

ADEMAR WONG

**Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril
em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Maria Del Pilar T. Sotomayor

**Araraquara
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Wong, Ademar

W872d Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico/ Ademar Wong. – Araraquara : [s.n], 2010
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

1. Química analítica. 2. Captopril. 3. Sistema em fluxo.
4. Pasta de carbono. 5. Sensores biomiméticos. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Ademar Wong

Data de Nascimento: 18 de junho de 1980

Naturalidade: São Carlos

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteiro

FORMAÇÃO

Ensino Médio

E.E.P.S.G. Dr Álvaro Guião, São Carlos – SP, Período: 1996 a 1998.

Graduação

Licenciatura em Química – Instituto de Química da UNESP - Araraquara.

Período: 02/2003 a 12/2007.

Pós-Graduação

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientadora Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor.

Título do Projeto: “Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico”.

Período: 08/2008 a 08/2010.

Disciplinas Cursadas: Quimiometria, Metrologia, Técnicas Eletroanalíticas II e Tópicos Especiais: Biossensores Transdutores e Receptores. Todas aprovadas com conceito A.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Wong, A.; Silva, A.C.M.; Sotomayor, M.D.P.T. “Desenvolvimento de um sensor biomimético para determinação de ranitidina”. XVI Encuentro Científico Internacional 2009 de verano (ECI 2009v), Lima – Peru, janeiro de 2009.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T. “Desenvolvimento de um sensor biomimético para captopril baseado em pasta de carbono modificada com *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II)”. 39ª Semana da Química do IQ-UNESP/Araraquara, outubro de 2009.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T “Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras farmacêuticas”. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, maio de 2010.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T “Acoplamento de sensor biomimético para determinação de captopril a sistema por injeção em fluxo (FIA)”. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, maio de 2010.
- Wong, A.; Sotomayor, M.D.P.T “Comprovação do caráter biomimético da enzima P450 pela *bis*(piridil)ftalocianinaferro(II) através da oxidação seletiva de captopril”. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, maio de 2010.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- III Evento de Educação em Química, “Alternativas Didáticas para o Ensino de Química” (20 de agosto de 2005).
- XXXVI Semana da Química “Ciência, Tecnologia e Sociedade: A busca do conhecimento “Meio Ambiente e Biocombustíveis” ministrado: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos (25 a 29 de setembro de 2006).
- V Evento de Educação em Química, “Ensino de Química: Perspectivas e Aplicações” (04 a 07 de agosto de 2007).
- Mini-curso “Ciência, Tecnologia e Sociedade, ministrado: Prof. Dr. Wilson Pereira dos Santos (04 a 07 de agosto de 2007).

- Mini-curso: Chemical Sensors, realizado no Ribeirão Preto, 22 de agosto 2008.
- Workshop Nacional sobre Biossensores, realizado no IQ/CAr, 08 e 09 de outubro 2009.
- Semana da Química, realizada no IQ/CAr, 18 a 23 de outubro de 2009, Minicurso: Química Farmacêutica: Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos orgânicos e inorgânicos, realizado na 39ª Semana da Química do IQ-UNESP/Araraquara.
- 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado em Águas de Lindóia, entre 28 e 31 de maio de 2010.

BOLSAS RECEBIDAS

- Bolsa de Incentivo Técnico-Acadêmico – BITA – INFORMÁTICA - período de 01/03/2003 a 31/12/2004 – Departamento de Físico-Química.
- Bolsa de Apoio ao Estudante – PAE/PROEX (BAE) – período de 01/04/2005 a 31/07/2005 – Departamento de Físico-Química.
- Bolsa PIBIC – período 31/07/2005 a 10/04/2006. Título do projeto: Estabilização de cristais líquidos expandidos hexagonais e o seu emprego como moldes na preparação de zircônia mesoporosa – Departamento de Físico-Química.
- Bolsa de Apoio ao Estudante – PAE/PROEX (BAE) período de 11/04/2007 a 11/12/2007- Departamento de Bioquímica e Tecnologia.
- Bolsa CAPES – Mestrado, período de 08/2008 a 02/2009.
- Bolsa FAPESP – Mestrado, período de 03/2009 a 08/2010.

PUBLICAÇÕES


- GOBATTO, D. F.; WONG, A.; LANZA, MARCOS R. V. ; SOTOMAYOR, MARIA D.P.T. Development of a biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, 2010 (no prelo).
- WONG, A. ; LANZA, M. R. V. ; SOTOMAYOR, M. P. T. Development and application of a highly selective biomimetic sensor for detection of captopril, an important ally in hypertension control. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.13, n.8, p 666- 674, 2010 (Anexo 1).

ADEMAR WONG

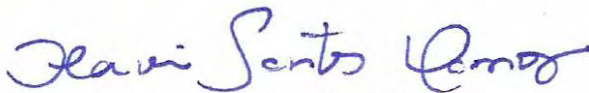
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 27 de agosto de 2010.

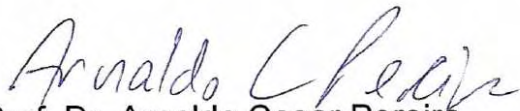
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Flavio Santos Damos
Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina



Prof. Dr. Arnaldo Cesar Pereira
Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ, São João Del-Rei

Dedicatória

Cumprimente as pessoas. Isso se chama amizade!

Deseje a cada um o melhor. Isso se chama sinceridade!

Programe o seu dia, a sua semana. Isso se chama ação!

Acredite que tudo dará certo. Isso se chama fé!

Faça tudo com alegria. Isso se chama entusiasmo!

Dê o melhor de si. Isso se chama perfeição!

Ajude a quem precisa. Isso se chama doação!

Compreenda que nem todos são como você. Isso se chama tolerância

Receba as bênçãos com gratidão. Isso se chama humildade!

Essa é uma fórmula infalível que vai ajudar a sua vida,

Ser mais feliz."

Eu dedico este trabalho

A minha sobrinha Cristina que pela sua simpatia e alegria ajudou-me a enfrentar muitos problemas, dentre eles, encontrar força para terminar o mestrado.

Ao meu irmão Paulo e minha cunhada Dalva que sempre me apoiaram e estiveram presente na minha vida.

Ao meu sobrinho Paulinho pelas risadas e por sempre me dizer que para vencer os desafios, é necessário dar “All in”.

E aos demais da família Tereza, Sara, Antônio, Ricardo, Rosa, Julinho que também torceram pelo meu mestrado.

E principalmente minha mãe que é uma pessoa que esteve comigo a vida toda, e do jeito dela, sempre me apoiou e deu conselhos para eu poder seguir adiante com minha vida.

Agradecimentos

Agradeço neste mestrado,

A minha orientadora Maria Del Pilar Taboada Sotomayor que me ajudou, apoiou e confiou no meu trabalho, do começo ao fim.

Aos professores Nelson Stradiotto, Hideko Yamanaka, Maria Valnice.

Ao grupo de Eletroanalítica e amigos como que me ajudaram quando precisei.

Ao professor Marcos Lanza da USP de São Carlos que disponibilizou o equipamento de cromatografia (HPLC) para análises de minhas amostras.

Aos funcionários da Biblioteca/IQ que me ajudaram em minhas pesquisas.

Ao Instituto de Química, a Capes e a Fapesp pela bolsa concedida.

RESUMO

Eletrodos quimicamente modificados à base de pasta de carbono foram construídos para determinação de captopril, empregando catalisadores biomiméticos em potencial da enzima P450. O complexo que permitiu obter os resultados mais satisfatórios foi o *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II) [Fe(dipy)Pc].

O sensor proposto foi avaliado em batelada e em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), e as condições de análise foram devidamente otimizadas empregando a amperometria. Em batelada obtiveram-se os melhores resultados aplicando potencial de 0,175 V vs Ag|AgCl(KCl_{sat}) e usando solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito em pH 8,0. Nestas condições observou-se uma faixa linear de resposta para o sensor entre 25 e 165 µmol L⁻¹; com uma sensibilidade de 2.315(±61) µA L mol⁻¹ e um limite de detecção e quantificação de 0,9 e 3,1 µmol L⁻¹, respectivamente.

Em sistema em fluxo, os melhores resultados foram obtidos aplicando potencial de 0,100 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat}) em solução carregadora de tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ e pH 8,0, com volume de amostra injetado de 75 µL e vazão de 1,4 mL min⁻¹. A faixa linear de resposta obtida no sistema em fluxo (FIA) foi entre 5,0 x 10⁻⁵ e 2,5 x 10⁻² mol L⁻¹, com uma sensibilidade de 210(±1) µA L mol⁻¹ e uma reprodutibilidade menor que 4%, avaliado pelo valor do desvio padrão médio relativo (R.S.D.) para sete injeções consecutivas de solução padrão de captopril 2,5 x 10⁻³ mol L⁻¹.

A biomimetecidade do sensor foi estudada, assim como a seletividade e seus possíveis interferentes. O sensor biomimético foi aplicado na análise de formulações comerciais, amostras biológicas e ambientais (águas de rios e esgoto). Os resultados obtidos quando comparados com o método oficial de análise baseado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), mostraram boa eficiência do sensor desenvolvido na quantificação do captopril.

Palavras-Chave : sensores biomiméticos. pasta de carbono. captopril. sistema de análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

Chemically modified electrodes based on carbon paste were constructed for determination of captopril, catalysts employing biomimetic of the P450 enzyme. The compound that allowed to obtain the most satisfying results was the iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) complex [Fe(dipy)Pc].

The proposed sensor was evaluated in batch system and flow injection analysis (FIA) and the analysis conditions were properly optimized employing amperometry. In batch experiments were obtaining the best results by applying a potential of 0,175 V vs Ag | AgCl (KCl_{sat}) and using 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer at pH 8.0, the electrolyte. These conditions was observed under the linear response range for the sensor between 25 and 165 μmol L⁻¹, with a sensitivity of 2315 (± 61) μA L mol⁻¹ and quantification and detection limits of 0.9 and 3.1 μmol L⁻¹, respectively . In the flow system the best results were obtained at the potential of 0,1 V vs. Ag | AgCl (KCl_{sat}) in carrier solution of 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer at pH 8.0, with the injected sample volume of 75 mL and flow rate of 1.4 mL min⁻¹. The linear response range obtained in the FIA system was between 5.0 x 10⁻⁵ and 2.5 x 10⁻² mol L⁻¹, with a sensitivity of 210 (± 1) μA L mol L⁻¹ and the reproducibility value lower than 4 %, calculated the relative standard deviation (RSD) for seven consecutive injections of standard solution of captopril 2.5 x 10⁻³ mol L⁻¹.

The biomimetic characteristics of the sensor was studied and the selectivity and possible interfering. The biomimetic sensor has been applied to analysis of commercial formulations, biological and environmental samples (river water and sewage).

The results compared with the official method of analysis based on high performance liquid chromatography (HPLC) showed the good efficiency of this sensor is developed quantification of captopril.

Keywords: biomimetic sensor, carbon past electrodes, captopril, system of flow injection analysis.

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1 - Rota simplificada da entrada de fármacos nos ambiente aquáticos	24
Figura 2 - Formula estrutural do Captopril	26
Figura 3 - Estruturas químicas dos metabólitos após a ingestão no controle da hipertensão. (A) Dímero de captopril e (B) Dissulfeto de captopril-cisteína	27
Figura 4 - Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450	32
Figura 5 - Estrutura química do complexo <i>bis</i> (piridil)ftalocianinaferro (II)	33
Figura 6 - Artigos publicados sobre eletrodos de pasta de carbono utilizando a base de dados, SciFinder Scholar versão 2007	37
Figura 7 - Construção do eletrodo de pasta de carbono. A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo utilizado para montagem do sensor	43
Figura 8 - Representação do sistema de análise em batelada em (A) Esquema representativo e (B) Fotografia da aparelhagem empregada	45
Figura 9 - Representação esquemática do sistema de injeção em fluxo (FIA) em (A) e a fotografia do sistema em (B)	47
Figura 10 - Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu® utilizado nas análises das amostras de captopril	49
Figura 11 - Fotografia de uma amostra biológica que foi analisada	51
Figura 12 - Fotografia de uma localidade do rio Jacaré-Guaçu que atravessa o município de Araraquara	51
Figura 13 - Fotografias da entrada do esgoto bruto na ETE de Monjolinho no município de São Carlos. (A) Vista próxima. (B) Vista Ampla	52
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono não modificada (A e B) e modificada com [Fe(dipy)Pc] (C e D)	54
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [Fe(dipy)Pc] em diferentes concentrações de captopril	56

Figura 16 - Variação da corrente de pico anódica (Δi) vs $v^{1/2}$ no sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo [Fe(dipy)Pc]. Medidas realizadas em solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 24,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de captopril	57
Figura 17 - Variação da corrente de pico anódica normalizada ($\Delta i v^{1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 24,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de captopril	58
Figura 18 - Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do tipo de tampão usado como eletrólito suporte nas análises amperométricas para determinação de captopril.	59
Figura 19 - Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão TRIS. Medidas realizadas em 0,175V vs Ag AgCl (KCl _{sat})	60
Figura 20 - Perfil amperométrico do sensor nas condições otimizadas, obtido para adições sucessivas de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de captopril	62
Figura 21 - Curva analítica obtida com os resultados obtidos na amperometria da Figura 20	62
Figura 22 - Estruturas químicas do captopril e dos fármacos avaliados no estudo da seletividade do sensor	65
Figura 23 - Perfil hiperbólico do sensor à base de <i>bis</i> (piridil)ftalocianinaferro (II)	69
Figura 24 - Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 23	70
Figura 25 - Mecanismo de resposta proposto para a oxidação de captopril na superfície do sensor à base de [Fe(dipy)Pc]	71
Figura 26 - Perfil da curva de adição de padrão para a análise de medicamento contendo 25 mg por comprimido de captopril	73
Figura 27 - Cromatograma obtido a partir da injeção de $3,45 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (75 ppm) de solução padrão de captopril. T _R : Tempo de retenção	73
Figura 28 - Perfil da curva analítica obtida para o método de referência em diferentes concentrações de captopril	74
Figura 29 - Influência do volume injetado de amostra no perfil da resposta do sensor em fluxo, a uma vazão de 1,4 mL min ⁻¹	79
Figura 30 - Perfil da resposta do sensor em fluxo no estudo da vazão do sistema, mantendo o volume fixo em 75 μL	79

Figura 31 - Perfil de resposta do sensor em fluxo em função da sensibilidade vs potencial aplicado. Medidas realizadas injetando 75 μL de soluções padrão de captopril; a uma vazão de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ em fluido carregador de tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0)	80
Figura 32 - FIAGRAMA otimizado para o sensor proposto no intervalo de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril. Medidas realizadas em tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), $0,1 \text{ V}$ vs $\text{Ag} \text{AgCl} (\text{KCl}_{\text{sat}})$ e volume injetado de amostra de $75 \mu\text{L}$	81
Figura 33 - Curvas analíticas construídas no sentido crescente e decrescente de concentrações. Medidas realizadas em tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) e aplicando potencial de $0,1 \text{ V}$ vs $\text{Ag} \text{AgCl} (\text{KCl}_{\text{sat}})$ e volume injetado de $75 \mu\text{L}$	82
Figura 34 - Estudo da repetibilidade para sete injeções consecutivas de soluções de captopril $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	83
Figura 35 - Perfil da resposta do sensor em fluxo para avaliação da estabilidade operacional do sistema	84
Figura 36 - FIAGRAMA obtido na análise pelo método da adição de padrão da urina do usuário de medicamento a base de captopril. [Captopril] em mol L^{-1} : A = $5,0 \times 10^{-5}$; B = $2,0 \times 10^{-4}$; C = $4,0 \times 10^{-4}$; D = $5,0 \times 10^{-4}$	88
Figura 37 - Perfil da curva analítica da adição de padrão na análise da urina do usuário de captopril	89
Figura 38 - FIAGRAMA obtido na análise pelo método da adição de padrão do esgoto bruto da ETE da cidade de Araraquara. [Captopril] em mol L^{-1} : A = $5,0 \times 10^{-5}$; B = $1,8 \times 10^{-4}$; C = $2,8 \times 10^{-4}$; D = $3,8 \times 10^{-4}$; E = $5,0 \times 10^{-4}$	91
Figura 39 - Perfil da curva analítica da adição de padrão na análise do esgoto da ETE de Araraquara	91

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1 - Exemplos de drogas metabolizadas por isoenzimas citocromo P450	31
Tabela 2 - Artigos publicados em 2009/2010 mostrando o uso de sensores à base de pasta de carbono para determinação de analitos de interesse farmacêutico e ambiental	38
Tabela 3 - Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de captopril	61
Tabela 4 - Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de captopril em sistema batelada	63
Tabela 5 - Fármacos analisados no estudo da seletividade	64
Tabela 6 - Comparação dos resultados de amostras farmacêuticas obtidas com o sensor proposto em batelada e com o método oficial de análise	75
Tabela 7 - Dados da recuperação do captopril em amostras biológicas de seis doadores voluntários	76
Tabela 8 - Dados obtidos na recuperação de captopril em amostras de águas de rios	77
Tabela 9 - Parâmetros otimizados e características analíticas do sensor biomimético em FIA	85
Tabela 10 - Valores de recuperação (%) para solução 5,0 mg de captopril na presença de compostos interferentes na razão 10:1 (m/m) interferente: captopril	86
Tabela 11 - Comparação dos resultados obtidos com o sensor proposto em sistema por injeção em fluxo e o método oficial de análise	87
Tabela 12 - Dados dos experimentos de recuperação realizado no sistema FIA, a partir da urina enriquecida com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril de seis doadores voluntários saudáveis	88
Tabela 13 - Valores da recuperação de captopril encontrados no esgoto bruto e tratado após enriquecimento com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril	90
Tabela 14 - Resultados obtidos pelo sensor e HPCL na análise de amostras de esgoto	92

