciais de medicamentos e urina. Com o objetivo de avaliar efeitos de matriz foram realizados testes de adição de padrão. Foram construídos gráficos de Δi vs. $[HCTZ]$ padrão adicionado, sendo a concentração do diurético na urina diluída analisada pela extrapolação da curva, na interseção com o eixo das abscissas no lado negativo. O resultado é expresso em $mol L^{-1}$.

E com o objetivo de validar os resultados obtidos na determinação de hidroclorotiazida pelo sensor biomimético proposto, as amostras foram analisadas por um método comparativo baseado em cromatografia líquida de alta eficiência¹¹³. Na

Tabela 16 e 17 estão apresentados os resultados obtidos na análise dos medicamentos e urina, respectivamente, pelo sensor proposto e pelo método comparativo de análise.

Tabela 16. Determinação de hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas.

Amostra ^a	Método Proposto	Valor de Referência ¹¹³	
	[HCTZ] x 10 ⁻³ (mol L ⁻¹)		
	Valor encontrado ^b	Valor encontrado ^b	Teste-t ^c
A (genérico)	48,6 ± 0,6	49,994 ± 0,005	1,81
B (genérico)	49,4 ± 0,7	51,400 ± 0,003	2,14
C	59,6 ± 0,9	61,600 ± 0,003	1,78
D (similar)	34,6 ± 0,8	39,000 ± 0,002	3,52

^aValor declarado: 50 mg de hidroclorotiazida / comprimido.

^bDesvio padrão de três replicatas.

^cValores críticos de t ao nível de confiança de 95%, $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. Valores obtidos considerando o valor fornecido pelo método comparativo como o verdadeiro.

Tabela 17. Recuperação de hidroclorotiazida adicionada em amostras de urina.

Amostra ^a	Método proposto		Valor de Referência ¹¹³		
	Valor encontrado ^b	Recuperação (%)	Valor encontrado ^b	Recuperação (%)	Teste-t ^c
A	0,97 ± 0,03	96	1,0200 ± 0,0004	102	3,34
B	0,97 ± 0,03	96	1,0300 ± 0,0001	103	3,19
C	0,95 ± 0,05	95	1,010 ± 0,001	101	2,09
D	0,97 ± 0,02	96	1,0100 ± 0,0001	101	3,46
E	1,05 ± 0,03	105	1,0400 ± 0,0001	104	0,56
F	1,09 ± 0,04	109	1,0500 ± 0,0001	105	1,87

^a Valor adicionado: $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

^b Desvio padrão de três replicatas.

^c Valores críticos de “t” ao nível de confiança de 95%, $t_{\text{tabelado}} = 4,303$. Valores obtidos considerando o valor fornecido pelo método comparativo como o verdadeiro.

Para todas as amostras analisadas, os resultados obtidos pelo método comparativo e pelo método proposto foram comparados aplicando-se teste t, com nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os valores de t calculados não excederam os valores teóricos, indicando que não houve diferença significativa entre os métodos com relação à precisão e exatidão.

VI. 2.7. Conclusões

O método desenvolvido também apresenta ser uma alternativa aos outros procedimentos existentes para a análise de hidroclorotiazida, visto que o complexo hemina utilizado mostrou ter maior sensibilidade ao analito do que sensor à base de pasta de carbono, aumentando a transferência eletrônica, conseqüentemente a sensibilidade da metodologia. Os estudos da otimização de forma multivariada foram

importantes para a determinação do diurético na metodologia, indicando qual variável influenciava mais significativamente na resposta da corrente.

Estudos baseados na voltametria cíclica, assim como da seletividade e perfil de resposta voltamétrico, evidenciaram o comportamento biomimético do complexo na eletrooxidação catalítica do diurético. Além de apresentar boa estabilidade, possibilitando um maior número de análises. Este método foi aplicado com sucesso na análise de HCTZ em amostras de urinas e de comprimidos de diferentes marcas comerciais. Além disso, o método oferece vantagens relacionadas à simplicidade, rapidez e baixo consumo de reagentes, sendo apropriado para detecção, quantificação e monitoramento de HCTZ em diversos tipos de matrizes, possibilitando a construção de sensores descartáveis e multissensor para determinação *in situ* e análises simultânea dos diuréticos estudados neste projeto.

**CAPÍTULO VII. DESENVOLVIMENTO DE
POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO
(MIP) PARA BUMETANIDA**

VII. 1. PARTE EXPERIMENTAL

VII. 1.1. Equipamentos

Para a ativação térmica da reação radicalar da síntese do MIP/NIP foi utilizado um banho-Maria SOLAB modelo SL-150/10.

Para a remoção do analito após a síntese foi utilizado um sistema de Soxhlet contendo um balão de fundo chato com capacidade de 125 mL, extrator e um condensador de bolas, além da manta de aquecimento. A análise dos solventes (metanol:ácido acético / 9:1) utilizados para a extração em Soxhlet da tetraciclina foram monitorados utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Ultravioleta Visível) da marca Bel Engineering – modelo UV-M51. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

A avaliação da capacidade de religação do MIP/NIP sintetizado foi realizada empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu, o qual possui os seguintes componentes: detector UV-Vis modelo SPD-20A, amostrador modelo SIL-20A, bomba modelo LC-20AT e interface modelo SPD-20A. O método desenvolvido para as corridas cromatográficas foi descrito no capítulo V. 1.1.

O estudo da porosidade do MIP em função da temperatura de pré-tratamento foi realizado pela adsorção de N₂, sob baixas temperaturas de operação e pressões relativas da ordem de 200 mmHg. As medidas de BET foram realizadas em um equipamento da Micromeritics e modelo ASAP 2010 da UNESP de Araraquara/SP.

A morfologia e a caracterização da superfície do MIP/NIP foram obtidas de imagens provenientes de um Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV) – JEOL/modelo 7500F. As amostras de polímeros analisadas foram colocadas em uma fita de carbono, sendo posteriormente fixadas no porta-amostra do equipamento.

Com o objetivo de caracterizar alguns grupos funcionais provenientes da síntese do MIP e NIP, foram realizadas análises de infravermelho por transformada de Fourier empregando um espectrofotômetro FTIR- VERTEX 70 da BRUKER com uma fonte de laser de HeNe e um detector DLaTGS, utilizando uma faixa de leitura de 4000 à 400 cm⁻¹.

O estudo do comportamento térmico foi feito utilizando o termoanalisador SDT 2960, da TA Instruments. Este sistema é constituído com um comparador de massa horizontal, forno capaz de operar no intervalo de temperatura de 25 a 1500 °C. A análise

foi feita no intervalo de 30 a 500 °C, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, atmosfera de ar seco com vazão de 100 mL min⁻¹.

Para o preparo de amostras foi necessária a utilização de diferentes instrumentos, tais como: um homogeneizador fabricado pela NORTE CIENTÍFICA (modelo NH 2200), uma balança analítica METTLER TOLEDO – modelo AG245, micropipeta de 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL (marca eppendorf) e um aparelho de banho ultrassônico da marca Unique[®] - modelo USC-2500 contendo um aquecimento ajustável de temperatura e um temporizador digital de 0 a 60 minutos foi utilizado para auxiliar na dissolução de amostras.

VII. 1.2. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes empregados na síntese e caracterização do MIP/NIP foram: bumetanida (BMT), acrilonitrila, 2 vinilimidazol, 2,2'-azo-bis-isobutironitrila – C₈H₁₂N₄ (AIBN), etilenoglicol dimetacrilato – C₁₀H₁₄O₄ (EGDMA), sendo todos os reagentes de padrão analítico e fornecidos pela Sigma-Aldrich; metanol - CH₃OH (MeOH) e acetonitrila (ACN) de grau CLAE foram adquiridos pela J.T. Baker; acético glacial – CH₃COOH, os sais fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) e fosfato de potássio bibásico anidro (K₂HPO₄) foram fornecidos pela Synth para a preparação da solução tampão fosfato. Todas as soluções foram preparada em água deionizada padrão MilliQ[®], sendo proveniente do sistema de água purificada Millipore.

Para o estudo preliminar de seletividade foram utilizados a hidroclorotiazida e a furosemida, sendo ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich.

VII. 1.3. Simulação computacional

Existem diferentes parâmetros a serem otimizados para a preparação do MIP/NIP seletivo à bumetanida, dentre eles está a escolha do monômero funcional adequado. Desta maneira, realizou-se uma simulação computacional para verificar o monômero que obtivesse uma melhor afinidade com a molécula alvo na etapa de pré-

polimerização, conseqüentemente buscando determinar interações estáveis o suficiente para resultar em um polímero seletivo.

Para isto, foram empregados os seguintes programas:

1. **HyperChem[®] 8.0.5**: utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs.

2. **OpenEye[®]** (pacote de *softwares*) contendo os programas:

- *VIDA 3.0.0*: utilizado para visualizar as moléculas modeladas e para conferir possíveis erros de ligações entre átomos.

- *Omega2*: gera diversos confôrmeros das moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios.

- *Szybki 1.2.2*: programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portanto, mais estável.

3. **AutoIt 3.3.6.0**: aplicativo que utiliza linhas de comandos (scripts) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos.

4. **Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009**: utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semiempírica para os cálculos de aproximação.