Lista de Abreviaturas

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Conama - Conselho Nacional do Meio Ambiente

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

MIP - Polímero Impresso Molecularmente

FIA - Análise por Injeção em Fluxo

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

TRIS – *Tris* (hidroxi-metil)aminometano

Hepes - 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

Pipes - 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid sodium salt

Ox – Espécie oxidada

Red – Espécie reduzida

sat – saturado

ppm - partes por milhão (mg L^{-1})

K_{MM}^{app} - Constante aparente de Michaelis-Menten

CYP1A2 - os termos *CYP* correspondem ao citocromo P450, o número 1 à família e 2A à subfamília

CYP2D6 - os termos *CYP* correspondem ao citocromo P450, o número 2 à família e D6 à subfamília

CYP2C9 - os termos *CYP* correspondem ao citocromo P450, o número 2 à família e C9 à subfamília

CYP3A4 - os termos *CYP* correspondem ao citocromo P450, o número 3 à família e A4 à subfamília

S/N – razão sinal ruído

EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado

[Fe(dipy)Pc] – *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II)

Lista de Símbolos

i - corrente elétrica

V - Volts

v - velocidade de varredura

μ - micro

A – ampères

t - tempo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Os fármacos	21
1.1.1. Importância dos fármacos	21
1.1.2. Efluentes provenientes do uso contínuo de fármacos	21
1.1.3. Impacto Ambiental dos fármacos	22
1.1.3.1. Legislação Ambiental	24
1.1.4. Anti-hipertensivos	25
1.1.4.1. Captopril	26
1.1.4.1.1. Mecanismo de ação	26
1.1.4.1.2. Farmacocinética e Farmacodinâmica	27
1.1.4.1.3. Métodos de determinação de captopril	28
1.2. Sensores Eletroquímicos	28
1.2.1. Sensores Amperométricos	29
1.2.1.1. Sensores Biomiméticos	30
1.2.1.1.1. Enzima P450	31
1.2.2. Eletrodo quimicamente modificado (EQM)	33
1.2.2.1. Modificação da superfície do eletrodo	34
1.2.2.1.1. Adsorção	34
1.2.2.1.2. Ligação covalente	35
1.2.2.1.3. Oclusão	36
1.2.3. Desenvolvimento de sensores químicos utilizando eletrodo de pasta de carbono	36
1.3. Sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)	39

1.4. Método Analítico de calibração	40
1.4.1. Padrão externo ou curva de calibração	40
1.4.2. Método de adição de padrão múltipla	40
2. OBJETIVO	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1. Instrumentação	42
3.2. Reagentes e Soluções	42
3.3. Construção dos sensores biomiméticos	43
3.4. Medidas Eletroquímicas	44
3.4.1. Sistema de análise em batelada para determinação de captopril	44
3.4.2. Sistema de análise em fluxo para determinação de captopril	46
3.5. Aplicação e validação do sensor biomimético à base de [Fe(dipy)Pc] para determinação de captopril	48
3.5.1. Estudo de Seletividade	48
3.5.2. Preparação das amostras de medicamentos	48
3.5.2.1. Determinação cromatográfica de captopril	49
3.5.2.2. Avaliação da resposta dos possíveis compostos interferentes	50
3.5.3. Obtenção e preparação das amostras biológicas	50
3.5.4. Obtenção e preparação das amostras ambientais (rios)	51
3.5.5. Obtenção e preparação das amostras ambientais de ETES	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.1. Estudos em batelada	54
4.1.1. Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos voltamétricos	54
4.1.2. Otimização da resposta do sensor	58

4.1.3. Perfil de resposta do sensor	61
4.1.4. Estudo da seletividade	64
4.1.5. Verificação da Biomimeticidade do sensor	69
4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor	71
4.1.7. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras	72
4.1.7.1. Análise de medicamentos	72
4.1.7.2. Análise de amostras biológicas	76
4.1.7.3. Análise de amostras ambientais (Rios)	77
4.2. Estudos em fluxo	78
4.2.1. Otimização do sistema FIA	78
4.2.1.1. Vazão e volume injetado de amostra	78
4.2.1.2. Estudo do potencial aplicado em fluxo	80
4.2.3. Perfil de resposta do sistema FIA	81
4.2.4. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras empregando o sistema FIA	85
4.2.4.1. Estudo de interferentes	85
4.2.4.2. Análise de medicamentos	87
4.2.4.3. Análise de amostra biológica	88
4.2.4.4. Análise de amostra ambiental proveniente de diversas ETEs	90
5. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94

INTRODUÇÃO

1.1. Fármacos

A palavra fármaco é a tradução do grego *phármakon* que tanto designa medicamento como veneno, ou seja, qualquer substância capaz de atuar no organismo seja em sentido benéfico ou maléfico. Para a organização mundial de saúde (OMS), o conceito de fármaco restringe-se às substâncias usadas pelo homem para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças¹.

Em linguagem médica tem sido utilizado de preferência com sentido restrito para designar uma substância única, orgânica ou inorgânica, de composição química conhecida, que serve para o combate ou controle de alguma doença específica¹.

1.1.1. Importância dos fármacos

Graças ao uso dos fármacos muitas doenças crônicas são mantidas sob controle, prevenindo seu agravamento. Além de corrigir e resgatar o estado de saúde das populações, os fármacos podem prolongar a vida em casos de doenças terminais ou preveni-las, salvaguardando a saúde. Em qualquer destas circunstâncias os fármacos são responsáveis pela melhoria da qualidade de vida, contribuindo também para o contínuo aumento da esperança de vida da humanidade^{2,3}.

1.1.2. Efluentes provenientes do uso contínuo de fármacos

O desenvolvimento da indústria farmacêutica disponibiliza para o mercado milhões de substâncias com o propósito terapêutico. O aporte dessas substâncias farmacologicamente ativas no ambiente, advém do seu uso intenso e extensivo no tratamento em seres humanos, sendo a excreção realizada na forma não

metabolizada ou como um metabólito ativo, os quais são lançados ao ambiente nos efluentes municipais e industriais⁴.

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, antiinflamatórios, drogas contraceptivas e outros mais. O aumento da concentração dessas substâncias pode promover efeitos adversos os quais são facilmente percebidos por organismos aquáticos e terrestres⁴.

Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o tempo suficiente para servir a um propósito terapêutico. Porém, uma porcentagem de 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretada na forma inalterada e acaba persistindo no meio ambiente⁵.

1.1.3. Impacto Ambiental dos fármacos

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. É essencial que os recursos hídricos apresentem condições físicas e químicas adequadas para consumo e sobrevivência de organismos aquáticos⁶.

Na última década, especial atenção tem sido dada à presença de compostos farmacêuticos no ambiente aquático, uma vez que o aporte contínuo e a persistência de várias dessas substâncias podem trazer danos irreversíveis ao ambiente. Os fármacos, assim como seus produtos de degradação, em termos de periculosidade possuem algumas agravantes como: persistência no meio; efeito fisiológico, devido a sua reatividade; aumento de seu efeito com o aumento da concentração e poder de combinação com outras substâncias que podem promover maior dano ao meio ambiente^{7,8}. Os efeitos adversos causados por compostos farmacêuticos incluem toxicidade aquática, desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos. A presença de fármacos residuais e outros compostos xenobióticos na água potável é outra questão de saúde pública, uma vez que pouco se sabe sobre o potencial efeito na

saúde associado com o consumo em longo prazo da mistura destes compostos na água potável⁹.

Sendo assim, o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias de tratamento que permitam a remoção ou diminuição desses contaminantes tem sido objeto de interesse na área de saneamento ambiental. Entretanto, a não existência de programas específicos de monitoramento nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), impossibilita a avaliação do comportamento dos fármacos nestes locais⁸.

Efluentes gerados pelas indústrias farmacêuticas, residências e hospitais são as principais fontes de contaminação por fármacos no meio ambiente. Na literatura visualizou-se que fármacos depois de submetidos aos processos de tratamento de esgoto são facilmente encontrados em águas naturais como rios e lagoas. Esses compostos orgânicos de origem farmacêutica contribuem com a poluição da água e propiciam a disseminação de microorganismos patogênicos, causadores de doenças como colera e hepatite¹⁰.

Resíduos de fármacos em águas de despejo tem sido comumente reportados em vários estudos. A presença desses vários compostos implica múltiplas vias de ação, podendo interferir significativamente na fisiologia e no metabolismo, podendo causar também, efeitos secundários como alterar a defesa imunológica possibilitando o desenvolvimento de doenças⁵.

Com o avanço das técnicas analíticas descobriu-se que a contaminação de águas por fármacos é um fenômeno geral que ocorre em todo o mundo. Não só os rios e os lençóis subterrâneos estão contaminados com poluentes químicos. Até mesmo a água potável, depois de tratada, pode estar contaminada com anticoncepcionais, antiinflamatórios, antidepressivos e outras classes de fármacos amplamente utilizados. A Figura 1 mostra um esquema da rota simplificada da entrada de fármacos nos ambiente aquáticos¹¹.

Como alerta fica um estudo recente (2004), realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apontou que apenas 20,4% dos municípios brasileiros possuem condições de tratamento de esgoto sanitário com coleta e tratamento¹¹, que para um país deste tamanho torna-se algo bem preocupante.

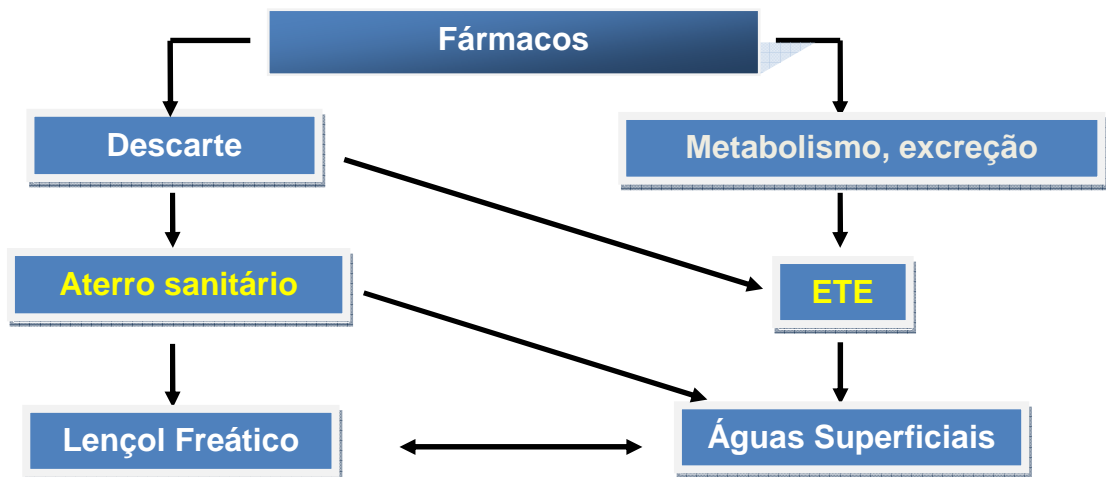


Figura 1: Rota simplificada da entrada de fármacos em ambiente aquáticos.

1.1.3.1. Legislação Ambiental

A resolução do Conama nº 357/2005 não apresenta diretrizes específicas sobre o lançamento de compostos orgânicos de origem farmacêutica em efluentes. Nela dispõem-se apenas sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de águas superficiais e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Isso pode ser melhor explicado no seguinte trecho: “os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedçam as condições, padrões e exigências dispostos nesta resolução e em outras normas aplicáveis”¹². Isso demonstra que de fato, não existe uma legislação vigente para o lançamento de resíduos de origem farmacêutica ao meio ambiente. Provavelmente pela carência de métodos analíticos que possam detectar e quantificar sensível e seletivamente estas substâncias de uma forma rápida e ainda a um baixo custo.

1.1.4. Anti-hipertensivos

A hipertensão arterial, ou pressão alta é uma doença assintomática que atinge grande parte das pessoas. No Brasil, estima-se que 30-35% da população acima dos 40 anos sofra dessa doença, de acordo com dados do IBGE. Por definição, a pressão alta caracteriza-se por uma pressão do sangue maior ou igual a 140/90 mmHg ou, 14 por 9¹³.

Em cerca de 90% dos pacientes, as causas são conhecidas e derivam de má alimentação (ingestão em excesso de sódio, gordura), obesidade, idade, fatores genéticos, estresse, sedentarismo, etc. Devido a muitos desses fatores serem decorrentes dos hábitos de vida das grandes metrópoles, a hipertensão por muito tempo foi mais prevalente em países desenvolvidos. As complicações são várias e graves: AVC, insuficiência renal, infarto do miocárdio, impotência e problemas visuais¹⁴.

O tratamento medicamentoso de hipertensos deve basear-se, por um lado, em estudos farmacológicos das drogas e, por outro lado, no perfil individual e único do paciente, tendo como mediador o clínico. O tratamento inicial baseia-se no escalonamento, no qual se orienta baixas doses da droga usada para alcançar o controle pressórico. Sendo assim quando se falam em mecanismos de ação, doses médias, tempo de ação e posologia, é preciso ter em mente que estas informações são um guia geral e que cada paciente deve ser individualizado¹⁵.

Atualmente existem várias drogas anti-hipertensivas de uso habitual e elas podem ser classificadas de várias maneiras: diuréticos, inibidores do sistema nervoso simpático, vasodilatadores diretos, antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora e antagonista do receptor da angiotensina II¹⁶.

Para o desenvolvimento deste trabalho de mestrado, foi escolhido o *captopril*, que é um anti-hipertensivo pertencente à classe dos inibidores de enzima conversora da angiotensina I, amplamente utilizada no Brasil.

1.1.4.1. Captopril

O captopril {ácido (2S)-1-[(2S)-2-metil-3-sulfanilpropanoila] pirrolidina-2-carboxílico} (Figura 2) é um fármaco que se constitui de um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, com leve odor característico de sulfeto, solúvel em água, etanol, clorofórmio, metanol e em soluções alcalinas, podendo ser encontrado sob várias dosagens e nomes comerciais. É um anti-hipertensivo classificado como inibidor da enzima conversora de angiotensina I, sendo indicado para pacientes com hipertensão cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e nefropatia diabética¹⁷.

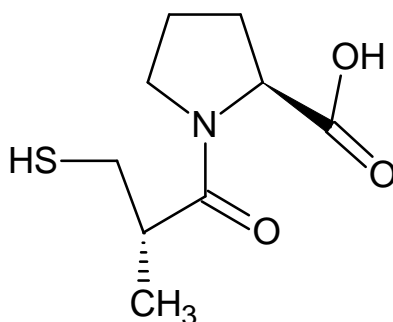


Figura 2: Formula estrutural do captopril.

1.1.4.1.1. MECANISMO DE AÇÃO

O captopril impede a conversão da angiotensina I em II, pela inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), resultando na diminuição das concentrações séricas de angiotensina II, que é uma das mais potentes substâncias vasoconstritoras endógenas.

A angiotensina I é um peptídeo que faz parte do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). É formado a partir da ação da enzima renina sobre a angiotensinogênio. Sofre ação da enzima conversora da angiotensina, gerando a angiotensina II¹⁷.

1.1.4.1.2. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA

A meia-vida de eliminação é inferior a 3 horas. Em um período de 24 horas, mais de 95% da droga absorvida é eliminada na urina; 40 a 50% como droga inalterada e o restante como metabólitos (dissulfeto dímero de captopril e dissulfeto de captopril-cisteína), cujas estruturas encontram-se na Figura 3.

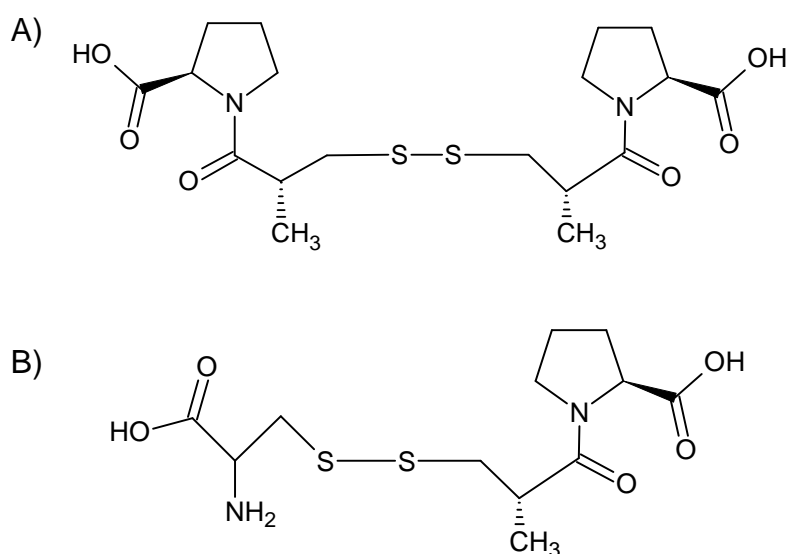


Figura 3: Estruturas químicas dos metabólitos após a ingestão no controle da hipertensão. (A) Dímero de captopril e (B) Dissulfeto de captopril-cisteína.

As doses aplicadas na clínica médica de captopril variam de 6,25 e 150 mg, 2 a 3 vezes ao dia, sendo as doses de 6,25 mg (3 vezes ao dia) e 25 mg (2 vezes ao dia) apropriadas para o início da terapia para insuficiência cardíaca e a hipertensão, respectivamente. O alimento diminui a biodisponibilidade oral do captopril em 25 a 30%, e o fármaco deve ser administrado uma hora antes das refeições. Estudos afirmam que o captopril pode perder até 80% da sua eficácia e biodisponibilidade se administrado concomitantemente com outros medicamentos ou alimentos. Ao contrário de alguns fármacos que têm a sua absorção diminuída, mas não comprometida pela administração conjunta com outras substâncias, o captopril

deve ser ingerido sem nenhuma associação para evitar perda da sua eficácia ou aumento de seus efeitos adversos¹⁸.

Após a administração oral de uma dose isolada de captopril, reduções máximas da pressão arterial são freqüentemente observadas dentro de 60 a 90 minutos. A duração do efeito está relacionada com a dose ingerida. Entretanto, a redução da pressão arterial pode ser progressiva, podendo ser necessárias várias semanas de tratamento para se atingir o efeito terapêutico máximo. A pressão arterial é reduzida na mesma intensidade, tanto na posição em pé ou deitada. A retirada abrupta do captopril não tem sido associada com o rápido aumento da pressão arterial¹⁸.

1.1.4.1.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL

Diversos métodos são encontrados na literatura para a quantificação de captopril em diversas matrizes e dentre eles temos o método espectrométrico, o fluorimétrico, o eletroforético, o espectrofotométrico e o eletroquímico¹⁹⁻²³.

1.2. SENSORES ELETROQUÍMICOS

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade.

A utilização de técnicas eletroquímicas no estudo de sensores eletroquímicos constitui-se em uma poderosa ferramenta para os químicos analíticos na resolução de seus problemas, especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade. A versatilidade das técnicas eletroquímicas também

merece destaque visto que é possível controlar as reações eletródicas modificando a interface eletrodo-solução e selecionando-se criteriosamente o potencial aplicado à célula eletroquímica²⁴.

1.2.1. Sensores amperométricos

Os sensores amperométricos constituem-se em dispositivos mantidos em potencial fixo e que propiciam sinais de corrente faradaica proporcionais à concentração do analito, em função de processos eletródicos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Todavia, a corrente medida em experimentos eletroquímicos também possui um componente capacitivo, associado a mudanças da capacitância da dupla camada elétrica durante variações de potencial. O transporte de massa ocorre preferencialmente por difusão, sendo a migração e a convecção minimizadas através de condições experimentais favoráveis. Esses dispositivos são normalmente operados por uma limitação da difusão, sendo a corrente gerada afetada pela velocidade com a qual o analito se difunde até a superfície do eletrodo²⁴.

Reações eletrolíticas são heterogêneas e tem lugar na região interfacial entre o eletrodo e a solução, região onde a distribuição de carga difere da fase no interior da solução.

Para se realizar um estudo de reações em eletrodos, devem ser criadas condições experimentais reprodutíveis que permitam a minimização de todos os fatores indesejáveis que possam contribuir para as medições e diminuir a sua precisão. Normalmente é necessário suprimir os efeitos da migração e a resistência da solução, prevalecendo o fenômeno da difusão que é responsável pelo transporte de massa da solução para a superfície do eletrodo²⁵.

Considerando a técnica amperométrica, quando o potencial aplicado à célula é mudado de uma condição na qual não há reação de espécies eletroativas presentes na proximidade da superfície do eletrodo para outra condição onde temos um processo eletroquímico, a variação de corrente elétrica do sistema é dada pela equação de Cottrell:

$$I = \frac{nFAD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} C_{\infty} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: I é a corrente a um tempo t, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, A é a área do eletrodo, C_{∞} é a concentração da espécie eletroativa no “*bulk*” da solução e D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa.

1.2.1.1. Sensores biomiméticos

O rápido monitoramento e *in situ* de fármacos pode ocorrer com a utilização de dispositivos capazes de identificar sensível e seletivamente essas espécies. Esses dispositivos podem ser sensores eletroquímicos, dentre os quais destacam-se os sensores biomiméticos, que podem ser definidos como um subtipo de “biossensores enzimáticos”, nos quais o eletrodo é modificado com uma substância redox com estrutura análoga ao sítio ativo de alguma enzima tomada como modelo.

Os sensores biomiméticos são uma nova estratégia experimental que tem sido usada para obter sensores amperométricos mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais que possuem como base materiais biológicos. Estes dispositivos visam vencer as limitações dos biossensores enzimáticos tais como disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas; assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox) / substrato, desde que nos sensores biomiméticos o “sítio ativo” encontra-se descoberto, diferente do que acontece nas enzimas, onde o sítio ativo encontra-se rodeado pela densa camada de aminoácidos residuais^{26,27}.

Uma condição para mimetizar ou escolher 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 conhecidos, e neste sentido as enzimas P450, encaixam-se perfeitamente nestes requerimentos.

1.2.1.1.1. Enzima P450

O nome enzima P450 ou citocromo P450 (abreviado como CYP ou P450) deriva das propriedades espectrais dessa proteína. Na sua forma reduzida (Fe^{2+}), ela se liga ao monóxido de carbono e forma um complexo que absorve luz no comprimento de onda de 450 nm. A letra P é a abreviatura de pigmento, lembrando a cor rosa do grupo hemina²⁸.

Atualmente são conhecidas aproximadamente 450 diferentes enzimas P450, as quais catalisam os mais diversos tipos de reações químicas nos organismos, produzindo na maioria das vezes metabólitos que são fisiologicamente essenciais ou benéficos aos organismos vivos²⁸. Dentre essas reações pode-se incluir a degradação de xenobióticos como pesticidas organoclorados e disruptores endócrinos, e a metabolização de fármacos como paracetamol e hormônios estrógenos²⁹. Na Tabela 1, são indicados alguns fármacos que são metabolizados pelas P450³⁰.

Tabela 1: Exemplos de drogas metabolizadas por isoenzimas citocromo P450.

ISOENZIMA	FÁRMACO METABOLIZADO		
CYP1A2	Cafeína	Propranolol	Clozapina
CYP2D6	CAPTOPRIL	Hidrocodona	Anfetamina
CYP2C9	Diclofenaco	Piroxicam	Ibuprofeno
CYP3A4	Diazepam	Clindamicina	Ritonavir

As enzimas P450 contém um sítio ativo comum que é a protoferrina de ferro IX (Figura 4), que é o grupo prostético encontrado em todas as enzimas citocromo P450. O papel deste grupo hemino nos diferentes citocromos P450, varia em função da natureza dos ligantes próximos ao grupo prostético e do substrato que será catalisado³¹.

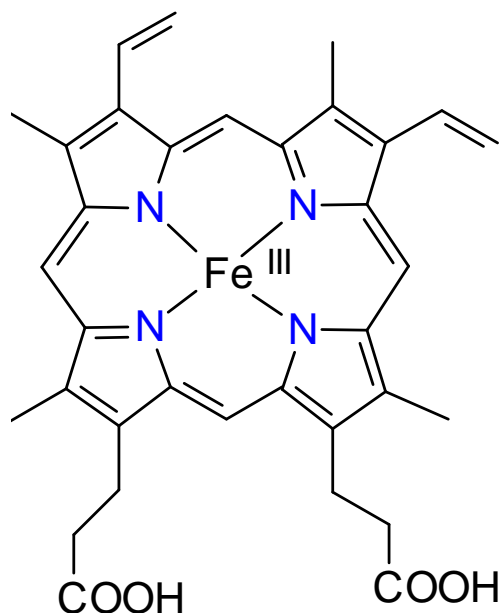
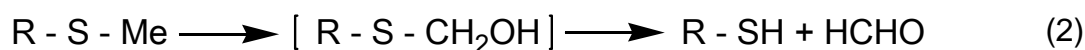


Figura 4: Estrutura da protohemina IX (protoporfirina de ferro IX) presente no sítio ativo de todas as enzimas P450.

A reação catalisada pelas enzimas P450 baseiam-se geralmente em uma reação monooxigenase na qual ocorre a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato orgânico³¹. Entretanto, existem mais de vinte tipos de reações catalisadas pelas diversas enzimas P450, dentre as quais podem-se incluir além da hidroxilação de alcanos, a epoxidação de alcenos, a dehalogenação oxidativa e redutiva, a S-oxidação (reação 1), a S-dealquilação (reação 2), entre outras.



Compostos derivados das ftalocianinas e porfirinas de ferro, manganês e cobalto têm sido satisfatoriamente empregados em meio aquoso na tentativa de

mimetizar o sítio ativo das P450, porém poucos trabalhos têm sido descritos sobre aplicação na construção de sensores químicos biomiméticos visando aplicação analítica³²⁻³⁴. Dentre os complexos que podem ser avaliados como possíveis catalisadores biomiméticos da P450, devido à semelhança com a estrutura química da protohemina IX, tem-se a *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II), mostrada na Figura 5.

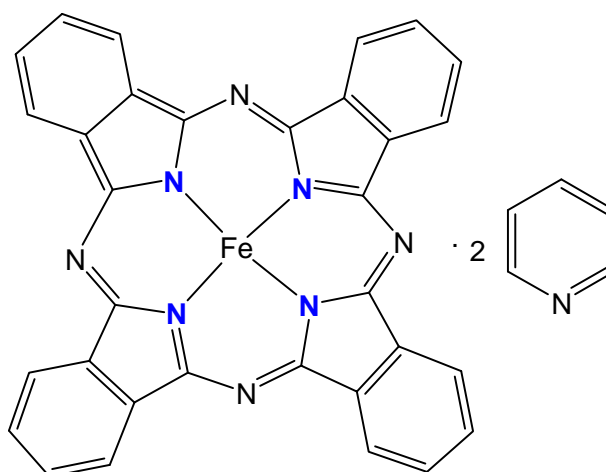


Figura 5: Estrutura química do complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II)

1.2.2. Eletrodos quimicamente modificados (EQM)

Os EQMs à base de pasta de carbono modificada têm atraído atenção devido à sua seletividade e detectibilidade para diversos tipos de compostos, dentre eles, podemos citar os compostos farmacêuticos.

Algumas vantagens podem ser destacadas para este tipo de suporte eletródico, tais como a fácil renovação da superfície, boa estabilidade e baixa corrente capacitiva, se comparado aos outros tipos de materiais carbonáceos. Sendo uma ferramenta ideal para análises de pequenas quantidades de substâncias³⁵⁻³⁶.

1.2.2.1. Modificação na superfície do eletrodo

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono³⁷.

A imobilização de um modificador na superfície do eletrodo pode ocorrer com a utilização de enzimas no caso dos biossensores, ou catalisadores biomiméticos (complexos organometálicos) para os sensores biomiméticos.

A identificação de um analito utilizando pasta de carbono é um aspecto interessante nos sensores biomiméticos, pois oferece a viabilidade de uso de um composto insolúvel em solução, evitando a lixiviação do modificador desde a superfície do eletrodo para a célula de medida. Com isso, além de diminuir o custo da análise, diminui o processo de modificação do grafite, que poderá ser realizado apenas por uma simples técnica de oclusão.

Existem vários métodos de imobilização de materiais solúveis e insolúveis em eletrodos à base de pasta de carbono, dentre os quais os mais comumente usados são a adsorção, a oclusão e a ligação covalente.

1.2.2.1.1. ADSORÇÃO

Esse método envolve a interação física do modificador e a superfície do eletrodo, sendo um processo simples e rápido, podendo ser aplicado em vários tipos de superfícies eletródicas³⁷.

A técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. No entanto, a mesma apresenta a desvantagem de produzir EQM's com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que geralmente limita a faixa de resposta linear³⁷. Por outro lado, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador

para o meio durante sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM preparado desta forma.

1.2.2.1.2. LIGAÇÃO COVALENTE

Nesse tipo de imobilização o modificador é fixado na superfície eletródica por ligação covalente, oferecendo um método estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo^{37,38}.

O método de modificação via ligação covalente é bastante estável em relação aos demais métodos, contudo requer maior tempo de reação, além de ser mais difícil de executar. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área^{37,38}.

Uma alternativa que tem sido muito usada nas últimas décadas envolve a formação de monocamadas auto-organizadas (SAM "self-assembled monolayers"). Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. Enquanto que a adsorção deste tipo de molécula é um resultado da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato, a força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas (por exemplo, do tipo Van der Waals) das cadeias longas ligadas ao grupo funcional³⁹. Existem basicamente três diferentes abordagens por meio das quais as SAMs têm sido desenvolvidas. As três abordagens são:

- ✓ Formação de monocamadas organizadas via o processo de silanização.
- ✓ Técnica de Langmuir-Blodgett (LB) que envolve a formação de membranas lipídicas sobre os eletrodos sólidos.
- ✓ Uso da adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas, principalmente tióis em ouro.

1.2.2.1.3. OCLUSÃO

Comumente utilizado na preparação de pasta de carbono modificada. Este método de imobilização baseia-se na mistura de grafite em pó, modificador e um aglutinante, que pode ser parafina⁴⁰ ou óleo mineral⁴⁰, tornando a pasta estável em contato com soluções aquosas. Adicionalmente o aglutinante, serve para fixar a pasta ao eletrodo e preencher as cavidades entre as partículas de grafite.

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.

1.2.3. Desenvolvimento de sensores químicos utilizando pasta de carbono.

O emprego de sensores amperométricos à base de pasta de carbono tem demonstrado um aumento exponencial durante os últimos 30 anos (Figura 06), como consequência da aplicabilidade nos mais diversos meios, assim como a versatilidade na preparação da pasta, a qual podem ir desde a forma convencional pela mistura de pó de grafite e algum modificador seletivo (enzimas ou catalisadores), até dispositivos mais elaborados que usam polímeros molecularmente impressos (MIP)⁴¹ e nanotubos de carbono⁴². A Figura 6 mostra esse perfil crescente em 30 anos de pesquisas empregando sensores à base de pasta de carbono modificada.

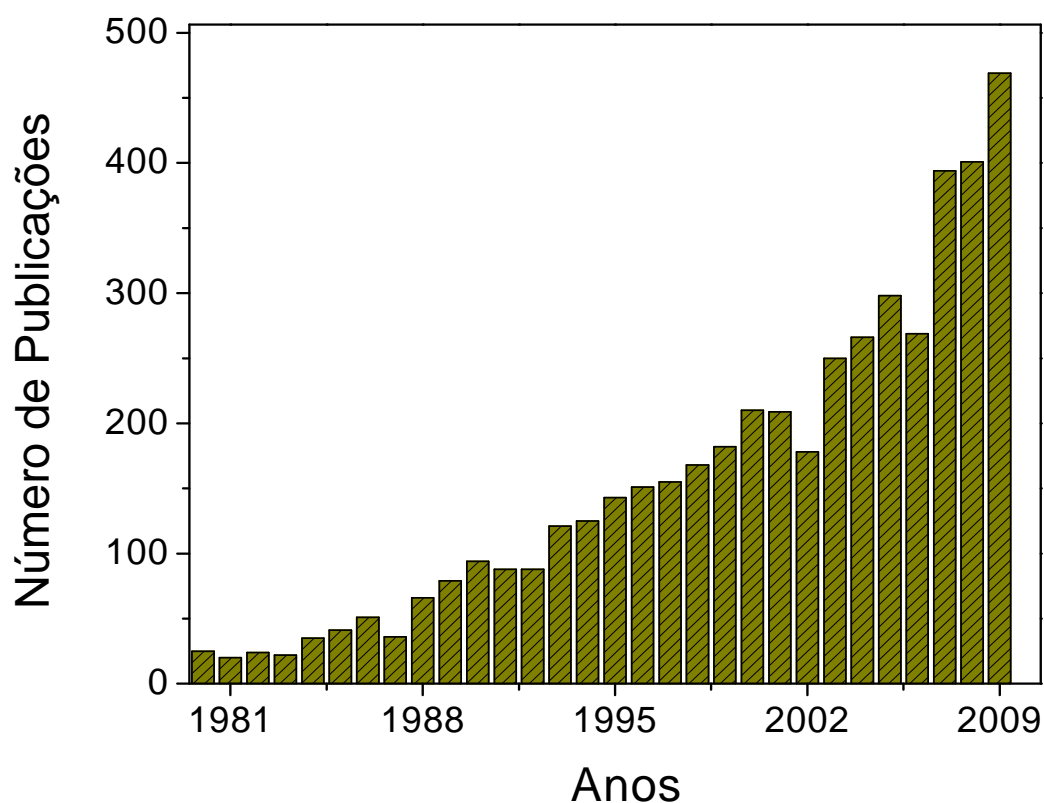


Figura 6: Artigos publicados sobre eletrodos de pasta de carbono utilizando a base de dados, SciFinder Scholar® versão 2007.

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 mecânica, e elevada atividade eletrocatalítica⁴³. Na Tabela 2 são mostradas algumas aplicações recentes relatadas na literatura, relacionadas a sensores à base de pasta de carbono modificada.

Tabela 2: Alguns artigos publicados em 2009/2010 mostrando o uso de sensores à base de pasta de carbono para determinação de analitos de interesse farmacêutico e ambiental.

Modificador	Aplicação
Zeolita enriquecida com ferro	Peróxido de hidrogênio ⁴⁴
Nanotubos de carbono com paredes múltiplas com nanosilica	Chumbo ⁴⁵
2,7-bis(etilferrocenil) fluoreno-9-ona	Glutaciona ⁴⁶
Poliglicina	Ácido ascórbico e Dopamina ⁴⁷
Polímeros biomiméticos (MIP) ocluídos em pasta de carbono	Cafeína ⁴⁸
Ácido 1,1-Ferrocenodicarboxílico	Captopril ⁴⁹
Metaloftalocianina	Dideoxinosina ⁵⁰
Ferroceno modificado com nanotubos de carbono	Levedopa ⁵¹
Tionina	Catecol e Bisfenol A ⁵²
Quinizarina	Cisteína ⁵³

Dentre todas as citações, aquela que envolve o uso de Ácido 1,1-Ferrocenodicarboxílico para determinação de captopril⁴⁹ merece atenção por se tratar do analito escolhido para a realização deste trabalho de mestrado. Nesse artigo é apresentada a construção do sensor à base de pasta de carbono preparada com pó de grafite e modificador incorporado. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram voltametria cíclica, cronoamperometria e impedância. A desvantagem do sensor apresentado nesse artigo é o alto potencial de análise (0,49 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat})) comprometendo a seletividade do sistema.