Na simulação computacional realizada foi possível analisar a interação dos confôrmeros da bumetanida gerado aleatoriamente pelo programa com 20 monômeros diferentes, os quais foram listados na Tabela 18. Conseqüentemente, gerando resultados em energia de ligação livre para avaliação das respectivas interações.

Tabela 18. Lista dos 20 monômeros funcionais utilizados na simulação computacional referente à interação com a tetraciclina.

Sigla	Monômeros	Caráter
M1	N,N-metileno bis-acrilamida	Neutro
M2	Ácido imidazol-4- acrílico	Ácido
M3	Etil ester de ácido imidazol-4-acrílico	Ácido
M4	Ácido Acrílico	Ácido
M5	Acrilamida	Neutro
M6	Acroleína	Neutro
M7	Alilamina	Base
M8	Acrilonitrila	Neutro
M9	Etilenoglicol Dimetacrilato	Neutro
M10	(2-Aminoetil) metacrilamina	Base
M11	Ácido metilenosucinico	Ácido
M12	Ácido Metacrílico	Ácido
M13	1,3-divinilbenzeno	Neutro
M14	1,4-divinilbenzeno	Neutro
M15	Estireno	Neutro
M16	1-vinilimidazol	Base
M17	2-vinilpiridina	Base
M18	4-vinilpiridina	Base
M19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico	Ácido
M20	2-hidroxietil metacrilato	Neutro

VI. 1.4. Síntese do MIP/NIP

A síntese do MIP/NIP para bumetanida com o monômero acrilonitrila utilizou a proporção estabelecida de 1:12:60:1 (*template*:ácido metacrílico:EDGMA:AIBN). A síntese foi realizada pelo método em *bulk* e ocorreu dentro de um tubo de vidro de 25 mL, para o qual foram utilizadas 0,1 mmol da molécula molde (bumetanida) e 1,2 mmol do monômero com 10 mL de acetonitrila. Em seguida, a mistura foi colocada por 5 minutos no ultrassom para que houvesse completa solubilização do analito. O tubo de

ensaio contendo a solução reacional foi mantido por 24 horas com a finalidade de garantir que todo o monômero interaja com o analito.

Posteriormente, realizou-se uma reação de polimerização junto ao template, de tal modo que este permaneça no interior da matriz polimérica. Para isso foi adicionado 6 mmol de EDGMA (reagente de ligação cruzada) e 0,1 mmol de AIBN (iniciador radicalar) sob atmosfera de N₂, uma vez que o oxigênio no meio reacional inibi a reação de polimerização radicalar. Os MIP/NIP sintetizados foram mantidos na capela com a finalidade de evaporar o solvente empregado na síntese.

A síntese do polímero não-impresso (NIP) ou polímero de controle foi realizado nas mesmas condições do MIP, exceto pela adição da molécula molde, o qual apesar de apresentar poros, não há formação de cavidades seletivas.

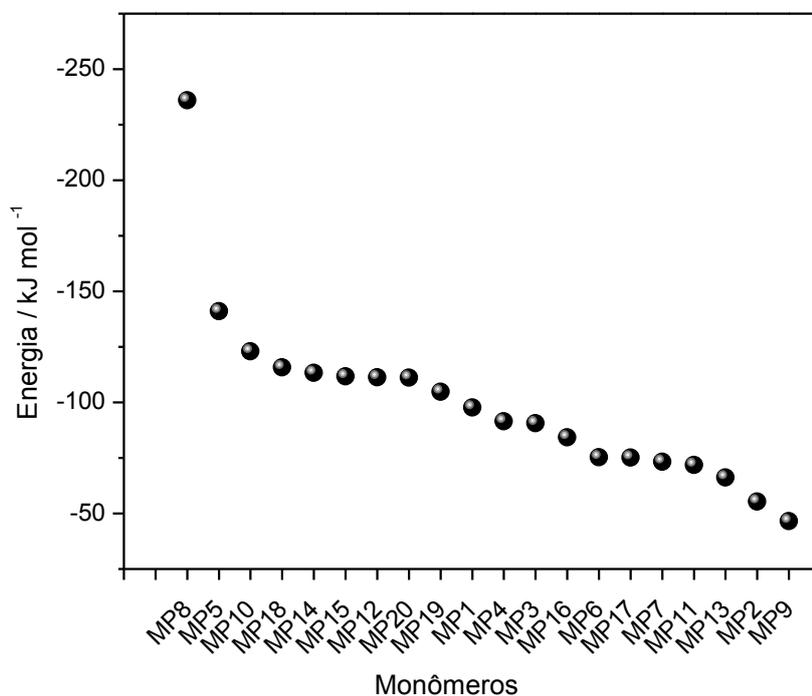
VII. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII. 2.1. Simulação Computacional

A simulação computacional foi realizada utilizando os conformeros da bumetanida com 20 monômeros diferentes (listados na Tabela 18), tendo a finalidade de verificar a interação mais favorável para a formação de complexos pré-polimerização “template-monômero” ainda mais estável, além de analisar se a religação do analito ao MIP será favorecida, os quais foram interpretados a partir de valores de energia livre de ligação (kJ mol⁻¹).

Os valores médios resultantes da energia liberada durante a aproximação da molécula molde e do monômero são mostrados na Figura 34.

Figura 34. Simulação computacional semi-empírica da energia de ligação (kJ mol^{-1}) da bumetanida com 20 diferentes monômeros.



Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo a simulação computacional, a acrilonitrila (M8), acrilamida (M5), (2-Aminoetil) metacrilamina (M10) foram os monômeros mais indicados para a realização da síntese do MIP, sendo que o monômero escolhido foi a acrilonitrila (M8) por apresentar maior energia de ligação.

Assim, com intuito de comprovar a eficácia da simulação computacional, foram sintetizados dois polímeros distintos, variando-se entre eles somente o monômero. Para tal foram escolhidos para serem utilizados na síntese do polímero, levando-se em conta a disponibilidade, um monômero da classe com maior energia de interação (monômero 8, acrilonitrila) e um monômero da classe de menor energia de interação (monômero 16, 1-vinilimidazol), porém não houve tempo suficiente para estudar o monômero de menor energia.

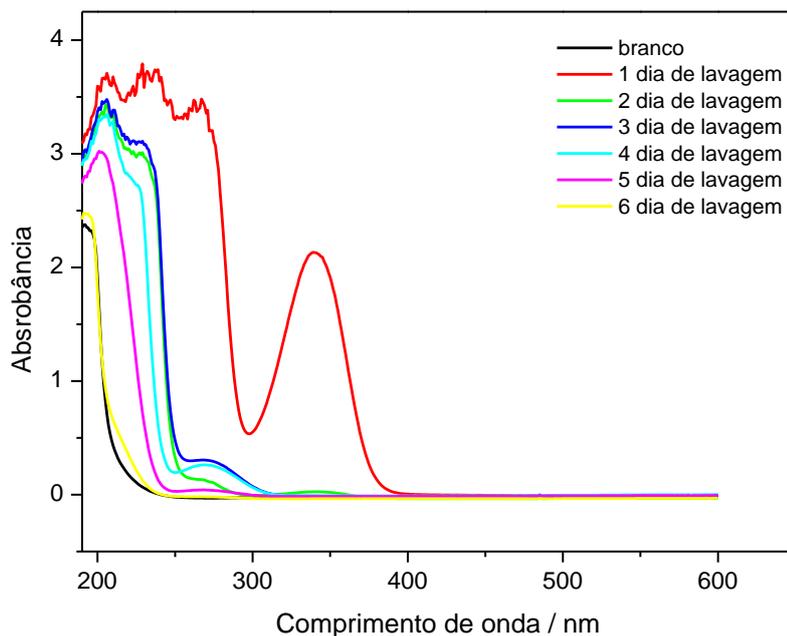
VII. 2.2. Remoção do analito

Após o processo de polimerização, a etapa de lavagem é considerada fundamental, uma vez que a remoção do analito resulta em cavidades tridimensionais livres com uma “memória”, ou seja, a bumetanida presente em uma amostra complexa possui a capacidade de religar-se seletivamente. Além disso, houve também a retirada do excesso de monômero e possíveis impurezas presentes no meio reacional.

A remoção do *template* foi realizada durante 6 dias via extração em Soxhlet com uma solução de MeOH e ácido acético (9:1, v/v), seguida de uma lavagem final com MeOH para a retirada dos resquícios de ácido acético, sendo o solvente trocado e monitorado diariamente até que todo o analito fosse removido, sendo comprovado por análise no espectrofotômetro UV-Vis.

Os solventes de lavagem foram analisados diariamente para verificar a remoção completa do *template*. Como pode ser observado na Figura 35, aproximadamente 92,0% da tetraciclina inicialmente utilizada na síntese foi extraída da cavidade seletiva. Apesar de não ter alcançado a máxima porcentagem, já que houve uma pequena perda de massa do polímero sintetizado durante a transferência do mesmo da etapa de secagem para lavagem, pode-se considerar que a remoção da molécula molde foi eficiente, uma vez que as absorbâncias dos solventes de extração foram nulas.

Figura 35. Gráfico referente à formação de cavidades livres após sucessivas extrações via Soxhlet com MeOH:ácido acético (9:1, v/v).



Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, nota-se que a bumetanida foi facilmente removida com a solução de metanol:ácido acético, sendo liberado quase que sua totalidade durante os três primeiros dias, assim concluindo que possivelmente predominou a presença de interações não-covalentes entre o analito e o monômero funcional.