Com o avanço das pesquisas em eletroanálise e ciências dos materiais, estudos têm sido realizados com o intuito de se obter sensores com melhor desempenho para serem aplicados na determinação de compostos em diversas

matrizes, como aquelas de interesse ambiental e farmacêutico, fato que pode ser confirmado pelo número de trabalhos publicados recentemente (Figura 6).

1.3. Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)

A utilização de sistema de análise por injeção em fluxo para detectar e quantificar poluentes orgânicos na água seria uma alternativa prática e versátil para monitorar essas substâncias. O método de análise denominada de FIA (Flow Injection Analysis) teve início com trabalhos desenvolvidos por Ruzicka em meados da década de setenta, e pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, onde é introduzido um volume discreto e reproduzível da amostra em um fluxo transportador (carregador) não segmentado, que continuamente flui em direção ao detector. Durante o transporte, a amostra se dispersa e pode ou não, receber reagentes por confluência, sofrer reações químicas e/ou passar por etapas de separação e/ou concentração, gerando uma "zona de amostragem" de um produto adequado para a quantificação. Ao atingir o detector, a zona de amostra origina um sinal transiente resultante do gradiente de concentração gerado durante o transporte na solução carregadora (ou transportadora) em fluxo contínuo⁵⁴.

Como características favoráveis desta metodologia salientam-se a alta velocidade de amostragem, o baixo consumo de amostras e reagentes, a obtenção de resultados exatos, a facilidade de automação e a versatilidade⁵⁵. Adicionalmente, este método apresenta um embasamento teórico simples e excelente capacidade analítica no que se refere à precisão das análises⁵⁵.

1.4. Métodos analíticos de calibração

1.4.1. Padrão externo ou curva de calibração

A técnica do padrão externo ou curva de calibração utiliza vários padrões que contêm concentrações de analito conhecidas, as quais são introduzidas no instrumento, e a resposta é registrada. Os dados resultantes são colocados em um gráfico contendo a resposta instrumental (eixo Y) em função da concentração do padrão (eixo X), a fim de se obter uma relação reprodutível, preferencialmente linear⁵⁶. Para calcular a quantidade de analito contida em alguma amostra, a curva de calibração é interpolada, usando a resposta instrumental fornecida pela amostra.

1.4.2. Método da adição de padrão múltipla

O método da adição de padrão pode ser entendido como sendo um método de calibração, onde o analito em concentrações crescentes e conhecidas é adicionado (com exceção da primeira) à mesma quantidade de amostra contida em diversos balões volumétricos. Assim a resposta do instrumento somará ao padrão de concentração conhecida à quantidade correspondente à amostra. A seguir, os dados resultantes são colocados em um gráfico contendo a resposta instrumental (eixo Y) em função da concentração do padrão (eixo X), a fim de se obter uma relação linear⁵⁶. A quantidade de analito na amostra é calculada pela extrapolação no eixo X da reta obtida.

Este método é o mais recomendado nos casos em que há efeito da matriz na obtenção do sinal instrumental, tal como é o caso das análises de amostras biológicas (sangue, soro e urina), de esgoto, entre outras⁵⁶.

2. OBJETIVO

Este trabalho de mestrado visa à construção e aplicação de sensor amperométrico à base de catalisadores biomiméticos da enzima P450, na determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico em batelada e sistema de análise por injeção em fluxo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica (Mettler-Toledo[®]) que possui calibração externa e tara automática, possibilitando pesagens rápidas e precisas.

O pH das soluções tampão foi medido com pH-metro da Thermo Scientific[®] (Orion 3 Star pH, Benchtop – USA) empregando um eletrodo de vidro combinado.

A bomba peristáltica digital e de quatro canais, marca Ismatec[®] foi utilizada para realizar a propulsão das amostras e reagentes no sistema por injeção em fluxo (FIA).

3.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico ou HPLC, segundo a necessidade, e todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

Foram utilizados no desenvolvimento do projeto o captopril (Sigma-Aldrich), complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II), óleo mineral e grafite em pó todos provenientes da Sigma-Aldrich[®]; o KH_2PO_4 , o acetato de sódio e o hidróxido de sódio adquiridos da Synth[®]; o tampão orgânico *tris*(hidroxi-metil)aminometano (TRIS) da Merck[®], os solventes (ácido fosfórico e metanol) utilizados para os experimentos por cromatografia foram adquiridos respectivamente da Mallinckrodt e Ecibra.

3.3. Construção do sensor biomimético

Para a construção do sensor proposto e baseando-se na estrutura química do sítio ativo da enzima P450, assim como nas características vantajosas das ftalocianinas e porfirinas, foi usado o complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II) [Fe(dipy)Pc], na modificação da pasta de carbono.

A preparação da pasta de carbono para determinação de captopril foi realizada misturando 100 mg de pó de grafite, 30 mg do complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II) e 1,00 mL de 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 80 µL do agente aglutinante, óleo mineral (Nujol[®]) para a obtenção da pasta de carbono.

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 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 7). Finalmente a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo, a fim de obter uma superfície homogênea.

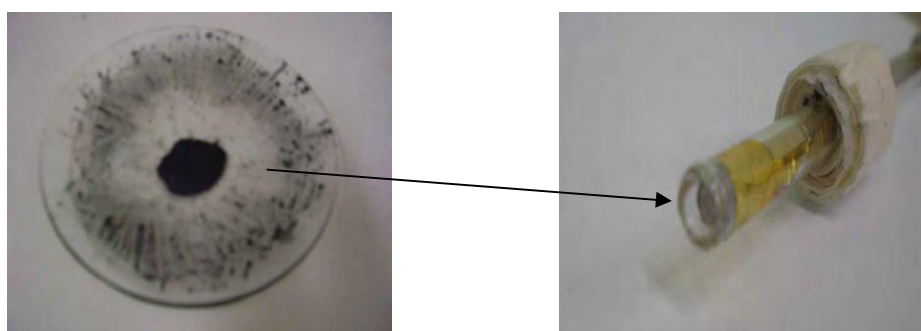


Figura 7: Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor.

Adicionalmente, pastas de carbono não modificadas foram preparadas pela mistura de 100 mg de grafite em pó e misturados com 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Após seco, foi adicionado 80 µL de Nujol[®], para obtenção da pasta de carbono não modificada. Estas pastas serviram para realizar estudos comparativos.

3.4. Medidas Eletroquímicas

Dentre as várias técnicas eletroanalíticas disponíveis, neste trabalho de mestrado utilizou-se a voltametria cíclica para caracterização do sensor proposto e a amperometria para efetuar as análises quantitativas do captopril.

3.4.1. Sistema de análise em batelada para determinação de captopril

As medidas eletroquímicas em batelada foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab[®], usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl(KCl_{sat}) comercial (Analion[®]), um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o(s) eletrodo(s) de pasta de carbono modificada ou não, como eletrodo(s) de trabalho.

Neste sistema de análise 10,00 mL de solução tampão (eletrólito) foram adicionados na cela eletroquímica e a seguir volume conhecido de uma solução padrão de captopril, ou de amostra contendo o analito, era adicionado para realizar os experimentos eletroquímicos. Sendo que a corrente de oxidação resultante é relacionada com a concentração de analito na célula de medida. Antes da adição do analito o potenciostato era colocado em modo de espera (*hold*), a fim de realizar a homogeneização da solução. Após a adição do analito na célula eletroquímica a solução era agitada com ajuda de uma barra magnética de PTFE acionada por um agitador magnético. A seguir, o equipamento era colocado novamente em modo de medição (*play*) e a corrente obtida registrada.

A Figura 8, mostra uma representação esquemática (A) e uma fotografia do sistema de medida (B), usado neste trabalho de mestrado.

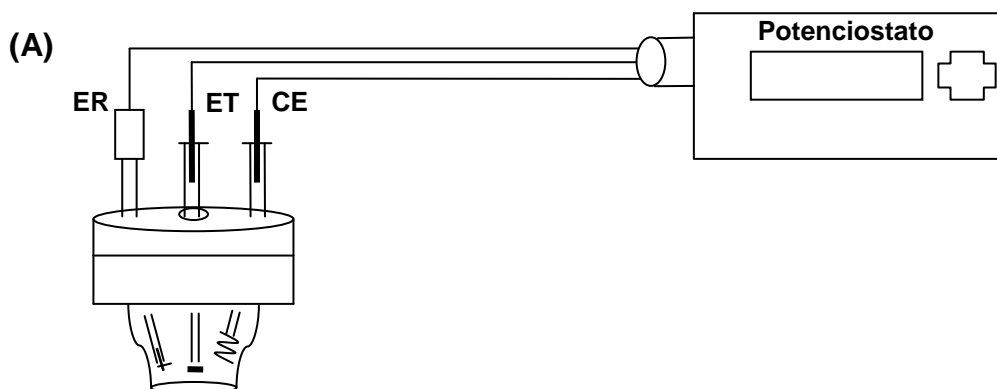


Figura 8: Representação do sistema de análise em batelada em (A) Esquema representativo e (B) Fotografia da aparelhagem empregada.

3.4.2. Sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de captopril

As medidas em fluxo foram realizadas usando como unidade de detecção uma cela eletroquímica do tipo *wall-jet* (Figura 09), contendo o sensor biomimético para captopril como eletrodo de trabalho, um anel de Pt como eletrodo auxiliar e um eletrodo de referência Ag|AgCl (KCl_{sat}) *home made*, formado por um fio de Ag recoberto com AgCl que é mergulhado em uma solução de KCl saturada, a qual é injetada na cela de medida por meio de uma seringa de 5 mL, sempre no dia anterior de cada jornada de trabalho para condicionamento e manutenção do fio de Ag|AgCl.

O sistema de injeção em fluxo empregado neste trabalho é composto por uma bomba peristáltica digital de quatro canais (**1**); um injetor de amostra do tipo proporcional, fabricado *at home* em Teflon (**2**); a cela eletroquímica do tipo *wall jet* como unidade de detecção (**3**); e um potenciostato Palm-Sense[®] da Palm Instruments BV (**4**).

Neste sistema as soluções de análise e solução tampão (carregador) foram bombeadas pela bomba peristáltica, através de tubos de PTFE (0,8 mm de diâmetro interno), para o injetor.

O esquema do sistema FIA (*flow injection analysis*) empregado neste trabalho é mostrado na Figura 9A, e na Figura 9B, é mostrada uma fotografia do sistema.

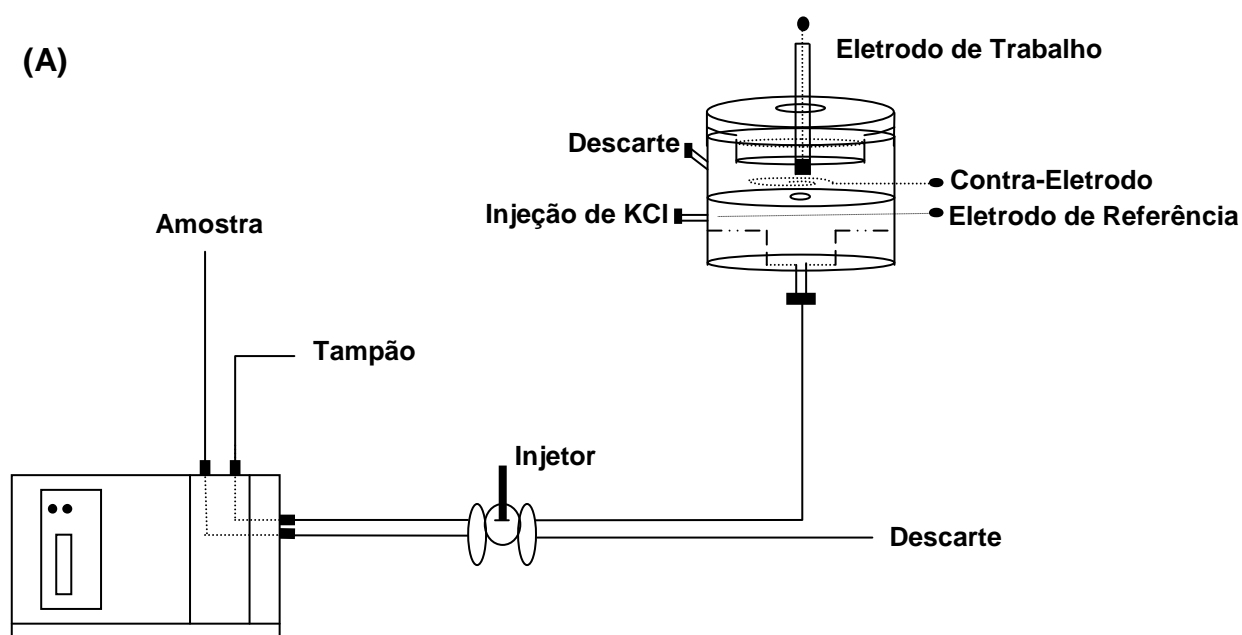


Figura 9: Representação esquemática do sistema de injeção em fluxo (FIA) em (A) e a fotografia do sistema em (B): (1) Bomba peristáltica, (2) Injetor, (3) Cela Eletroquímica, (4) Potenciostato.

3.5. Aplicação e validação do sensor biomimético à base de [Fe(dipy)Pc] para determinação de captopril

3.5.1. Estudo de Seletividade

Para estudar a seletividade do sensor biomimético realizaram-se análises no sistema em batelada com 17 fármacos, além do captopril.

Os fármacos avaliados no estudo de seletividade foram os seguintes: dipirona, paracetamol, diclofenaco, quinina, clindamicina, digoxina, cloridrato de efedrina, fluconazol, lidocaína, metrodinazol, piridoxina, secnidazol, amitriptilina, mebendazol, tetraciclina, ranitidina e sulfato de neomicina.

3.5.2. Preparação das amostras de medicamentos

Os medicamentos analisados foram o Captopril genérico (Medley[®]) nas quantidades 12,5; 25 e 50 mg por comprimido, Capoten[®] e Lopril-D[®] (Briston-Myers Squibb) nas dosagens de 25 e 50 mg por comprimido, respectivamente.

Os medicamentos que se apresentavam na forma de comprimidos foram macerados e pesados, tal como recomendado pela farmacopéia. Foram utilizados 10 comprimidos de cada medicamento e a preparação das soluções se deu a partir de cálculos de massa referente ao captopril presente nos comprimidos em relação a sua massa total. Depois de preparada uma concentração conhecida de captopril, filtrou-se essa solução para a retirada de substâncias insolúveis.

A determinação do captopril nessas amostras foi realizada com o sensor biomimético em batelada e no sistema de análise por injeção em fluxo, e os resultados obtidos com ambos os sistemas foram comparados com o método oficial (HPLC)^{57,58}.

3.5.2.1. Determinação cromatográfica de captopril

As análises cromatográficas foram efetuadas segundo preconizado pela Farmacopéia Européia (1997)⁵⁷⁻⁵⁸. Foi empregado um cromatógrafo Shimadzu modelo 20A, com detector UV/Visível SPD-20A, mostrador automático SIL-20A e degaseificador DGU-20A₅, acoplado a um microcomputador pessoal.

A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C18 da marca Shimadzu Shim – Pack CLC – ODS.

A fase móvel era composta de uma mistura de 550 mL metanol, 450 mL água e 0,5 mL de ácido fosfórico concentrado. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, o comprimento de onda foi de 220 nm e o volume injetado de amostra de 20 µL.

A Figura 10 mostra uma fotografia do sistema cromatográfico empregado neste trabalho de mestrado.



Figura 10: Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu® utilizado nas análises das amostras de captopril.

3.5.2.2. Avaliação da resposta dos possíveis compostos interferentes

A determinação do captopril sob a influência de diversas substâncias como potenciais interferentes na determinação do captopril foi estudada em fluxo.

Soluções correspondentes a 5 mL de solução contendo 5 mg de captopril, foram enriquecidas com os possíveis interferentes, em uma razão m/m de 1:10 (captopril:interferente). O sinal obtido foi comparado com aquele correspondente apenas ao captopril, para calcular os valores da recuperação do sinal (%) na presença do interferente.

3.5.3. Obtenção e preparação das amostras biológicas

Amostras de urina (Figura 11) foram coletadas de sete voluntários saudáveis e com idades entre 20 e 50 anos, sendo que uma pessoa é usuário de captopril e consome o fármaco (25 mg comprimido⁻¹) 2 vezes ao dia para controle da pressão arterial. Cada amostra foi centrifugada a uma velocidade de 2000 rpm, sendo o sobrenadante recolhido, diluído 2 vezes em relação ao volume total e enriquecido com $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de captopril, sendo que os experimentos de recuperação foram realizados com a técnica amperométrica nos sistemas em batelada e análise por injeção em fluxo para as amostras 1H a 6M, sendo termos H e M correspondem respectivamente à amostra do sexo masculino e feminino⁵⁹.

A amostra biológica do usuário de captopril (7M) foi analisada em FIA e os resultados obtidos foram comparados com aqueles encontrados pelo HPLC.



Figura 11: Fotografia de uma amostra biológica que foi analisada

3.5.4. Obtenção e preparação das amostras ambientais (rios)

As amostras de águas de seis rios da região de Araraquara (Figura 12) foram coletadas e enriquecidas com captopril na concentração de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a seguir analisadas pelo sensor proposto em sistema em batelada, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.



Figura 12: Fotografia de uma localidade do rio Jacaré-Guaçu que atravessa o município de Araraquara.

3.5.5. Análise de amostras ambientais de ETEs (Estação de Tratamento de Esgoto)

As amostras de esgoto foram coletadas das estações de tratamento de esgoto das cidades de São Carlos (240 Km), Araraquara (277 Km) e Campinas (163 Km) de distância para a cidade de São Paulo (SP), sendo a coleta realizada em dois momentos: esgoto bruto e esgoto tratado.

Como exemplo (Figura 13) tem-se à cidade de São Carlos que construiu recentemente a Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Monjolinho, cujo projeto da estação foi concebido pelo Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP). Essa estação de tratamento de esgoto possui atualmente uma vazão de 500 L s^{-1} , cujo valor é próximo ao valor esperado que é de 600 L s^{-1} , que é o ideal para se atingir 100% de esgoto proveniente da cidade.



Figura 13: Fotografias da entrada do esgoto bruto na ETE de Monjolinho no município de São Carlos. (A) Vista próxima. (B) Vista Ampla.

As amostras de esgoto coletadas foram filtradas a vácuo para realização de medidas eletroquímicas no sistema em fluxo (FIA). As amostras foram analisadas de duas maneiras: amostras diluídas 2 vezes em relação ao volume original foram enriquecidas com $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril e amostras brutas (não diluídas) foram analisados pelo método de adição de padrão. Os resultados obtidos foram comparados com o método oficial de análise (HPLC)⁵⁷⁻⁵⁸. As amostras de esgoto bruto foram previamente filtradas em um filtro de seringa CEL REL 0,45 μm , 15 mm (HEXIS) antes da realização das análises no HPLC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos em batelada

4.1.1. Caracterização eletroquímica do sensor através de estudos Voltamétricos

Inicialmente foi avaliada a influência do complexo de ferro na pasta de carbono em relação à pasta de carbono não modificada, na detecção de captopril. Para isto, foram realizados estudos empregando a voltametria cíclica e os resultados obtidos são mostrados na Figura 14, curvas (A) - (D).

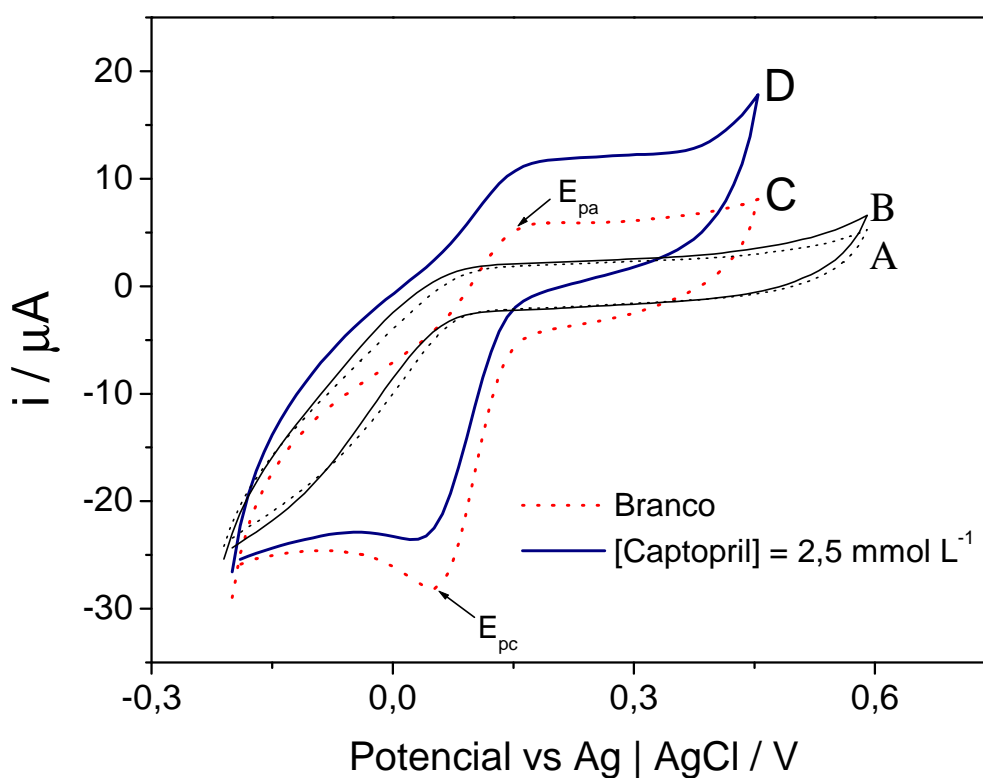


Figura 14: Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono não modificada (A e B) e sensor à base de pasta de carbono modificada com $[\text{Fe}(\text{dipy})\text{Pc}]$ (C e D). Branco: Solução tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Na figura anterior a faixa mais ampla para o eletrodo de pasta de carbono não modificada (CPE) é justificada, pois serviu para verificar que não ocorreu nenhum processo de oxidação em potenciais mais altos na presença do analito. Pode ser também observado que na ausência do modificador de ferro (II) nenhuma mudança no perfil voltamétrico é obtida na presença de captopril.

Por outro lado, na presença do complexo de ferro (II), pode ser observado que o voltamograma obtido na solução de eletrólito suporte na ausência do analito, apresenta dois picos em 0,050 V (E_{pc}) e em 0,175 V (E_{pa}), correspondentes respectivamente, à redução do Fe^{3+} e à oxidação do Fe^{2+} .

Na presença de captopril (Curva D) ocorre um aumento apenas da corrente anódica em 0,175 V vs $Ag|AgCl (KCl_{sat})$ sugerindo que um processo de oxidação eletrocatalítico para o captopril deve estar ocorrendo. O pico reverso observado na presença de captopril corresponde ao Fe^{2+} contido na pasta modificada.

Para verificar se ocorria um aumento regular e significativo na corrente anódica com diferentes concentrações de captopril, a Figura 15 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de captopril.

Da Figura 15 pode-se verificar claramente que ocorre apenas o aumento da corrente anódica, que se trata de um processo irreversível, e que pode ser eletrocatalítico.

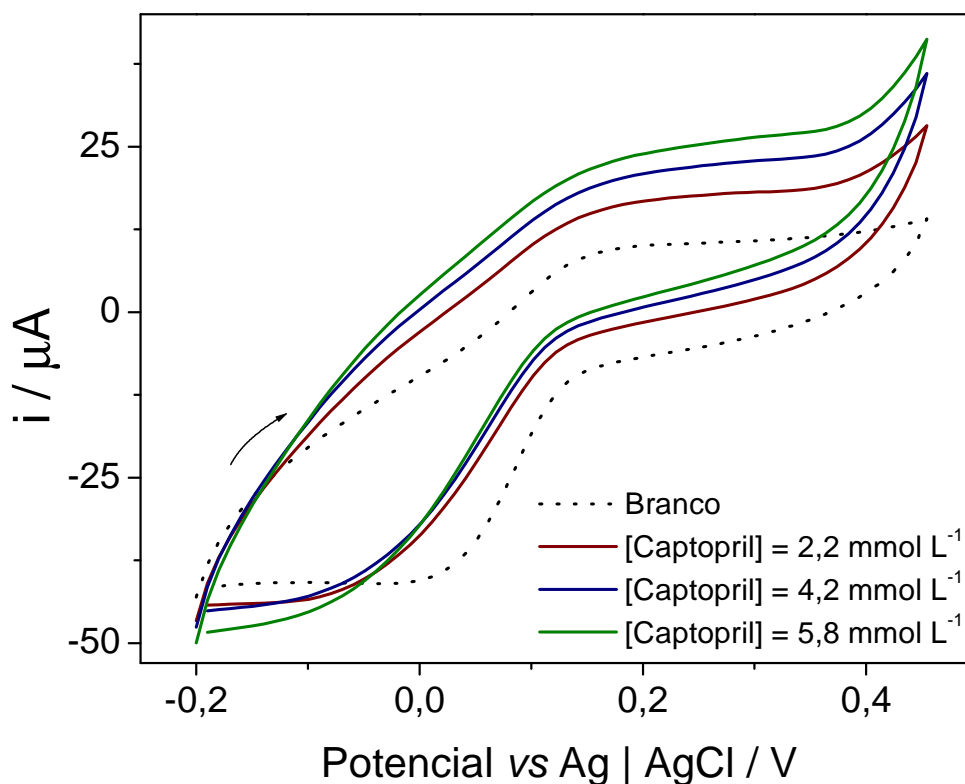


Figura 15: Voltamogramas cíclicos para sensor à base de [Fe(dipy)Pc] em diferentes concentrações de captopril. Branco: Solução tampão Tris 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

É conhecido que um sistema catalítico comporta-se como um sistema eletroquímico controlado por difusão⁶⁰, e para verificar este fato, o processo de oxidação do captopril na superfície do sensor foi avaliado em diferentes velocidades de varredura, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 16.

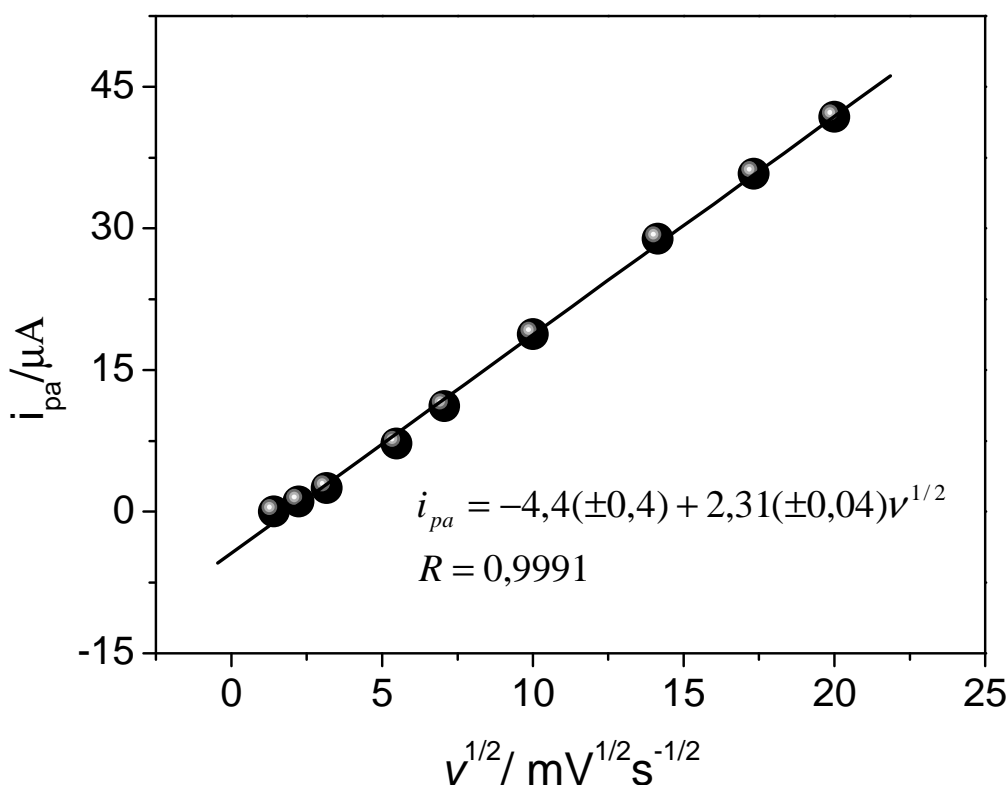


Figura 16: Variação da corrente de pico anódica (i_{pa}) vs $v^{1/2}$ do sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo [Fe(dipy)Pc]. Medidas realizadas em solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 24,5 μmol L⁻¹ de captopril.

Pode-se observar que há uma dependência linear entre a corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura na faixa entre 10 e 500 mV s⁻¹, indicando que a oxidação do captopril na superfície do sensor é controlada pela difusão dessa espécie para a superfície do eletrodo.

Por outro lado, quando foi construído o gráfico da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($i_{pa} / v^{1/2}$) vs v (Figura 17), o perfil obtido sugere fortemente que o processo de oxidação do captopril é eletrocatalítico do tipo EC (electrochemical/chemical), os quais são caracterizados por apresentar uma etapa química acoplada ao processo eletroquímico⁶¹. Este resultado será importante ao propor um mecanismo de resposta para este sensor (Figura 25).

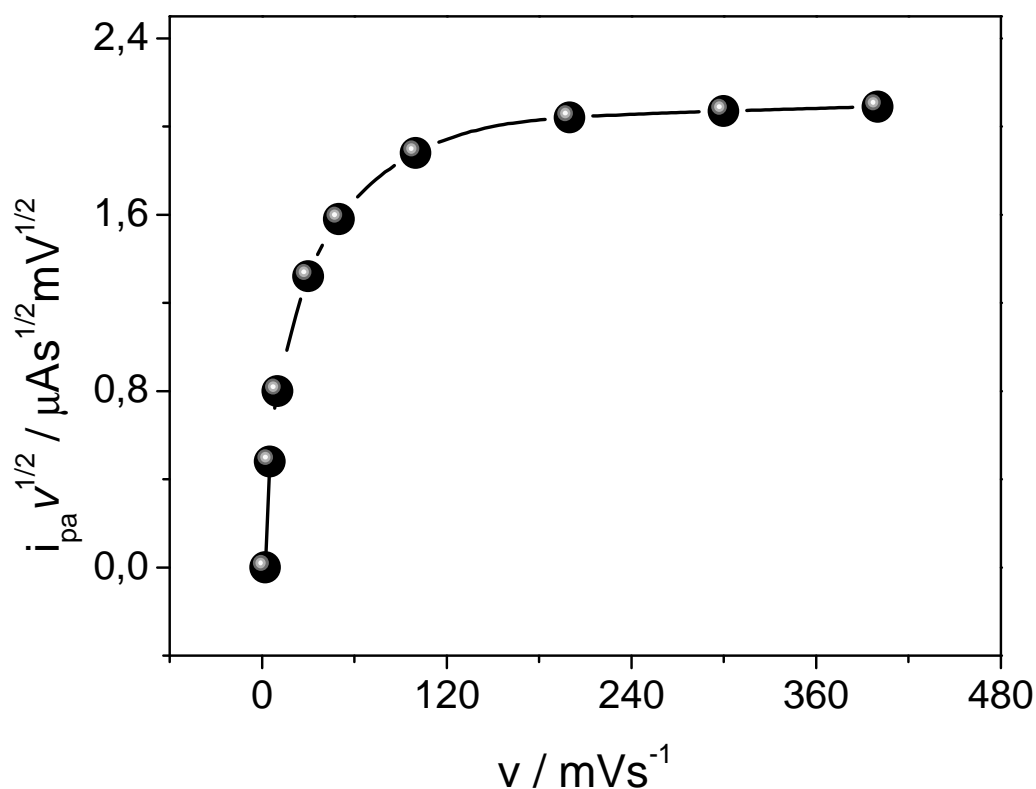


Figura 17: Variação da corrente de pico anódica normalizada ($i_{pa} v^{-1/2}$) vs v . Medidas realizadas em solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 24,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de captopril.

Após verificação da eletrooxidação catalítica do sensor proposto através da voltametria cíclica, a seguir são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados com o objetivo de otimizar a resposta do sensor para captopril.

4.1.2. Otimização da resposta do sensor

No estudo de otimização do sensor para captopril foi empregada a técnica amperométrica, pois é a técnica mais adequada para o acoplamento deste sensor ao sistema em fluxo.

Nestes estudos, almejou-se escolher os parâmetros que permitissem obter maior sensibilidade, estabilidade e seletividade das medidas. Para isto, foram

otimizados parâmetros como pH e concentração do tampão; potencial aplicado e quantidade de complexo de ferro na pasta de carbono.

Os resultados mostraram que em tampão TRIS (Figura 18) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidos maiores sinais de corrente com altas sensibilidades. Para concentrações de TRIS acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a sensibilidade do sensor se manteve praticamente constante (Figura 19).

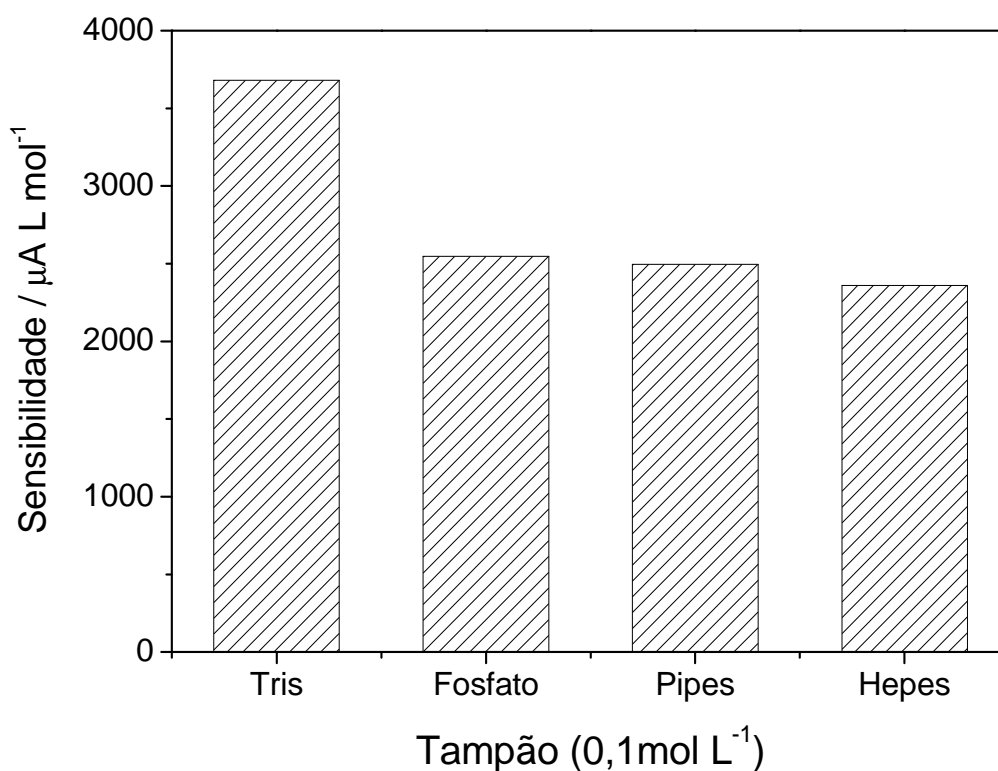


Figura 18: Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função do tipo de tampão usado como eletrólito suporte nas análises amperométricas para determinação de captopril. Medidas realizadas em $0,175 \text{ V vs Ag|AgCl (KCl}_{\text{sat}})$, tampão TRIS (pH 8,0).