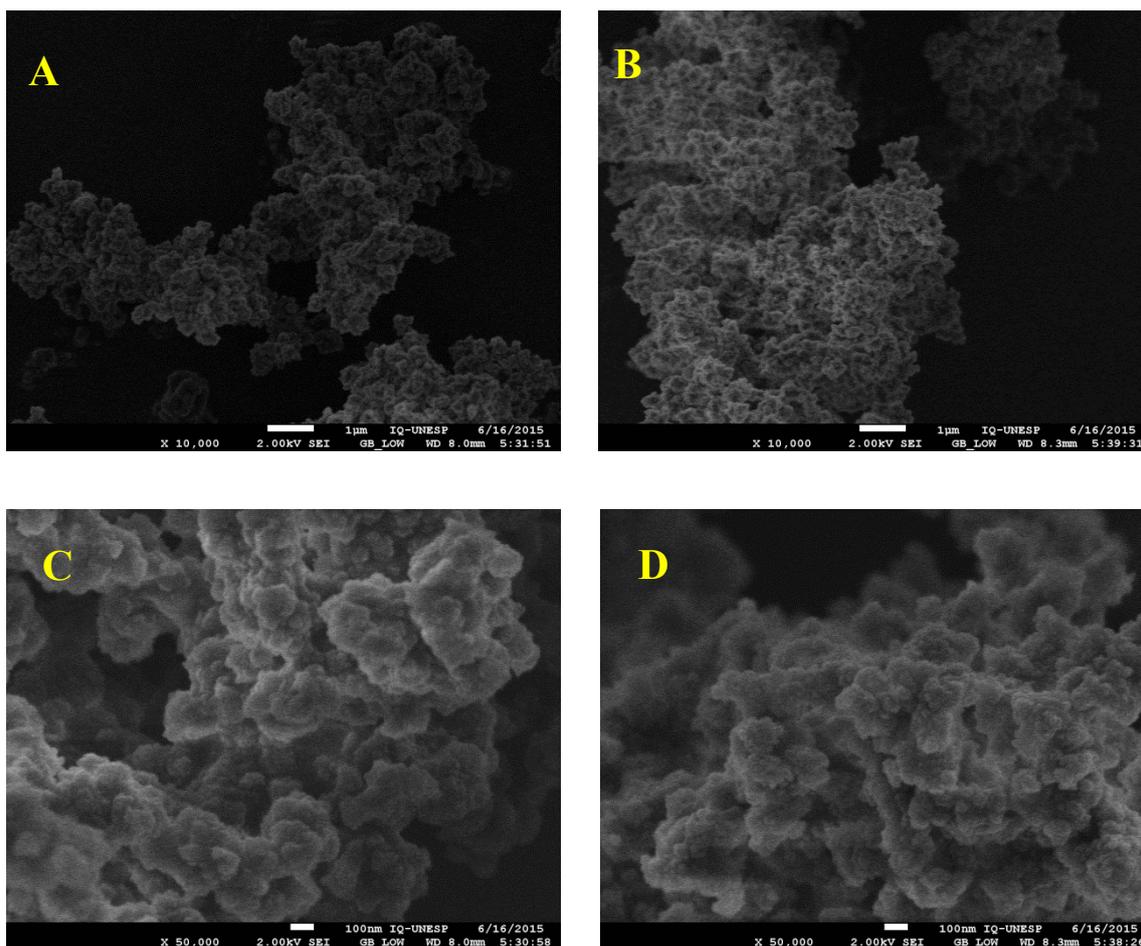
VII. 2.3. Caracterização física

Há uma grande dificuldade em caracterizar os polímeros impressos, principalmente pela necessidade de preservação das nanocavidades seletivas. Entretanto, algumas técnicas fornecem algumas informações úteis sobre o volume e tamanho dos poros, estabilidade térmica, entre outras. Dessa forma, algumas técnicas foram utilizadas para adquirir informações adicionais sobre os polímeros sintetizados, sendo elas: microscopia eletrônica de varredura (MEV), Isoterma de Brunauer, Emmett e Teller (BET), análise térmica e FTIR.

VII. 2.3.1. Microscopia de Varredura Eletrônica

A Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) é outro método que pode ser utilizado para observação das características morfológicas dos MIPs. As imagens do MEV são mostradas na Figura 36.

Figura 36. Imagens de AFM referente ao MIP (A e C) e NIP (B e D) nas escalas de 10,000 e 50,000X.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do MEV apresentado na Figura 36, observa-se que tanto no MIP quanto no NIP houve uma agregação das microsferas, conseqüentemente formando grânulos poliméricos¹¹⁴. Aparentemente houve uma homogeneidade na formação das partículas e a distribuição dos tamanhos se mostraram irregulares. Observa-se também que não há diferença na porosidade do MIP, em relação ao NIP, uma vez que os dois polímeros impresso possuem as cavidades, porém as do NIP não são seletivas.

VII. 2.3.2. Análise da porosidade pelo método de BET

Das principais diferenças entre MIP e NIP estão os poros que consistem na cavidade seletiva para o analito no MIP, sendo essa responsável pelo reconhecimento molecular. O método de BET (do inglês *BET-method*) foi utilizado a fim de verificar a formação e tamanho dos poros dos polímeros pela medida de área superficial, uma vez que um tamanho de superfície maior é diretamente proporcional à quantidade de cavidades formadas.

A técnica de BET consiste basicamente em preencher os poros do material com um líquido proveniente da condensação de um gás - normalmente nitrogênio - e, dessa forma, o tamanho ou volume dos poros podem ser calculados a partir da pressão relativa com que há adsorção ou dessorção do nitrogênio¹¹⁵. Pela Tabela 19, pode-se visualizar que MIP e NIP convencionais apresentam áreas superficiais próximas.

Tabela 19. Parâmetros obtidos pelo método BET para os MIP/NIP sintetizados bumetanida.

	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume do poro (cm ³ g ⁻¹)	Tamanho do poro (Å)
MIP	565,6255	0,2070	45,3819
NIP	599,5942	0,2197	44,7532

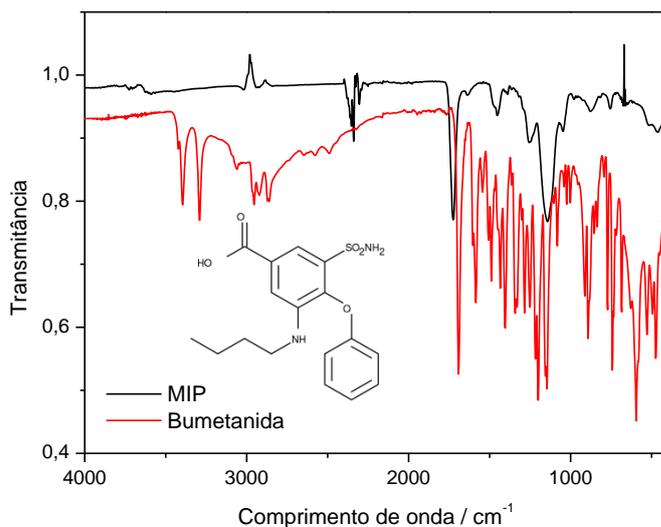
O resultado da porosidade foi o inverso do esperado, uma vez que o MIP, por possuir as cavidades seletivas, deveria possuir área superficial maior. Essa maior área superficial do NIP é devido ao maior volume de poros gerados, isso pode ter ocorrido, pois no MIP há interações do monômero com o analito, e na síntese, esse complexo monômero/analito interage menos com o solvente porogênico, e este por sua vez apresenta menor interação com o crescimento da rede polimérica, assim o solvente se desprende (evapora) com maior facilidade da rede diminuindo o volume dos poros e por consequência a área superficial do MIP. Entretanto, no intuito de melhorar os resultados, pretende-se refazer essas análises e, se possível, modificar a condição e o tipo de polimerização.

VII. 2.3.3. Análises dos polímeros sintetizados por FTIR

Para caracterizar a estrutura do polímero impresso molecularmente, medidas espectrométricas no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas com o MIP/NIP e com cada um dos reagentes empregados para sua síntese. O espectro do MIP foi comparado com o espectro de cada reagente, e foi realizada a atribuição dos picos dos componentes utilizados na síntese polimérica^{116,117}. Para isso, os espectros estão situados na região de comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} .

Na Figura 37, é mostrado o espectro da bumetanida comparada com o MIP sintetizado e a Tabela 19 são identificadas as bandas características para o analito de estudo.

Figura 37. Espectro de Infravermelho comparativo para a Bumetanida e o MIP sintetizado.



Fonte: Elaborada pela autora.

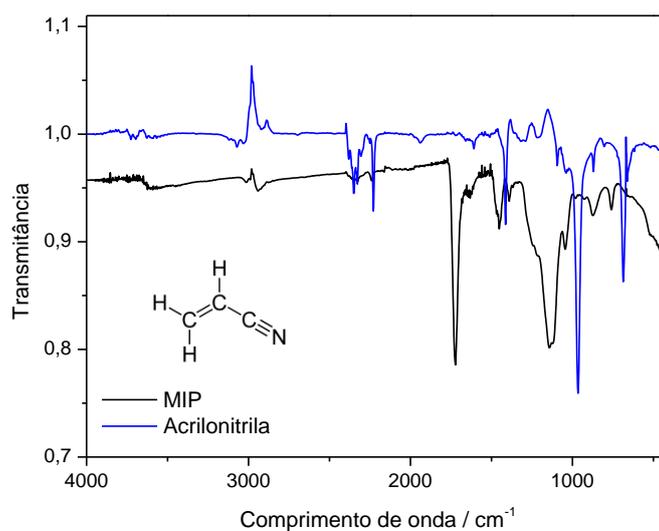
Tabela 20. Bandas do espectro de IV da Figura 37 com as respectivas atribuições.