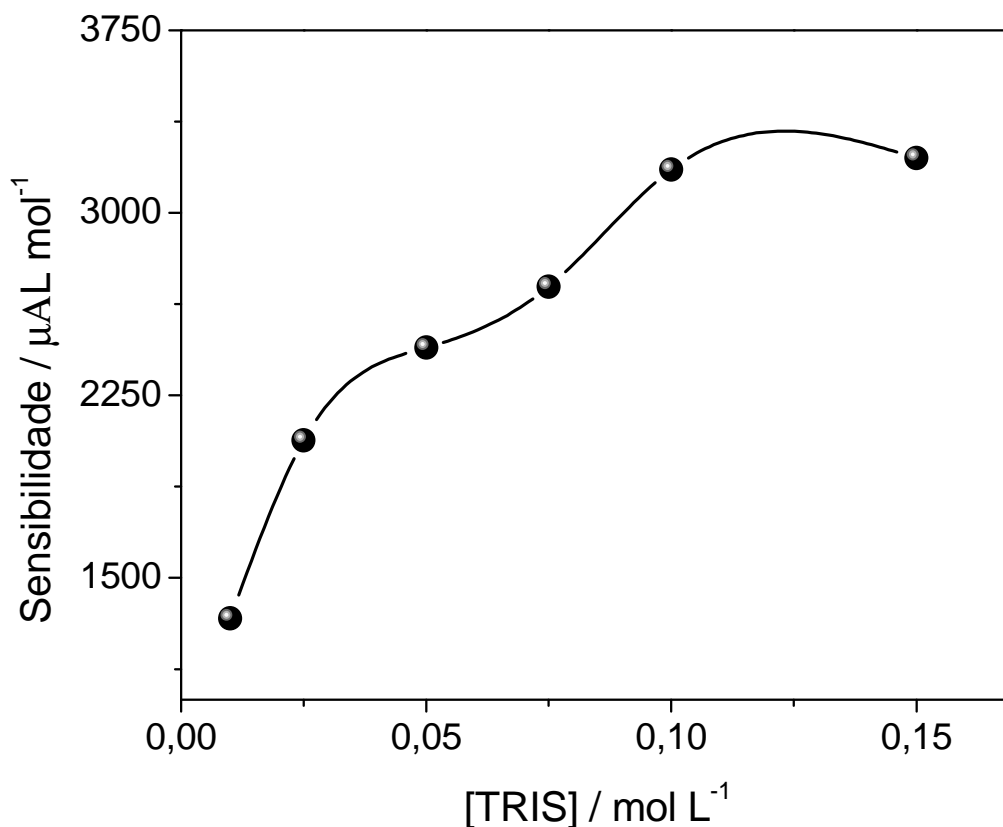


Figura 19: Perfil de resposta apresentado pelo sensor proposto em função da concentração do tampão TRIS. Medidas realizadas em 0,175 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat}).

A Tabela 3 mostra todos os parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de captopril. E como pode ser visto nessa tabela, o sensor preparado com pasta de carbono contendo 23 % (m/m) de complexo de ferro, mostrou melhor desempenho em solução tampão TRIS com concentração de 0,1 mol L⁻¹ em pH 8,0 e potencial aplicado de 0,175 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat}). Desta forma, estas variáveis foram fixadas para a aplicação do sensor nas análises de captopril em batelada.

Tabela 3: Parâmetros avaliados na otimização do sensor biomimético para determinação de captopril.

Parâmetros Avaliados						
Quantidade de complexo na pasta / % (m/m)	13	23	31	37,5	---	---
pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
Tampão	Acetato	Fosfato	Hepes	Pipes	TRIS	----
[TRIS] / mol L ⁻¹	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1	0,15
Potencial vs Ag AgCl / mV	100	125	150	175	200	250

4.1.3. Perfil de resposta do sensor

Sob as condições otimizadas, o sensor apresentou perfil amperométrico de resposta como mostrado na Figura 20 e 21, onde a curva analítica é obtida a partir dos dados amperométricos.

A curva analítica mostrou uma faixa linear de resposta para o captopril entre 25 e 165 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com uma sensibilidade de 2315 (± 61) $\mu\text{A L mol}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de 0,9 e 3,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O limite de detecção foi calculado a partir da relação $3S/N^{62}$, onde S/N corresponde ao sinal/ruído da medida. Já o limite de quantificação foi calculado como sendo 3,3 vezes o limite de detecção ou $10S/N^{62}$.

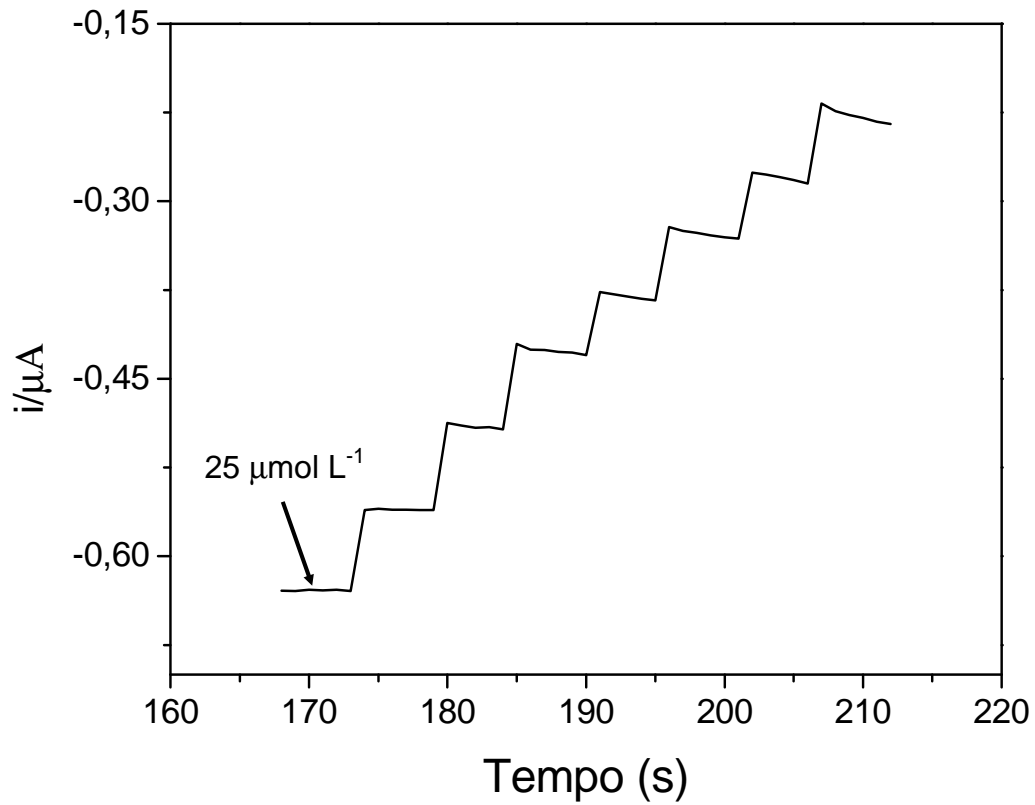


Figura 20: Perfil amperométrico do sensor nas condições otimizadas, obtido para adições sucessivas de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de captopril.

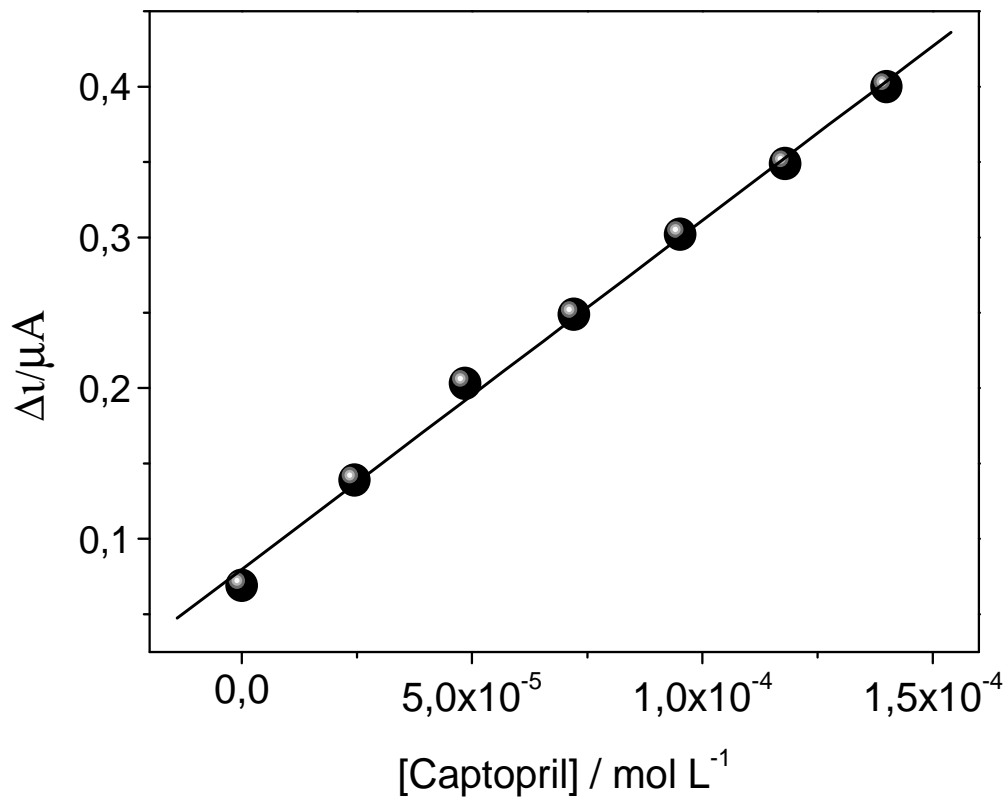


Figura 21: Curva analítica obtida com os resultados obtidos na amperometria da Figura 20.

A equação da reta que representa os dados da Figura 21 é mostrada na equação 4 a seguir:

$$\Delta i/\mu A = 0,08 (\pm 0,01) + 2315 (\pm 61) [\text{Captopril}] / \text{mol L}^{-1} \quad \text{Equação 2}$$

Na Tabela 4 são mostradas todas as características analíticas apresentadas pelo sensor em sistema em batelada. Como pode ser observado, a reprodutibilidade do sensor biomimético no sistema em batelada pode ser verificada através do estudo de reprodutibilidade interdias e intradias, pelo cálculo do desvio padrão relativo (RSD). O tempo de vida do eletrodo também foi realizado tanto em uso contínuo, como também a seco, sendo ambos os resultados obtidos, bem promissores.

Tabela 4: Características analíticas mostradas pelo sensor para determinação de captopril em sistema batelada.

Parâmetro (unidade)	Resposta
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	25 – 165
Sensibilidade ($\mu\text{A Lmol}^{-1}$)	2315 \pm 61
Coeficiente de Correlação	0,9983 (n=7)
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,9
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3,1
Reprodutibilidade intradia (RSD, n=6 sensibilidades de curvas analíticas)	3,0%
Reprodutibilidade interdia (RSD, n=6 sensibilidades de curvas analíticas)	2,5%
Estabilidade operacional mantendo 95% sinal inicial	35 determinações
Tempo de vida (uso contínuo)	20 dias consecutivos
Tempo de vida (armazenado a seco)	Acima de 30 dias

Observa-se que o sensor apresentou ótica sensibilidade e estabilidade operacional, assim como tempo de vida longo e tempo de resposta curto (0.5 s). Todas estas características permitiram o acoplamento bem sucedido deste sensor ao sistema em fluxo, tal como será mostrado posteriormente.

4.1.4. Estudo da seletividade

Para realizar este estudo a resposta amperométrica do sensor foi avaliada para 17 fármacos, com diversas estruturas e classificações, além do captopril (Figura 22), incluindo alguns compostos contendo enxofre na formulação.

Observa-se que o sensor não apresentou resposta para nenhum dos 17 compostos estudados (Tabela 5), tanto na amperometria como na voltametria cíclica. Neste último caso, o perfil do branco (eletrólito suporte), não apresentou mudanças significativas no voltamograma cíclico na presença dos diversos fármacos.

Tabela 5: Fármacos analisados no estudo da seletividade.

Fármacos	Sinal Analítico	Fármacos	Sinal Analítico
CAPTOPRIL	SIM	Lidocaína	n.d.
Dipirona	n.d.	Metronidazol	n.d.
Paracetamol	n.d.	Piridoxina	n.d.
Diclofenaco	n.d.	Secnidazol	n.d.
Cloridrato de quinina	n.d.	Amitriptilina	n.d.
Clindamicina	n.d.	Mebendazol	n.d.
Digoxina	n.d.	Tetraciclina	n.d.
Cloridrato de efedrina	n.d.	Ranitidina	n.d.
Fluconazol	n.d.	Sulfato de neomicina	n.d.

nd = não detectado

Desta forma, estes resultados sugerem que o sensor à base de *bis*(piridil)-ftalocianinaferro (II), é seletivo para captopril em relação a outros fármacos, tal qual, é esperado para um dispositivo que visa mimetizar um biossensor enzimático.

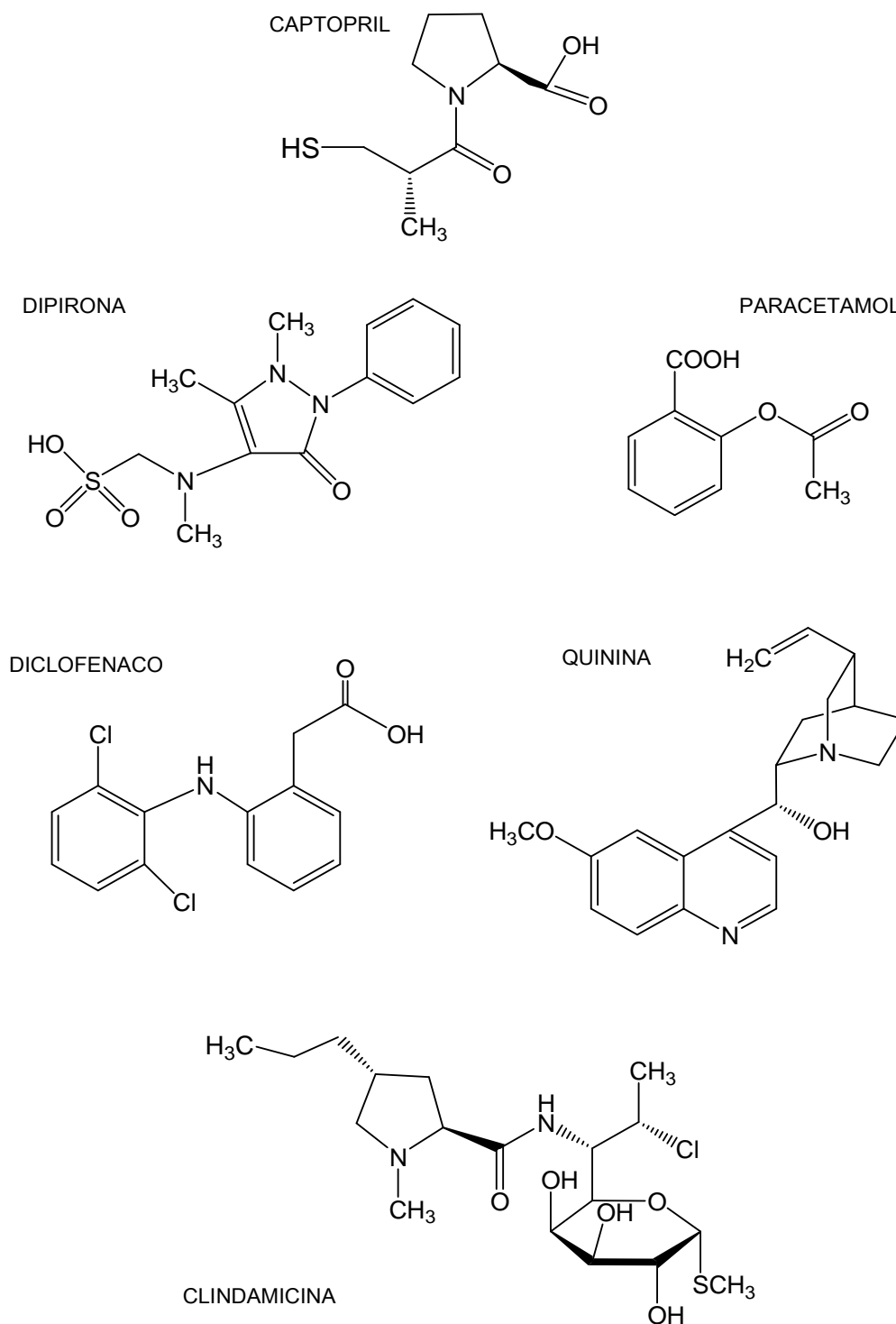


Figura 22: Estruturas químicas do captopril e dos fármacos avaliados no estudo da seletividade do sensor.