Principais Bandas / cm^{-1}	Atribuição
3400	ν O-H
3290	ν N-H
3000	ν =C-H sp^2
1730-1700	ν C=O
1550	δ N-H
1325	ν assimétrico S=O
1320-1210	ν C-O
1300-1000	ν C-O
900-690	Aromático δ =C-H

A partir do espectro de IV da bumetanida, é possível observar as bandas características da bumetanida, como as do grupamento N-H, C=O, C-O, S=O, C e das bandas referentes ao grupamento aromático.

Na Figura 38, comparou os espectros do MIP sintetizado com o monômero funcional utilizado na síntese do polímero e as bandas características da acrilonitrila foram mostradas na Tabela 21.

Figura 38. Espectro de Infravermelho comparativo para o Acrilonitrila e o MIP sintetizado.



Fonte: Elaborada pela autora.

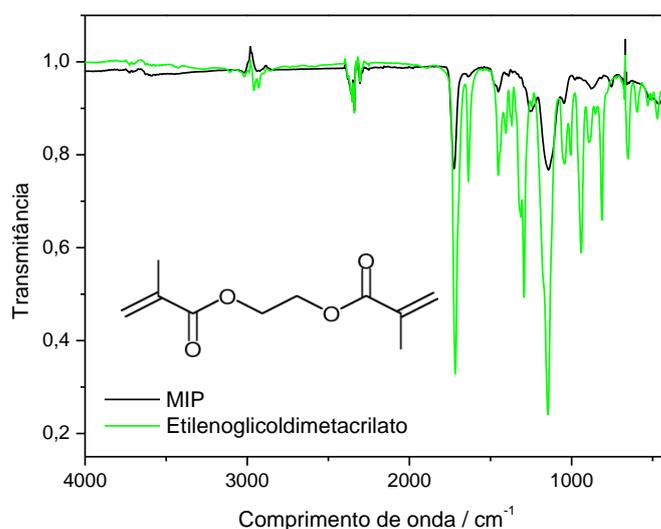
Tabela 21. Bandas do espectro de IV da Figura 38 com as respectivas atribuições.

Principais Bandas / cm^{-1}	Atribuição
2993	ν C-H
2356	CO_2
2235	ν C \equiv N
1420	δ CH_2
1000 a 650	=C-H

As principais bandas da acrilonitrila são de estiramento C \equiv N de intensidade fraca e banda de dobramento fora do plano =C-H na faixa de 1000 a 650 cm^{-1} , caracterizando o monômero funcional.

O espectro comparativo entre o agente reticulante e o MIP sintetizado foi mostrado na Figura 39, juntamente com a Tabela 22 que contém as principais bandas do EGDMA.

Figura 39. Espectro de Infravermelho comparativo para o etilenoglicoldimetacrilato e o MIP sintetizado.



Fonte: Elaborada pela autora.

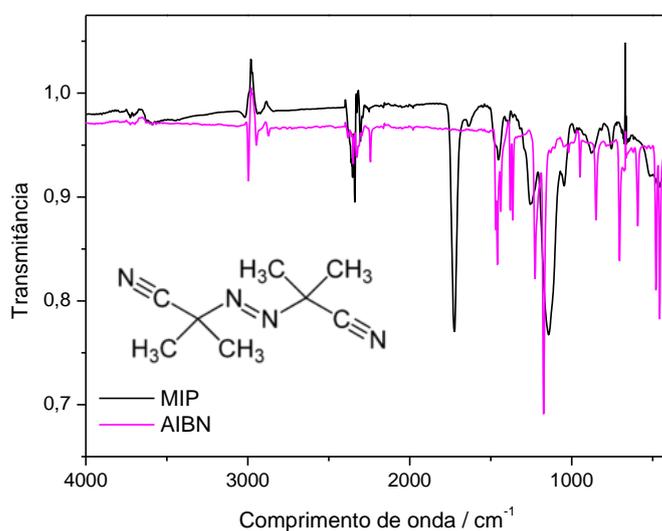
Tabela 22. Bandas do espectro de IV da Figura 39 com as respectivas atribuições.

Principais Bandas / cm^{-1}	Atribuição
1720	ν C=O
1297-1000	C-O
1623	Conjugação de C=O com C=C

A partir do espectro do agente de reticulação EDGMA apresentado na Figura 39, é possível observar as bandas características do grupo éster em 1707 e 1297, referentes ao estiramento da carbonila (C=O) e da ligação C–O respectivamente. Pode-se observar que o espectro de IV do MIP apresenta basicamente essas duas bandas, mostrando que a estrutura do polímero é constituída basicamente do monômero estrutural; o que já era esperado, uma vez que é o componente da síntese empregado em maior quantidade.

A comparação entre o espectro do iniciador radicalar e MIP sintetizado é mostrado na Figura 40 com as principais bandas do AIBN descritas na Tabela 23.

Figura 40. Espectro de Infravermelho comparativo para o AIBN e o MIP sintetizado.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 23. Bandas do espectro de IV da Figura 45 com as respectivas atribuições.

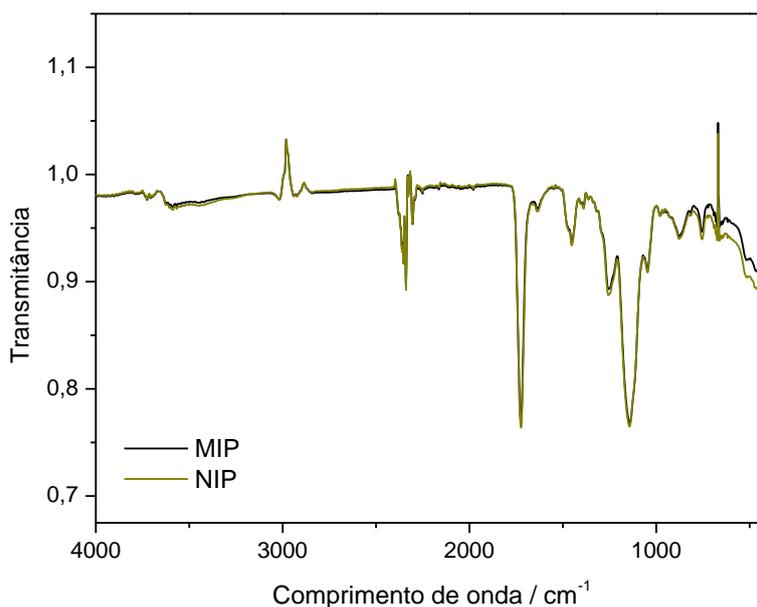
Principais Bandas / cm^{-1}	Atribuição
2995	ν C-H
2350	CO_2
2245	ν C \equiv N
1460	δ CH_2
1377	δ CH_3
1230 -1173	ν C-N

Em 2245 cm^{-1} há banda de estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ de intensidade fraca e banda de estiramento intensa em 1230 cm^{-1} C-N , caracterizando o iniciador radicalar. O grupo azo não apresenta absorção no infravermelho.

Como esperado, os espectros não apresentam bandas do monômero funcional e do iniciador radicalar, uma vez que o primeiro origina as cavidades seletivas e o segundo é consumido para iniciar a reação de polimerização. Além disso, a ausência de bandas correspondentes a acrilonitrila é devido à baixa concentração dele na amostra e a sensibilidade do equipamento que não é suficiente para detectar essa pequena concentração.

A Figura 41 mostra uma comparação entre o MIP sintetizado e lavado com $\text{MeOH}/\text{ácido acético}$ (9:1, v/v) para remoção do analito e o polímero de controle (NIP).

Figura 41. Espectroscopia vibracional na região do IV para os polímeros.



Fonte: Elaborada pela autora.

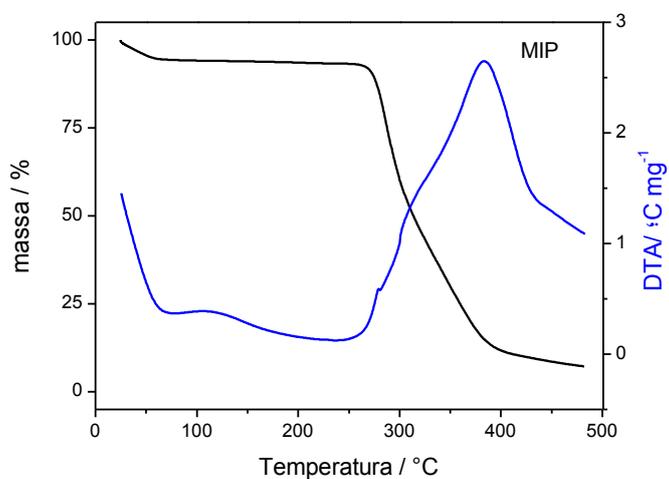
Ao analisar as bandas do NIP em relação ao MIP (Figura 41) pode-se concluir que elas são as mesmas, pois, a cadeia polimérica do NIP também é dada pelo monômero estrutural (EGDMA). Além disso, comparando os espectros vê-se que o analito foi removido da cavidade seletiva do MIP, uma vez que as bandas

correspondentes à bumetanida não estão presentes e os polímeros apresentam bandas idênticas.

VII. 2.3.4. Análises Térmicas dos polímeros sintetizados

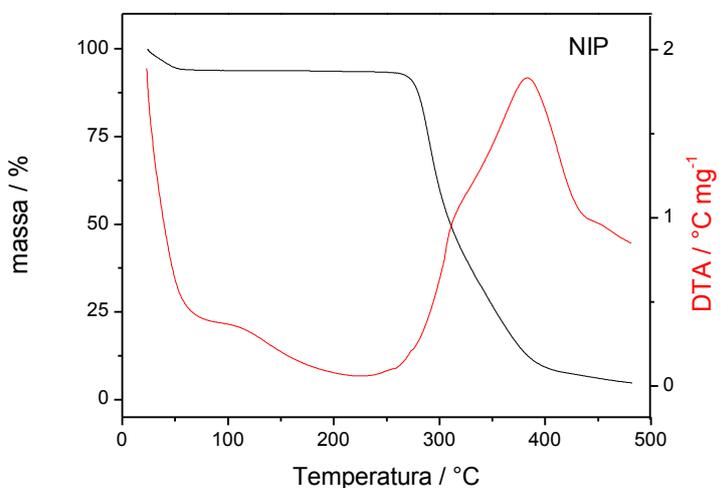
As análises termograviméticas e térmicas diferenciais do MIP e NIP são apresentadas nas Figuras 42 e 43.

Figura 42. Termogravimetria e análise térmica diferencial para o MIP sintetizado para a bumetanida.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 43. Termogravimetria e análise térmica diferencial para o polímero de controle (NIP).



Fonte: Elaborada pela autora.

Das análises TG pode-se verificar que os polímeros apresentaram comportamento térmico semelhante. Até aproximadamente 250° C não apresentaram perda de massa e após aproximadamente 300°C apresentaram perda de massa significativa. Nas análises DTA pode ser observado que esta transição corresponde a picos exotérmicos.

De acordo com os resultados, supõe-se que o polímero (MIP) pode ser utilizado em uma ampla faixa de temperatura, o que comprova a teoria inicial das vantagens de aplicação em relação à utilização dos compostos biológicos como enzimas e anticorpos, pois são altamente sensíveis a pequenas mudanças na temperatura.

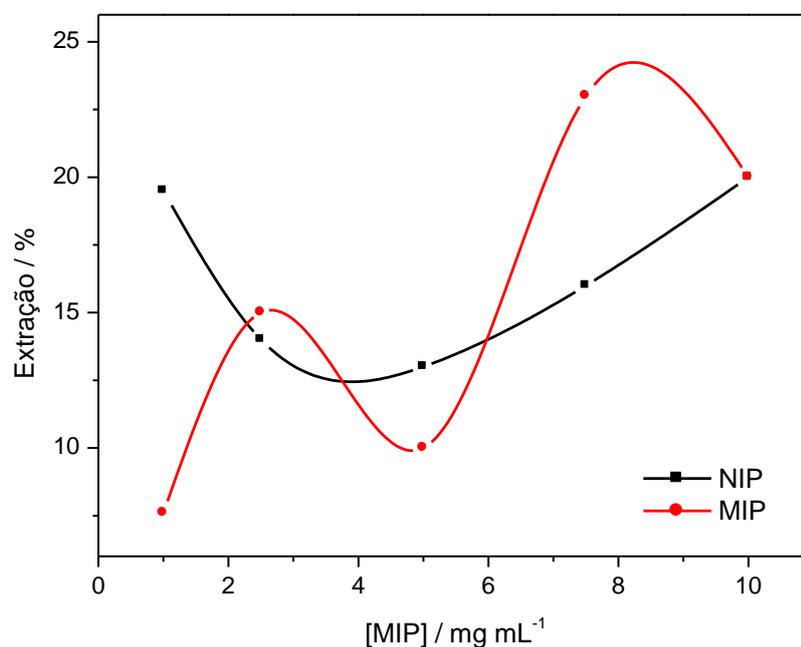
VII. 2.4. Otimização e avaliação dos estudos de religação

VII. 2.4.1 Estudo da massa de religação

Com as cavidades poliméricas (MIP) livres após a lavagem, foi possível verificar a eficiência de religação da bumetanida ao polímero. Este estudo teve como finalidade determinar a quantidade de massa polimérica que deve ser utilizada para que haja uma extração (religação) eficiente do analito. Nessa análise, foram preparadas amostras com diferentes massas poliméricas (variando de 0 a 20 mg) interagindo com uma solução do *template* por 4 horas.

Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, como observado na Figura 44, sendo que a maior capacidade de extração (religação) entre o polímero e o analito de interesse é obtido com 15 mg de MIP.

Figura 44. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L⁻¹ e diferentes massas de MIP (2; 5, 10, 5, 20 mg) por 4 horas de agitação à 25 °C.



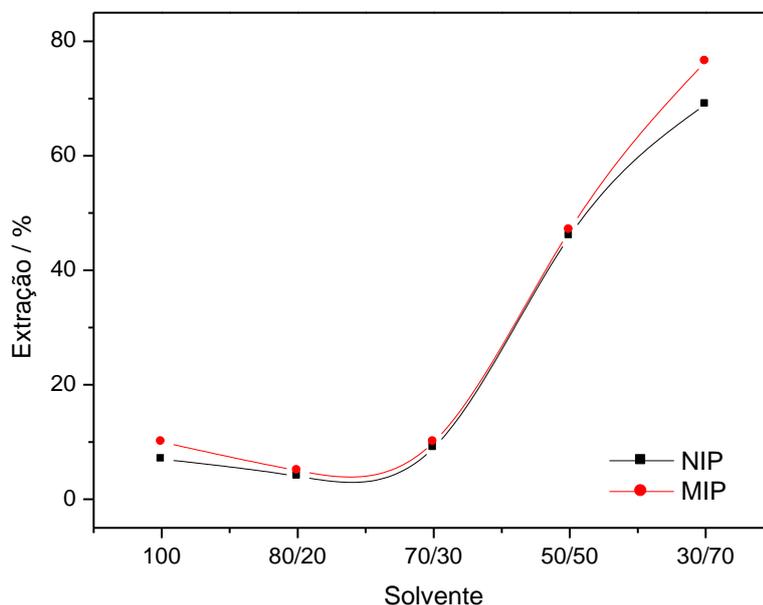
Fonte: Elaborada pela autora.

VII. 2.4.2 Estudo do solvente de religação

Ao realizar o estudo da massa de religação, observou-se que a porcentagem de religação estava muito baixa, dessa forma, acreditava-se que o que poderia influenciar significativamente era o solvente utilizado para tal procedimento. Por isso, o próximo passo foi determinar o melhor solvente de religação. Os solventes preliminares estudados foram etanol, metanol e acetonitrila. E neste estudo preliminar, verificou-se que o metanol, que já estava sendo utilizado no estudo da massa, era o solvente que melhor apresentava a religação do analito ao MIP.

Com esses resultados iniciais e levando em consideração que a amostra real será de urina, escolheu-se variar diferentes proporções de água no metanol. As proporções foram as seguintes: 100 % metanol, 80:20 metanol/água, 70:30 metanol/água, 50:50 metanol/água e 30:70 metanol/água. E conforme os resultados estão apresentados na Figura 45, mesmo não havendo uma diferenciação significativa entre MIP e NIP, observa-se que a melhor proporção da mistura é 20:80 metanol/água.

Figura 45. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L⁻¹ e diferentes proporções da mistura de solvente por 4 horas de agitação a 25 °C.

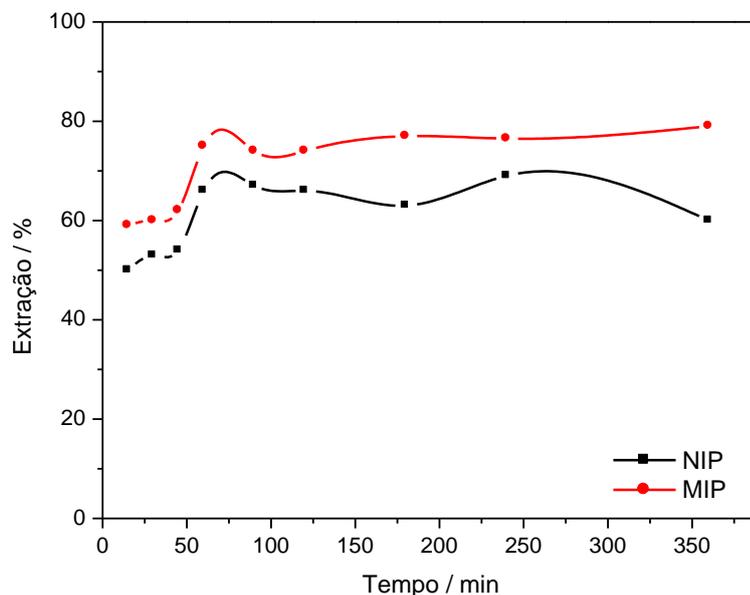


Fonte: Elaborada pela autora.