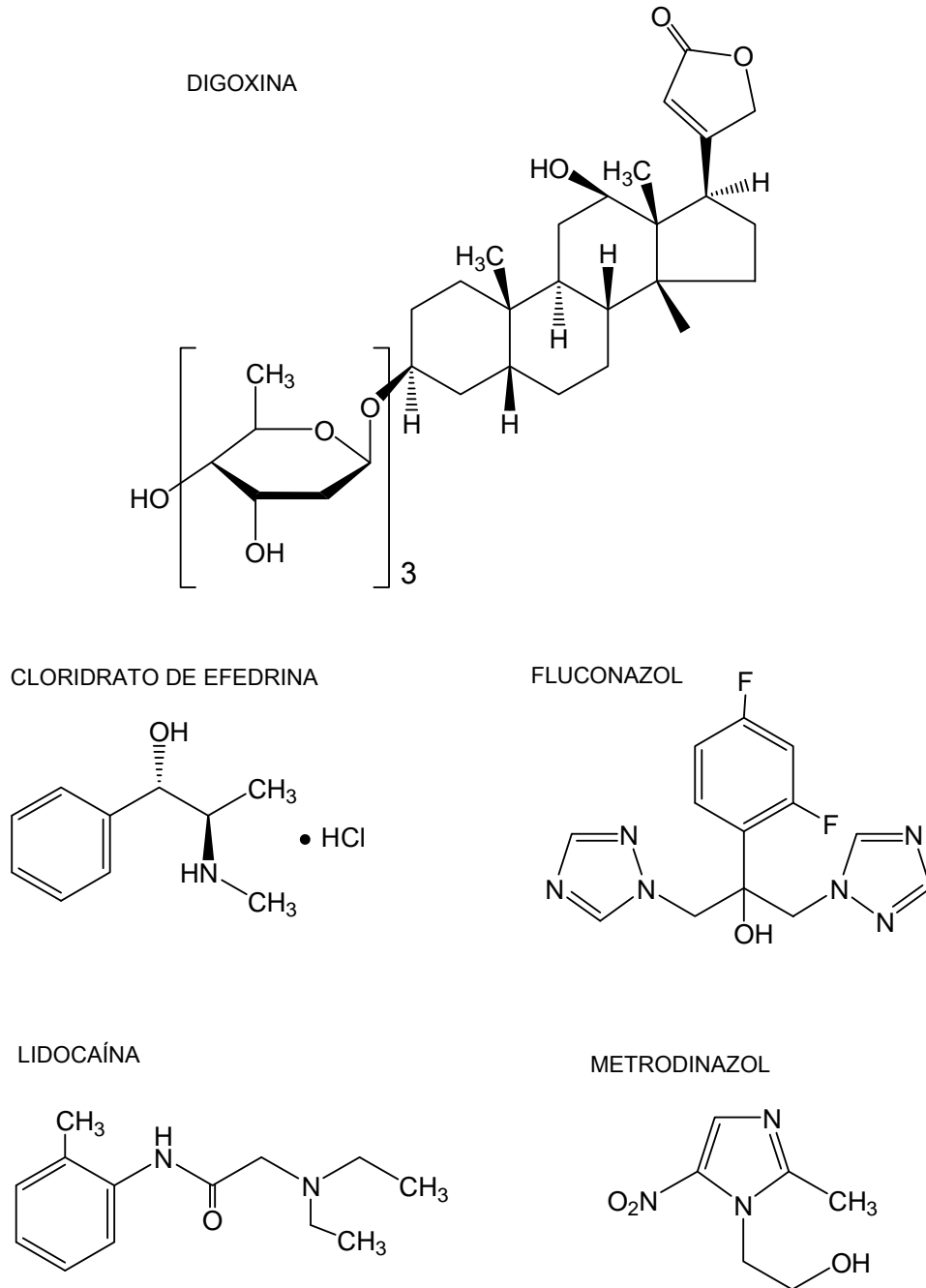


Figura 22: Estruturas químicas do captopril e dos fármacos avaliados no estudo da seletividade do sensor (continuação).

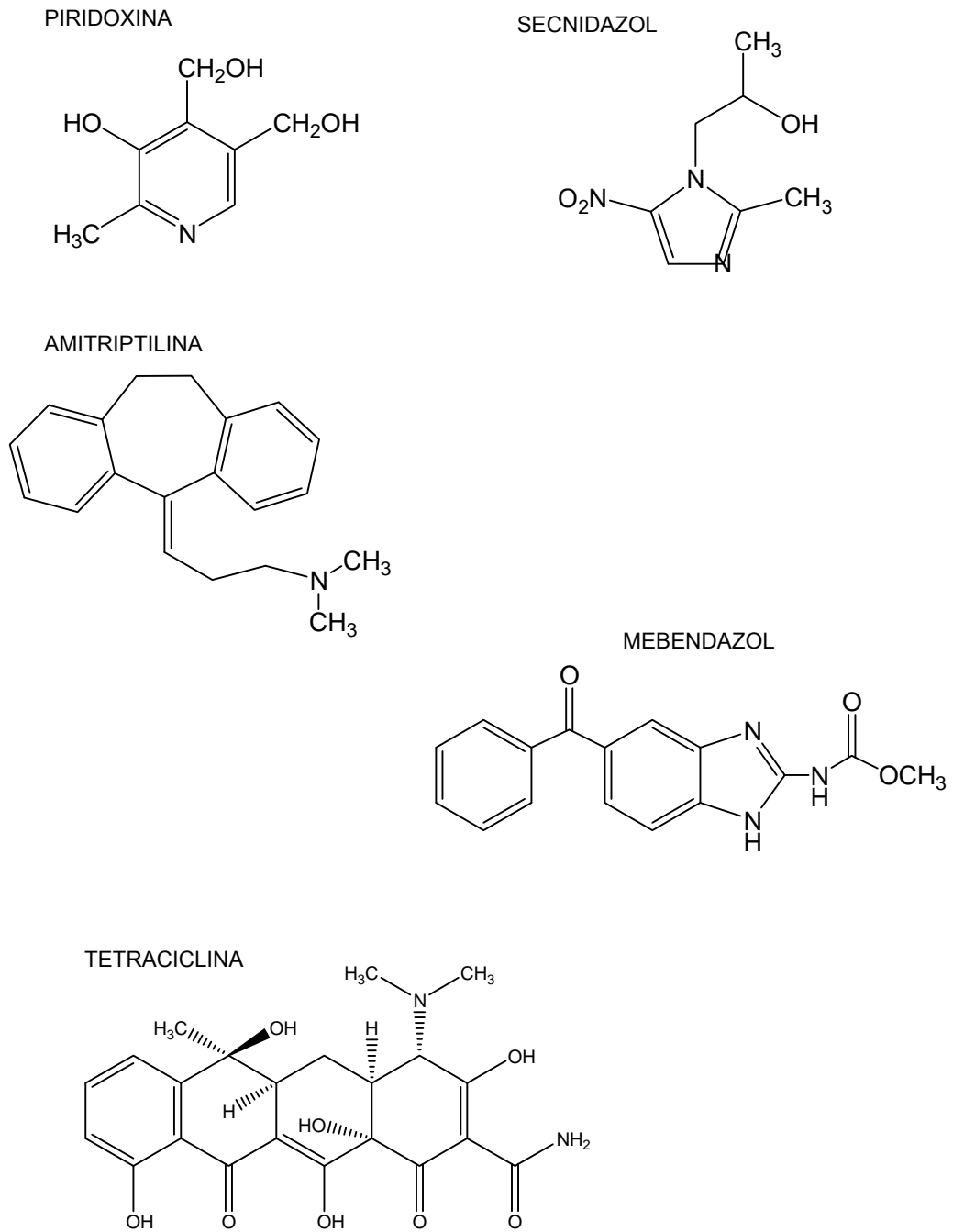


Figura 22: Estruturas químicas do captopril e dos fármacos avaliados no estudo da seletividade do sensor (continuação).

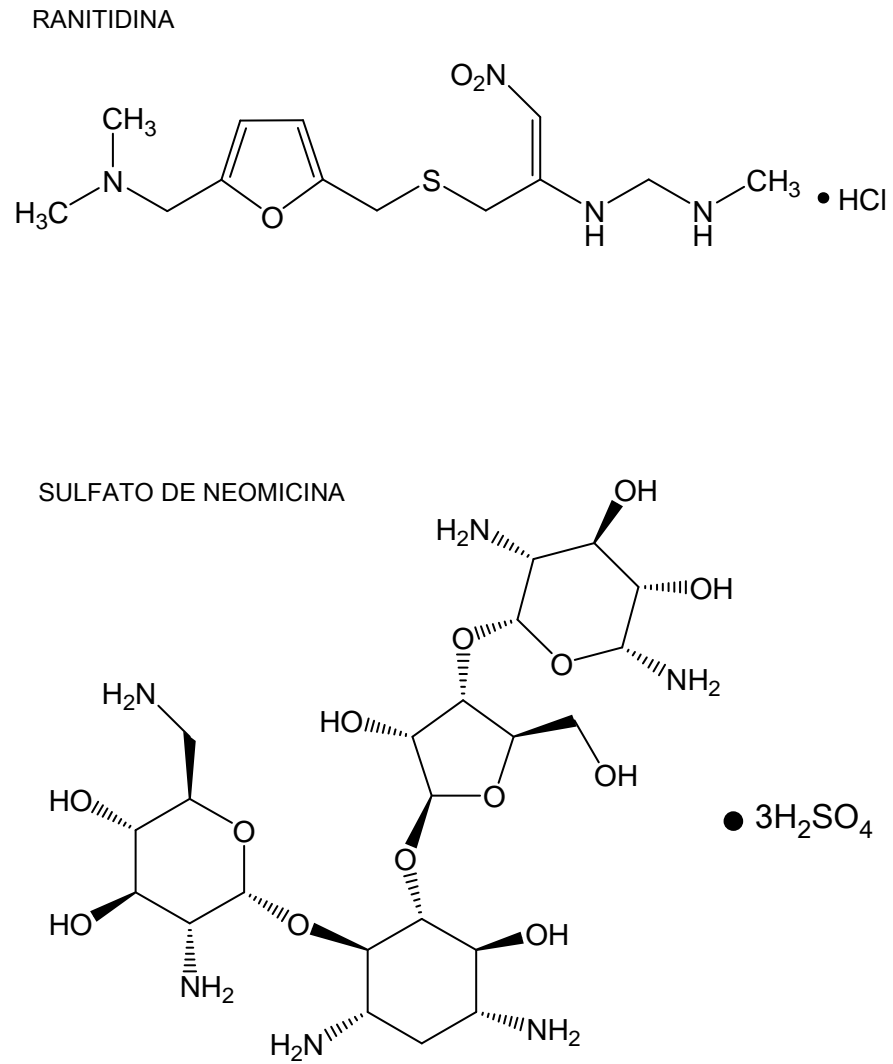


Figura 22: Estruturas químicas do captopril e dos fármacos avaliados no estudo da seletividade do sensor.

4.1.5. Verificação do caráter biomimético do sensor

Visando verificar se o sensor proposto apresenta um comportamento similar aos sensores enzimáticos, o perfil de resposta foi avaliado até a região da saturação, obtendo-se o gráfico mostrado na Figura 23.

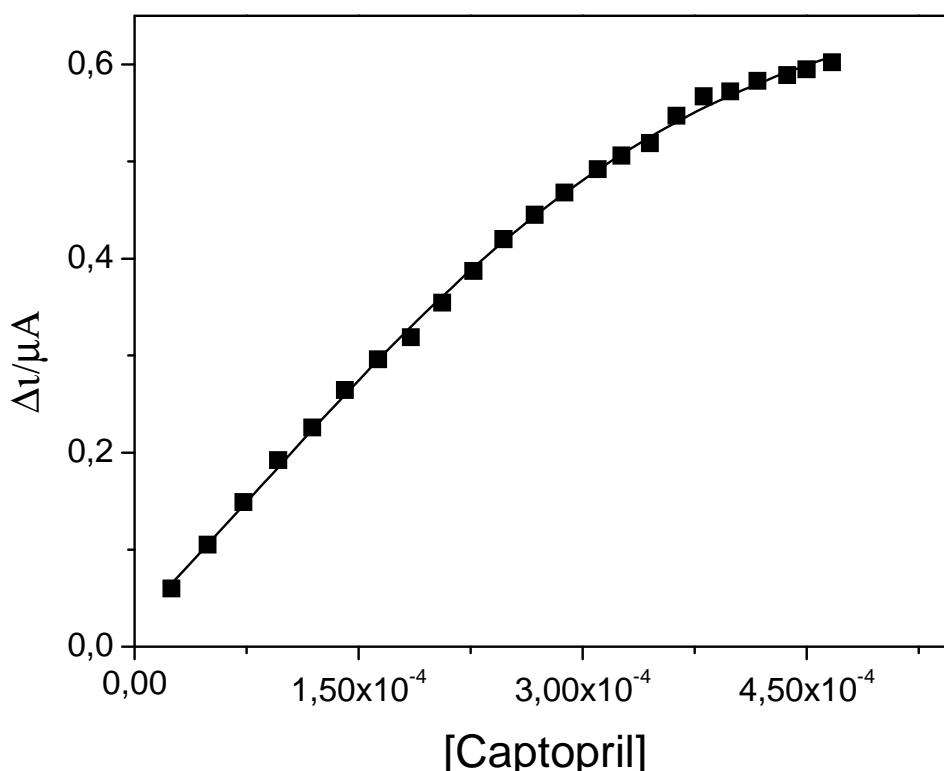


Figura 23: Perfil hiperbólico do sensor à base de *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II).

Da Figura 23 claramente pode ser verificado um perfil hiperbólico, tal como ocorre no caso dos biossensores enzimáticos, indicando que o complexo de ferro na pasta de carbono segue uma cinética do tipo “Michaelis-Menten”⁶³.

Mais importante ainda, foi a obtenção de uma reta (Anexo 2) ao plotar o gráfico de Lineweaver-Burker ou do duplo recíproco (Figura 24), através do qual pode ser calculada a constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app})⁶⁴, a qual apresentou um valor de $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, que é um valor que indica uma forte afinidade⁶⁴ do complexo de ferro pelo “substrato” captopril.

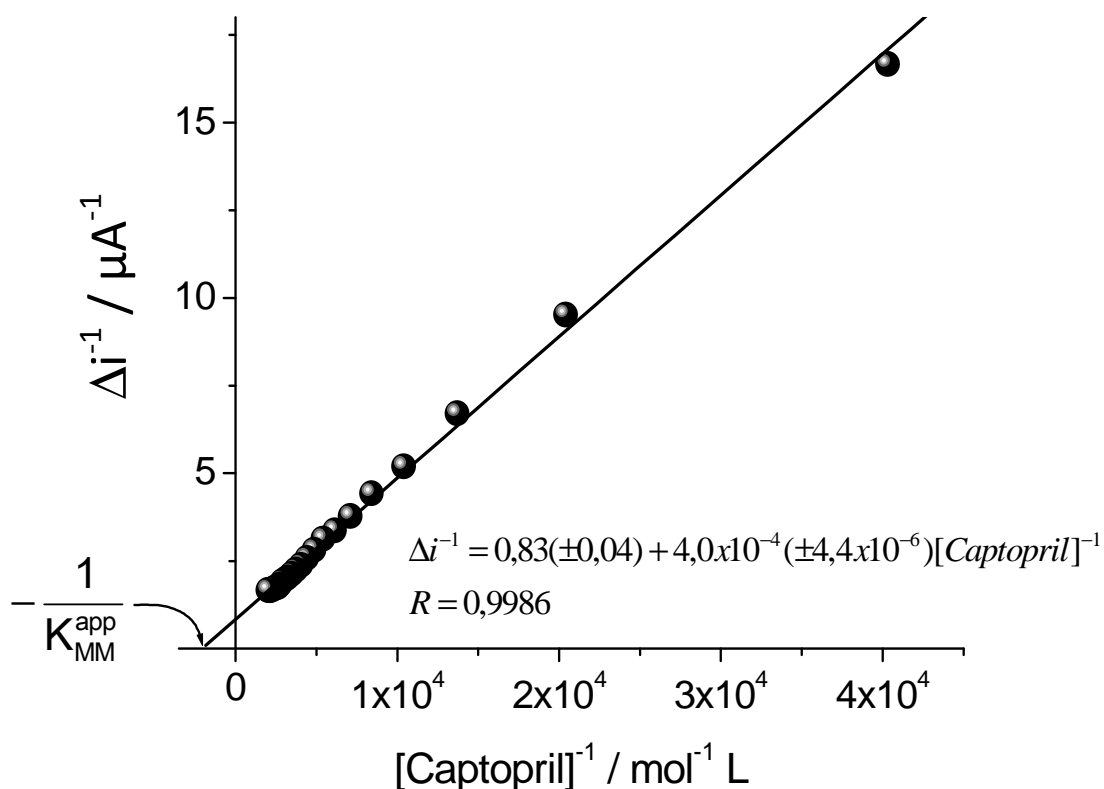


Figura 24: Gráfico do duplo recíproco obtido com os dados da Figura 23.

Com base nos resultados obtidos nas Figuras 14 (c e d), 16 e 17 que sugerem que a oxidação do captopril é eletrocatalítica; com base nos resultados obtidos da resposta do sensor em diversos fármacos, observa-se que o sensor é altamente seletivo; e com base nas Figuras 23 e 24 que demonstram que a resposta do sensor é hiperbólica e que há uma alta afinidade entre o complexo de ferro e o captopril, avaliada pelo valor do K_{MM}^{app} ; pode-se dizer que o sensor construído à base do complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II), trata-se de um sensor biomimético.

4.1.6. Proposta de mecanismo de resposta do sensor

Visando propor um mecanismo de resposta do sensor com base nos resultados até aqui obtidos e com base em dados descritos na literatura⁴⁷, a Figura 25 mostra um esquema para a resposta do sensor.