VII. 2.4.3 Estudo do tempo de religação

Com as condições otimizadas até o momento, realizou-se o estudo do tempo de equilíbrio para a interação do analito no MIP, uma vez que a capacidade de religação do analito pode variar significativamente. Nessa análise, as amostras preparadas consistiram da interação de 15 mg do MIP e NIP com 30 mg L⁻¹ de bumetanida em uma solução metanol/água (30:70) com diferentes tempos de interação (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos).

Figura 46. Capacidade de religação do analito em porcentagem de extração das cavidades poliméricas livres quando interagidas com solução de bumetanida 30 mg L⁻¹ e diferentes tempos de interação à 25 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados apresentados na Figura 38 mostram que a quantidade de BMT ligada aumenta com o aumento do tempo de extração até atingir o um patamar máximo em 60 minutos, onde é obtida uma maior capacidade de retenção no MIP, se mantendo constante após este tempo. Entretanto, escolheu-se o tempo de 180 minutos devido a maior diferenciação do MIP e NIP.

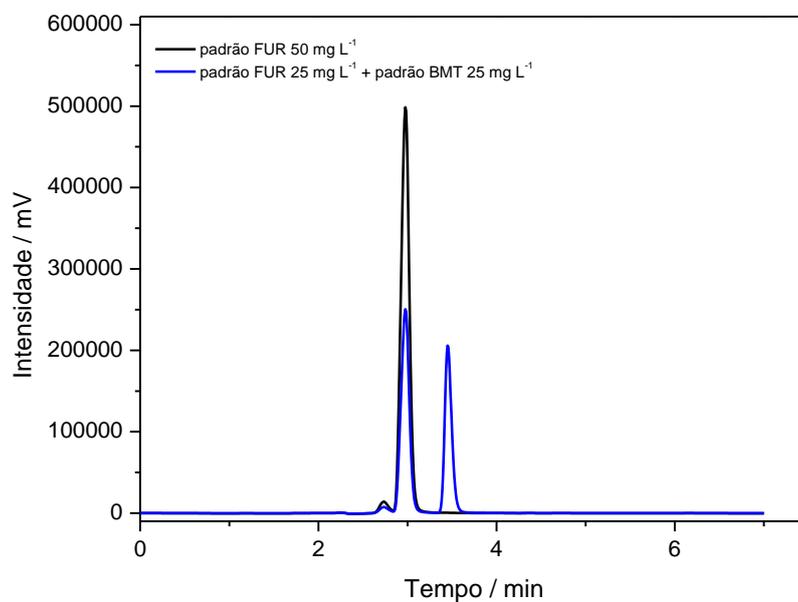
VII. 2.5. Estudos Preliminares da seletividade

A análise de seletividade tem como finalidade avaliar se as cavidades poliméricas formadas são seletivas ao analito, utilizando amostras binárias de bumetanida e um interferente (hidroclorotiazida e furosemida) via adsorções competitivas. Assim sendo possível verificar a funcionalidade do polímero formado.

Entretanto, primeiramente foi avaliada a possibilidade de se distinguir os fármacos interferentes com a bumetanida, no mesmo método cromatográfico de eluição da bumetanida.

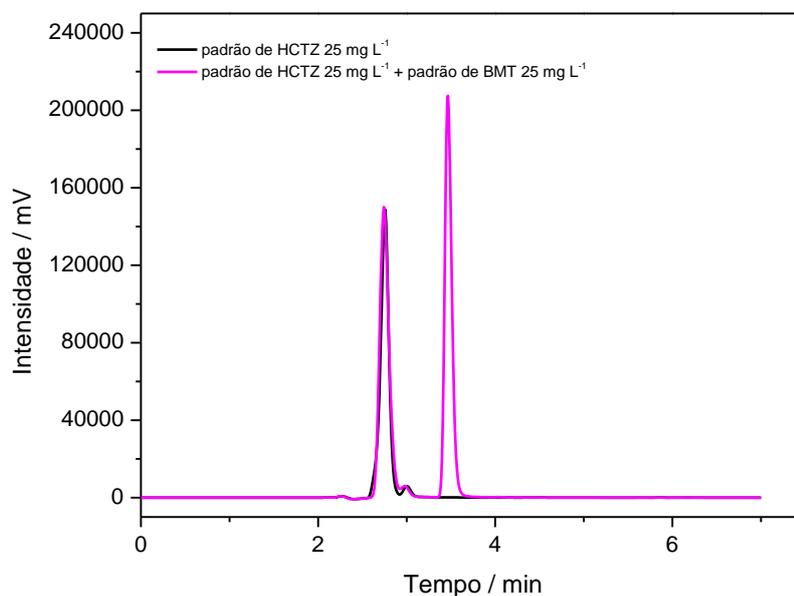
As Figuras 47 e 48 apresentam os cromatogramas tanto do padrão de cada interferente quanto a solução binária.

Figura 47. Cromatogramas de soluções padrões de Furosemida e Bumetanida com fase móvel de ACN/solução tampão fosfato (25 mM) a pH 2,5 (80:20).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 48. Cromatogramas de soluções padrões de Hidroclorotiazida e Bumetanida com fase móvel de ACN/solução tampão fosfato (25 mM) a pH 2,5 (80:20).



Fonte: Elaborada pela autora.

Em uma próxima etapa, para realmente avaliar as cavidades do MIP formado, deve ficar a massa polimérica (MIP e NIP) em 15 mg e a concentração dos diuréticos em 25 mg L^{-1} , sob agitação de 180 minutos das misturas binárias. E a partir deste estudo, podem ser calculados os seguintes parâmetros:

- Capacidade de ligação da bumetanida por grama de polímero (Q) em um determinado volume de solução de bumetanida (V), dado pela Equação 5.

$$Q = \frac{(C - C_f) \cdot V}{m_{pol}} \quad \text{Equação 5}$$

A capacidade de ligação depende da concentração da solução de tetraciclina (C) em que determinada massa polimérica (m_{pol}) é submetida à interação, de tal maneira que parte da tetraciclina religará nas cavidades poliméricas seletivas e o restante que ficou em solução será a concentração livre do analito (C_f).

- Coeficiente de partição (K_p) consiste na razão entre a capacidade de ligação do polímero e a concentração de bumetanida em solução.

- Fator de seletividade (α) é dado pela razão K_{pBMT} e $K_{pinterferente}$.

- Fator de impressão é definido como a razão entre o coeficiente de partição do polímero impresso (MIP) e não impresso (NIP), dado por I.

Para posteriormente aplicação do MIP como material adsorvente para extração em fase sólida.

VII. 2.6. Conclusões parciais

Apesar dos estudos serem preliminares, pode-se concluir que o MIP sintetizado apresenta-se como um material promissor para ser usado em extração em fase sólida e dessa forma, eliminar a interferência de um diurético no outro, além de possibilitar a realização de uma pré-concentração e com isso as análises poderão ser feitas em concentrações ainda menores.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho para a determinação de bumetanida e hidroclorotiazida, utilizando a combinação de complexos metálicos que mimetizam o sítio ativo das enzimas P450 e pasta de carbono apresentaram respostas sensíveis, estáveis, exatas, precisas e seletivas. Estudos eletroquímicos e características do sensor como sensibilidade, seletividade e afinidade, indicam que os complexos estejam se comportando como um catalisador biomimético da enzima P450 na oxidação da bumetanida e hidroclorotiazida.

Planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização dos experimentos dos métodos desenvolvidos. O uso destas ferramentas estatísticas permitiu que os experimentos fossem planejados e conduzidos de forma adequada com economia em termos de custos (reagentes e solventes) e tempo.

As técnicas eletroquímicas foram aplicadas com sucesso na análise de formulações farmacêuticas comerciais e urinas, as metodologias foram consideradas confiáveis e promissoras, visto que não houve tratamento das amostras e apresentaram bons resultados de recuperação.

O método desenvolvido apresentou sensibilidade analítica adequada para o propósito a que foi aplicado com adequada reprodutibilidade, precisão e exatidão. Desta forma, neste trabalho foram descritas propostas viáveis para a análise de rotina dos diuréticos tanto em urina quanto no controle de qualidade de medicamentos, oferecendo vantagens relacionadas à simplicidade operacional, rapidez, baixo consumo de reagentes e de solventes.

Outra vantagem importante é a possibilidade de construir sensores portáteis que permitam a análise *in situ* e menor tempo quando comparado a outros métodos, características importantes para análises de *doping*.

Nos estudos com polímeros de impressão molecular pode-se notar que os resultados obtidos com o monômero foi satisfatório e mostra ser promissor na utilização dos mesmos como material adsorvente para eliminar a interferência de diurético com o outro.

CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados obtidos no presente trabalho, surgem algumas perspectivas de trabalhos futuros que dão continuidade à linha de pesquisa envolvendo o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de diuréticos. Entre elas, destacam-se:

- a) Sabendo que os complexos ftalocianinacobre (II) e hemina atuam como possíveis catalisadores biomiméticos, apresentando respostas estáveis e seletivas para os analitos de estudo, espera-se obter respostas dos sensores com limite de quantificação (LQ) de 10 até 1000 vezes menores com o uso de técnicas de pré-concentração (stripping).
- b) Aplicação dos MIPs para bumetanida como material adsorvente (extração em fase sólida) para melhorar a seletividade dos sensores biomiméticos desenvolvidos e acoplá-los *offline* ou *online* aos sensores eletroquímicos já desenvolvidos. (sistemas bi-biomiméticos).
- c) Síntese, caracterização e aplicação de MIPs para a hidroclorotiazida.

CAPÍTULO IX. REFERÊNCIAS

- 1 ALTIMARI, L. R.; MORAES, A. C. de; TIRAPEGUI, J.; MOREAU, R. L. M. Cafeína e performance em exercícios aeróbicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 17-27, 2006.
- 2 TAVARES, O. Notas para uma análise da produção de ciências sociais sobre o doping no esporte. **Esporte e Sociedade**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, 2006. Disponível em: <<http://www.uff.br/esportesociedade/pdf/es206.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 3 De ROSE, E. H.; AQUINO NETO, F. R.; MOREAU, R. L. de M.; CASTRO, R. R. T. de. Controle antidoping no Brasil: resultados do ano de 2003 e atividades de prevenção. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 289-293, 2004.
- 4 De ROSE, E. H.; FEDER, M. G.; PEDROSO, P. R. E.; GUIMARÃES, A. G. Uso referido de medicamentos e suplementos alimentares nos atletas selecionados para controle de doping nos jogos Sul-Americanos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, p. 239-242, 2006.
- 5 SILVA, E. R. **Análise da potencialidade ergogênica e riscos associados ao uso do anti-inflamatório não-esteroidal ibuprofeno em corredores de endurance**. 2009. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência do Movimento Humano) - Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- 6 COMITÊ OLÍMPICO BRASILEIRO. **Informações sobre o uso de medicamentos no esporte**. 10. ed. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://lnb.com.br/documentos/Livreto%2BCOB%2BANTIIdopi.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 7 TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN. **Diuréticos e outros agentes de camuflagem**. Disponível em: <<http://www.doping-prevention.sp.tum.de/pt/substances-and-methods/diuretics-and-other-masking-agents/diuretics-and-other-masking-agents.html>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 8 WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **The 2014 prohibited list international standard**. 2013. Disponível em: <<https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-prohibited-list-2014-EN.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 9 PARANÁ. Secretaria da Educação. **Doping genético**. Disponível em: <<http://www.quimica.seed.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=98>>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 10 WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **The world anti-doping code: international standard for testing**. Montreal, 2012. Disponível em: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_IST_2012_EN.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2015.
- 11 AQUINO NETO, F. R. de. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 4, p. 138-148, 2001.

- 12 KINTZ, P. Detection of doping agents in human hair. In: _____. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. Boca Raton: CRC/ Taylor & Francis, 2007. p. 241-254.
- 13 DOPING: a química vai ao Pan. **Química Hoje**, n. 7, p. 14-16, jan.-mar. 2007.
- 14 MOREIRA, V.; MOREAU, R. L. M. Liquid chromatographic screening test for some diuretics of doping interest in human urine. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2753-2768, 2005.
- 15 AMENDOLA, L.; COLAMONICI, C.; MAZZARINO, M.; BOTRÈ, F. Rapid determination of diuretics in human urine by gas-chromatography-mass spectrometry following microwave assisted derivatization. **Analytica Chimica Acta**, v. 475, n. 1/2, p. 125-136, 2003.
- 16 SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. **Anatomia e fisiologia**. 3. ed. Lisboa: Lusodidacta, 2001.
- 17 ERNST, M. E.; GORDON, J. A. Diuretic therapy: key aspects in hypertension and renal disease. **Journal of Nephrology**, v. 23, p. 487-493, 2010.
- 18 GROSSMAN, E.; VERDECCHIA, P.; SHAMISS, A.; ANGELI, F.; REBOLDI, G. Diuretic treatment of hypertension. **Diabetes Cares**, v. 34. p. 5313-5319, 2011. suppl. 2.
- 19 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. O rim. In: _____. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 20, p. 296-299.
- 20 GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.
- 21 MULINARI, A. S. Diuréticos. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989.
- 22 MOTA, R. M. F. **Diuréticos**: revisão farmacológica e avaliação do consumo em Portugal. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- 23 SWEDBERG, K.; CLELAND, J.; DARGIE, H.; DREXLER, H.; FOLLATH, F.; KOMAJDA, M.; TAVAZZI, L.; SMISETH, O. A.; GAVAZZI, O.; HAVERICH, A.; HOES, A.; JAARSMA, T.; KOREWICKI, J.; LÉVY, S.; LINDE, C.; LOPEZ-SENDON, J.-L.; NIEMINEN, M. S.; PIÉRARD, L.; REMME, W. J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). **European Heart Journal**, v. 26, p. 1115-1140, 2005.
- 24 HUNT, S. A.; ABRAHAM, W. T.; CHIN, M. H.; FELDMAN, A. M.; FRANCIS, G. S.; GANIATS, T. G.; JESSUP, M.; KONSTAM, M. A.; MANCINI, D. M.; MICHL, K.; OATES, J. A.; RAHKO, P. S.; SILVER, M. A.; STEVENSON, L.W.; YANCY, C. W. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult. **Circulation**, v. 112, p. 1825-1852, 2005.

- 25 CARDOSO, J. N. Diuréticos na insuficiência cardíaca descompensada. In: BARRETO, A. C. P. (Ed.). **Insuficiência cardíaca descompensada**. São Paulo: Phoenix, 2007. p. 37-52.
- 26 O' NEIL, M. S. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th. ed. Whitehouse Station: Merck, 2001.
- 27 NEAL, L. B. Drogas cardiovasculares renais. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 11, p. 120-142.
- 28 SANTELLO, J. L.; MION JÚNIOR, D. Captopril associado a hidroclorotiazida no tratamento da hipertensão leve e moderada: estudo multicêntrico brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 5, p. 713-716, 1998.
- 29 RANKIN, G. O. Diuretics. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. Chap. 22, p. 518-531.
- 30 RIKKEOLA, M. L.; JUMPPANEN, J. H. Capillary electrophoresis of diuretics. **Journal of Chromatography A**, v. 735, n. 1/2, p. 151-164, 1996.
- 31 SASTRY, C. S. P.; PRASAD, T. N. V.; SASTRY, B. S.; RAO, E. Spectrophotometric methods for the determination of some diuretics using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. **Analyst**, v. 2, n. 113, p. 255-258, 1988.
- 32 ZIVANOVIC, L.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; VASILJEVIC, M.; RADULOVIC, D. Investigation of Fe(III) chloride as a colour reagent for the spectrophotometric determination of bumetanide in the pure form and in preparations. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 49, n. 4, p. 9-12, 1992.
- 33 POLLO, F. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de bumetanida em medicamentos**. 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- 34 HIOKI, M.; ARIGA, T.; SHINDO, H. Gas chromatographic determination of bumetanide and its urinary excretion in healthy volunteers. **Sankyo Kenkyusho Nenpo** v. 26, p. 85-93, 1974.
- 35 HAGEDORN, H. W.; SCHULZ, R. Detection of diuretics in horse urine by GC/MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 194-198, 1992.
- 36 CARRERAS, D.; IMAZ, C.; NAVAJAS, R.; GARCIA, M. A.; RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ, A. F.; CORTES, R. Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 683, n. 1, p. 195-202, 1994.

- 37 WELLS, T. G.; HENDRY, I. R.; KEARNS, G. L. Measurement of bumetanide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and application to bumetanide disposition. **Journal of Chromatography A**, v. 570, n. 1, p. 235-242, 1991.
- 38 CAMPINS-FALCO, P.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Improved detection limits for screening of diuretics by coupled liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 612, n. 2, p. 245-251, 1993.
- 39 LEGORBU, M. J.; ALONSO, R. M.; JIMINEZ, R. M.; ORTIZ, E. Quantitative determination of the loop diuretic bumetanide in urine and pharmaceuticals by high performance liquid chromatography with amperometric determination. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, n. 10, p. 425-430, 2001.
- 40 RUIZ-ANGEL, M. J.; TORRES-LAPAZIÓ, J. R.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Effects of pH and the presence of micelles on the resolution of diuretics by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, n. 1/2, p. 51-65, 2004.
- 41 CARDA-BROCH, S.; ESTEVE ROMERO, J. S.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Chromatographic determination of diuretics in urine samples using hybrid micellar mobile phases with fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 375, n. 1/2, p. 143-154, 1998.
- 42 PARK, H.; GWAK, H. I. K. Determination of bumetanide in human plasma by validated HPLC method and its application to single-dose pharmacokinetics. **Korean Pharmaceutical Society**, v. 35, n. 1, p. 51-55, 2005.
- 43 PATEL, D. S.; SHARMA, N.; PATEL, M. C.; PATEL, B. N.; SHRIVASTAV, P. S.; SANYAL, M. Application of a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bumetanide in human plasma for a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 365-370, 2012.
- 44 GONZALEZ, E.; BECERRA, A.; LASERNA, J. J. Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 687, n. 1, p. 145-150, 1996.
- 45 SOLICH, P.; POLYDOROU, C. K.; KOUPPARIS, M. A.; EFSTATHIOU, C. E. Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution studies of bumetanide in pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v. 438, n. 1/2, p. 131-136, 2001.
- 46 LEGOBURU, M. J.; ALONSO, R. M.; JIMENEZ, R. M. Oxidative behavior of the sulfonamidic diuretic bumetanide at carbon paste electrode. **Electroanalysis**, v. 5, n. 4, p. 333-338, 1993.

- 47 BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2001. v. 2.
- 48 ERK, N. Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 901-912, 2002.
- 49 KOWALCZUK, D.; HOPKALA, H. Application of derivative spectrophotometry for simultaneous determination of quinapril and hydrochlorothiazide in the combination tablets. **Journal of AOAC International**, v. 87, p. 847-851, 2004.
- 50 HEMKE, A. T.; BHURE, M. V.; CHOUHAN, K. S.; GUPTA, K. R.; WADODKAR, S. G. UV- spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and olmesartan medoxomil in pharmaceutical formulation. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 1156-1161, 2010.
- 51 MANISH, K.; AJAY, G.; SINGH, M. P. Development and validation of UV- spectrophotometric method for the simultaneous estimation of telmisartan HCl e hydrochlorothiazide as API and in combination in tablet dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science**, v. 3, n. 3, p. 73-86, 2014.
- 52 GOTARDO, M. A.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Eclética Química**, v. 30, n. 2, p. 17-24, 2005.
- 53 PEI, B. F.; GUO, H.; ZHENG, L. C.; SUN, M.; QIU, J. F.; CHEN, H.; HU, Y. H. Determination of hydrochlorothiazide in plasma by HPLC: application to a pharmacokinetic study. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 33, n. 9, p. 1470-1474, 2014.
- 54 GOWEKAR, N. M.; MADHEKAR, M. D. A validated RP-HPLC method for the determination of hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 4, n. 2, p. 4528-4536, 2012.
- 55 WANG, R.; YANG, K.; TAN, J.; HU, Y.; CHENG, J.; YU, C.; YU, Q.; FAN, H. Determination of hydrochlorothiazide in healthy human plasma and its pharmacokinetic study. **Zhongguo Yaoye**, v. 20, p. 17-18, 2011.
- 56 SUN, Y.; WEI, Y.; WANG, K.; SHAO, Q. HPLC determination of hydrochlorothiazide in human plasma. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v. 30, p. 396-398, 2010.
- 57 SOUSA, C. E. M.; BEDOR, D. C. G.; GONCALVES, T. M.; RAMOS, V. L. S.; CARVALHO, A. L. M.; ALBUQUERQUE, M. M.; SANTANA, D. P. Rapid determination of hydrochlorothiazide in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 793-797, 2009.
- 58 ZHENG, X. Y.; LU, M. H.; ZHANG, L.; CHI, Y. W.; ZHENG, L. H.; CHEN, G. N. An online field-amplification sample stacking method for the determination of diuretics in urine by capillary electrophoresis-amperometric detection. **Talanta**, v. 76, p. 15-20, 2008.

- 59 HILLAERT, S.; van den BOSSCHIE, W. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 329-339, 2003.
- 60 FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.
- 61 OUYANG, J.; BAEYENS, W. R. G.; DELANGHE, J.; Van der WEKEN, G.; CALOKERINOS, A. C. Cerium(IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide. **Talanta**, v. 46, n. 5, p. 961-968, 1998.
- 62 PULGARIN, J. A. M.; MOLINA, A. A.; OLIVARES NIETO, G. P. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by time resolved chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, n. 1/2, p. 37-43, 2004.
- 63 RAZAK, O. A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 433-440, 2004.
- 64 MARTÍN, M. E.; HERNANDEZ, O. M.; JIMENEZ, A. I.; ARIAS, J. J.; JIMENEZ, F. Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography: simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, v. 381, p. 247-256, 1999.
- 65 MALEH, H. K.; 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, p. 880-887, 2009.
- 66 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**, v. 188, p. 263-270, 2013.
- 67 SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of the potentialities of a carbon nanotubes/silicone rubber composite electrode in the determination of Hydrochlorothiazide. **Analytical Letters**, v. 45, p. 1454-1466, 2012.
- 68 BEITOLLAHI, H.; HAMZAVI, M.; TORKZADEH-MAHANI, M. Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 297-305, 2015.
- 69 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Journal Pure and Applied Chemistry**, v. 63, p. 1247-1250, 1991.
- 70 ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.

- 71 WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3rd ed. Hoboken: Wiley-VCH, 2006.
- 72 GRUNDLER, P. **Chemical sensors: an introduction for scientists and engineers**. Berlin; New York: Springer, 2007.
- 73 CRESPILO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, 2004.
- 74 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- 75 CARVALHO, J. M. **Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- 76 BARD, A. J.; FAULKNER, R. D. **Electrochemical methods: fundamental and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- 77 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.
- 78 FUJIWARA, S. T. **Filme fino do polieletrólito cloreto de 3-n-propilpiridínico silsesquioxano sobre SiO₂/Al₂O₃: preparação, caracterização e aplicações**. 2002. 203 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- 79 OLIVEIRA, M. C. Q.; TANAKA, A. A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. P. T. Studies of the electrochemical degradation of acetaminophen using a real-time biomimetic sensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2616-2621, 2011.
- 80 CHOU, L. C. S.; LIU, C. C. Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection. **Sensors and Actuators B**, v. 110, p. 204-208, 2005.
- 81 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Tris (2,2'-bipyridil) copper(II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in amperometric sensor construction. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 855-865, 2003.
- 82 YE, L.; HAUPT K. Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1887-1897, 2004.
- 83 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a nafion membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 536, n. 1, p. 71-81, 2002.

- 84 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 2, p. 215-223, 2002.
- 85 KATAKY, R.; MORGAN, E. E. Potential of enzyme mimics in biomimetic sensors: a modified-cyclodextrin as a dehydrogenase enzyme mimic. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 1407-1417, 2003.
- 86 SOTOMAYOR, M. D. P.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, p. 123-128, 2002.
- 87 ZAGAL, J.; SEM, R. K.; YEAGER, E. Oxygen reduction by Co(II) tetrasulfonatephthalocyanine irreversibly adsorbed on a stress- annealed pyrolytic-graphite electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 83, p. 207-213, 1977.
- 88 De WAEL, K.; PEETERS, K.; BOGAERT, D.; BUSCHOP, H.; VINCZE, L.; ADRIAENS, A. Electrochemical and spectroscopic characterization of a gold electrode modified with 3,4',4'',4''' copper (II) tetrasulphonated phthalocyanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, p. 212-218, 1977.
- 89 SKOROBOGATY, A.; SMITH, T. D. Autoxidation of thiols catalyzed by cobalt (II) tetrasulfophthalocyanine adsorbed on a ion-exchange resin. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 16, p. 131-147, 1982.
- 90 HOWE, L.; ZHANG, J. Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 67, p. 90-96, 1998.
- 91 BRESLOW, R. Biomimetic control of chemical selectivity. **Accounts of Chemical Research**, v. 13, p. 170-177, 1980.
- 92 ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1576, 1958.
- 93 CRESPILO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, 2004.
- 94 SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R.; KUBOTA, L. T. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of p-aminophenol. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1919-1929, 2007.
- 95 CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo composto à base de grafite-araldite®: aplicações didáticas. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2194-2198, out. 2008.

- 96 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("molecularly imprinted polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.
- 97 GRASSI, V. **Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo**. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- 98 MAIER, N. M.; BUTTINGER, G.; WELHARTIZKI, S.; GAVIOLI, E.; LINDNER, W. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin a from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 103-111, 2004.
- 99 MAHONY, J. O.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.
- 100 MARTÍN-ESTEBAN, A.; Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds; **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 370, p. 795-802, 2001.
- 101 ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, **Journal Chromatography B**, v. 745, p. 3-13, 2000.
- 102 VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.
- 103 HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, p. 344-350, 1999.
- 104 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087-1101, 2005.
- 105 MARX, A.; GIERSH, T.; HOCK, B. Immunoaffinity chromatography of s-Triazines. **Analytical Letters**, v. 28, p. 267-279, 1995.
- 106 PICHON, V.; CHEN, L.; HENNION, M.-C.; DANIEL, R.; MARTEL, A.; LEGOFFIC, F.; ABIAN, J.; BARCELO, D. Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2451-2460, 1995.
- 107 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 93, n. 2, p. 163-168, July 1978.

108 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Publica o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 28 jul. 2015.

109 FANTUZZI, A.; MAK, L. H.; CAPRIA, E.; DODHIA, V.; PANICCO, P.; COLLINS, S.; GILLARDI, G. A. New standardized electrochemical array for drug metabolic profiling with human cytochromes P450. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3831-3839, 2004.

110 WANG, K.; LI, N.; WU, J.; JU, C.; YAN, J.; LIU, Q.; QIU, B. TiO₂-decorated graphene nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor, **Analyst**, v. 136, p. 3349-3354, 2011.

111 ZHIGUOA, G.; SHUPINGA, Y.; ZAIJUNA, L.; XIULANB, S.; GUANGLIA, W.; YINJUNC, F.; JUNKANGA, L. An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe-CdS core-shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene-gold nanocomposite and gold nanoparticle. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 9162-9167, 2011.

112 ZHANG, Z.; WANG, D.; ZHANG, L.; DU, M.; CHEN, G. Determination of diuretics in human urine by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 133, n. 9, p. 1187-1194, 2008.

113 VETUSCHI, C.; GIANNANDREA, A. Anti-beer evaluation of hydrochlorothiazide and losartan by UV derivative spectrophotometry. **Analytical Letters**, v. 36, n. 5, p. 1051-1063, 2003.

114 SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery**, v. 57, p. 1779-1794, 2005.

115 TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

116 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria no Infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. Cap. 2, p. 70-122.

117 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Espectrometria no infravermelho. In: _____. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. Cap. 2, p. 15-99.