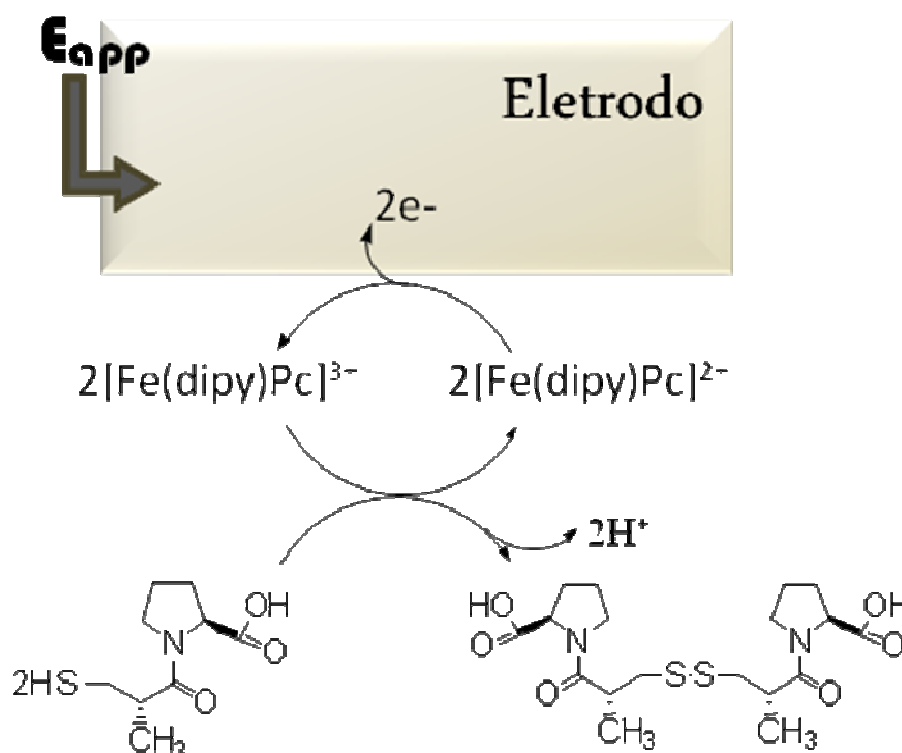
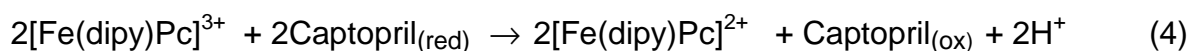
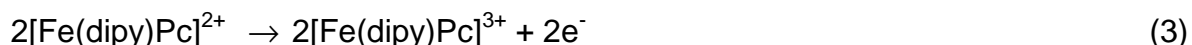


Figura 25: Mecanismo de resposta proposto para a oxidação de captopril na superfície do sensor à base de [Fe(dipy)Pc].

Neste mecanismo é proposta inicialmente a oxidação eletroquímica do íon ferroso (etapa eletroquímica, reação 3) para formar o íon férrico. Na presença do captopril ocorre a reação (etapa química, reação 4) entre o captopril e o íon férrico, o qual se reduzirá novamente para íon ferroso, oxidando para captopril-dissulfeto. Sendo que a corrente de reoxidação do Fe(II) para Fe(III) será proporcional à concentração do captopril na amostra.



4.1.7. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras

4.1.7.1 Análise de medicamentos

Determinados os parâmetros de otimização para o sensor na identificação do captopril, aplicou-se o método proposto em formulações comerciais de medicamentos.

A metodologia adotada para a determinação de captopril nas formulações farmacêuticas foi a de adição de padrão, e a Figura 26 mostra o perfil de resposta para a análise do medicamento genérico da indústria farmacêutica Medley[®] contendo 25 mg de captopril em cada comprimido.

Com o objetivo de validar os resultados obtidos na determinação de captopril pelo sensor biomimético proposto, as amostras de medicamentos foram analisadas pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na Figura 27 mostra-se um cromatograma obtido para um padrão de captopril, e na Figura 28 mostra-se a respectiva curva analítica cromatográfica.

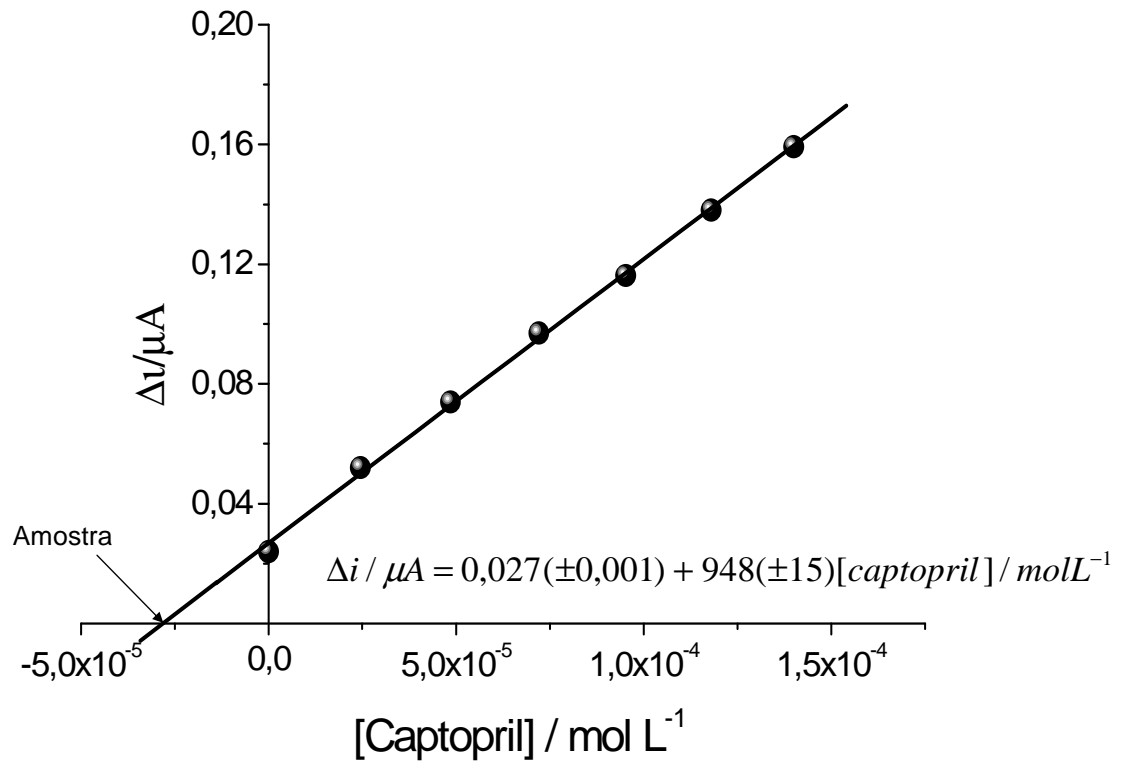


Figura 26: Perfil da curva de adição de padrão para a análise de medicamento genérico contendo 25 mg por comprimido de captopril.

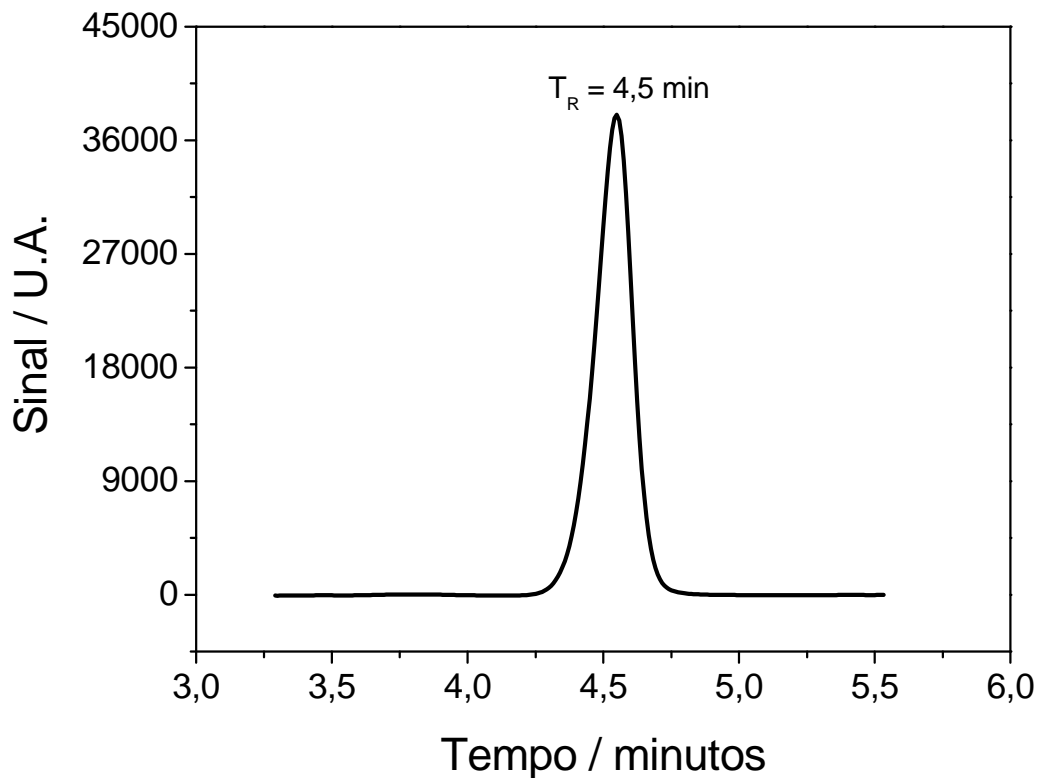


Figura 27: Cromatograma obtido a partir da injeção de $3,45 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ (75 ppm) de solução padrão de captopril. T_R : Tempo de retenção.

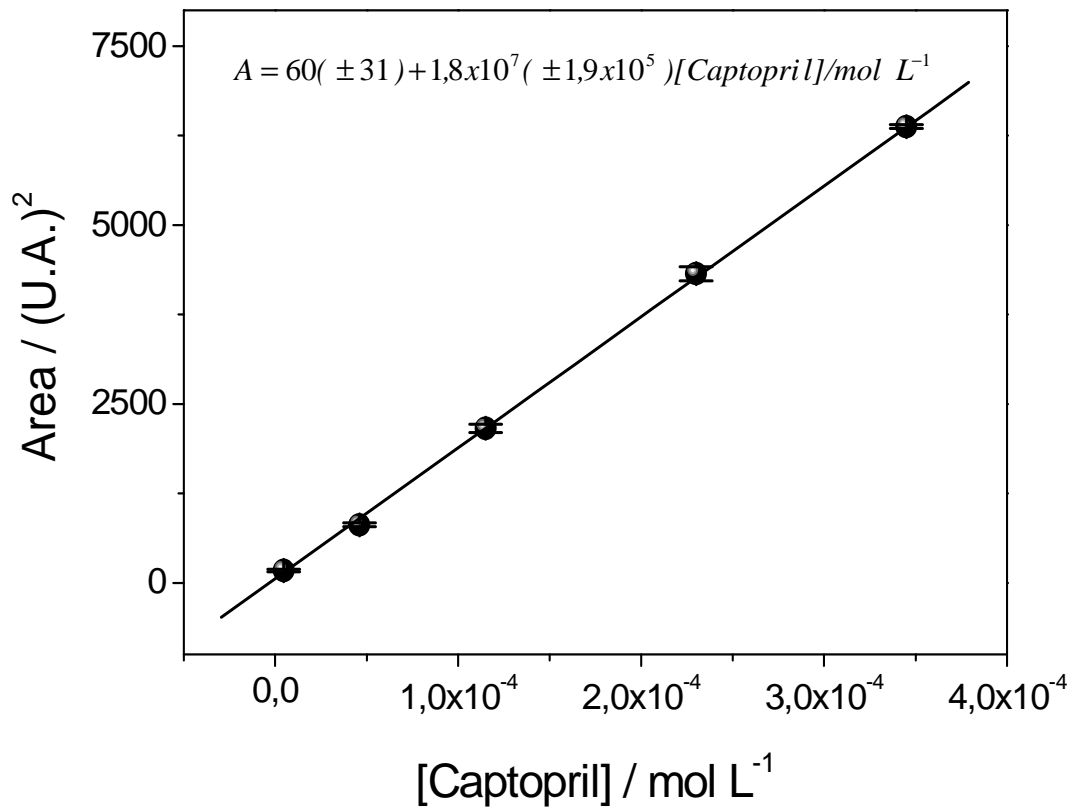


Figura 28: Perfil da curva analítica obtida para o método de referência em diferentes concentrações de captopril.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados obtidos na análise de seis medicamentos através do sensor proposto e do método oficial de análise preconizado pela Farmacopéia⁵⁷⁻⁵⁸.

Tabela 6: Comparação dos resultados obtidos com o sensor proposto em batelada e com o método oficial de análise.

Medicamento (marca, lote, validade)	Valor Nominal (mg comprimido ⁻¹)	Valores obtidos (mg comprimido ⁻¹)		Erro % (Sensor/HPLC)
		Método oficial	Método proposto	
Captopril genérico (Medley, 08090130, Jun 2010).	12,5	11,9	11,9	0,0
Captopril (Medley, 08101209, Out 2010).	25	23,8	24,8	+4,0
Capoten [®] (Bristol-Myers Squibb, 8k0663, Abr 2010).	25	25,0	24,5	-2,0
Captopril genérico (Medley, 09030185, Fev 2011).	50	47,5	48,0	+1,1
Captopril genérico com 50 mg de hidroclorotiazida (Medley, 08050794, Mai 2010)	50	50,0	48,0	-4,0
Lopril [®] com 25 mg de hidroclorotiazida (Bristol-Myers Squibb, 6M0257, Nov 2009)	50	42,5	43,0	+1,1

Como pode ser observado na Tabela 6, o sensor proposto mostrou resultados estatisticamente iguais ao método oficial de análise, validando a metodologia proposta para a análise de captopril em medicamentos.

4.1.7.2. Análise de amostra biológica

Na análise em batelada de amostras biológicas, a urina de sete participantes (3 homens e 4 mulheres) foram enriquecidas com captopril. Dos sete participantes, um deles consumia o fármaco captopril para controle da pressão arterial (7M) e seis deles eram voluntários saudáveis.

Os resultados do teste da recuperação são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados da recuperação do captopril em amostras biológicas de seis doadores voluntários.

Amostra	[Captopril] / $\mu\text{mol L}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionada	Encontrada	
1H	24,5	24,0	96,8
2H	24,5	23,0	95,2
3H	24,5	24,5	100,0
4M	24,5	26,0	104,8
5M	24,5	24,0	98,8
6M	24,5	24,0	98,0
7M	24,5	55,0	224,8

As análises da recuperação para as amostras 1H até 6M, encontraram-se dentro do esperado. Sendo a amostra 7M apresentou um sinal de corrente maior, pois trata-se de um indivíduo que consome captopril duas vezes por dia na dosagem de 25 mg comprimido⁻¹, e cujo teor de captopril por cada 100 mL de urina foi calculado a partir dos dados obtidos pelo sensor, sendo de 54,32 mg.

Este resultado mostra-se a viabilidade do sensor proposto em amostras biológicas. Entretanto para resultados mais exatos, posteriormente será demonstrada a aplicação do sensor em FIA na análise da amostra 7M, e sua comparação com o método de referência.

4.1.7.3. Análise de amostras ambientais (rios)

As amostras de águas de rios foram coletados em várias localidades próximas à cidade de Araraquara, sendo avaliada a recuperação em amostras enriquecidas com captopril usando o sensor proposto, com a finalidade de verificar a viabilidade do uso deste sensor nesse tipo de amostras.

Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Dados obtidos na recuperação de captopril em amostras águas de rios.

Rio	[Captopril] / $\mu\text{mol L}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionada	Encontrada	
Jacaré Pepira	24,5	23,0	95,2
Jacaré Guaçu	24,5	23,0	92,0
Jaú	24,5	26,0	108,0
Tietê ¹	24,5	24,9	99,6
Tietê ²	24,5	25,0	84,0
Tietê/Ponte Iguaçu	24,5	25,0	100,8

Tietê¹: Corresponde à região do rio antes da barragem da cidade de Barra Bonita;

Tietê²: Corresponde à região do rio após a barragem da cidade de Barra Bonita.

Os resultados encontrados na recuperação em batelada de captopril em amostras de águas de rios como pode ser visto na Tabela 8, evidenciam que nesses meios analisados praticamente não ocorreu efeito de matriz.

A partir dos dados encontrados na aplicação do sensor em diversos tipos de amostras, pode-se dizer que o método proposto apresentou resultados satisfatórios e dessa forma pode ser usado como um método alternativo ao método oficial de análise para a quantificação de captopril.

4.2. Estudos em fluxo

A seguir, vistas as características satisfatórias do sensor biomimético para determinação de captopril, desenvolvido neste trabalho, principalmente em relação ao curto tempo de resposta e a ótima estabilidade operacional. São apresentados a seguir as etapas de otimização e os resultados obtidos no acoplamento deste sensor biomimético a um sistema por injeção em fluxo, o qual foi usado como um detector altamente sensível e seletivo para a determinação de captopril.

4.2.1. Otimização do sistema FIA

Nestes estudos foi empregado como fluido carregador a solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ em pH 8,0; que foi aquela que permitiu obter os melhores resultados nos estudos realizados em batelada.

4.2.1.1. Vazão e volume injetado de amostra

Em sistemas em fluxo é comum que o sinal diminua com o aumento da vazão porque há um menor tempo de residência da amostra no detector, e para verificar qual seria a melhor vazão a ser utilizada neste trabalho a Figura 29, mostra os resultados obtidos para vazões entre 0,45 mL min⁻¹ e 3,0 mL min⁻¹, sendo escolhida a vazão de 1,4 mL min⁻¹, que não prejudicará o tempo de análise e ainda por apresentar um valor de corrente próximo ao obtido com a menor vazão.

Para a otimização do volume injetado de amostra foram analisados volumes de 25, 50, 75, 100 e 125 µL. Com os valores obtidos para a corrente observada em cada caso foi construído o gráfico mostrado na Figura 30. Pode-se observar que o sinal aumenta com o volume injetado de amostra chegando a um ponto de saturação em 100 µL. Entretanto, foi escolhido o volume de 75 µL por apresentar um bom sinal de corrente sem afetar a frequência de amostragem.

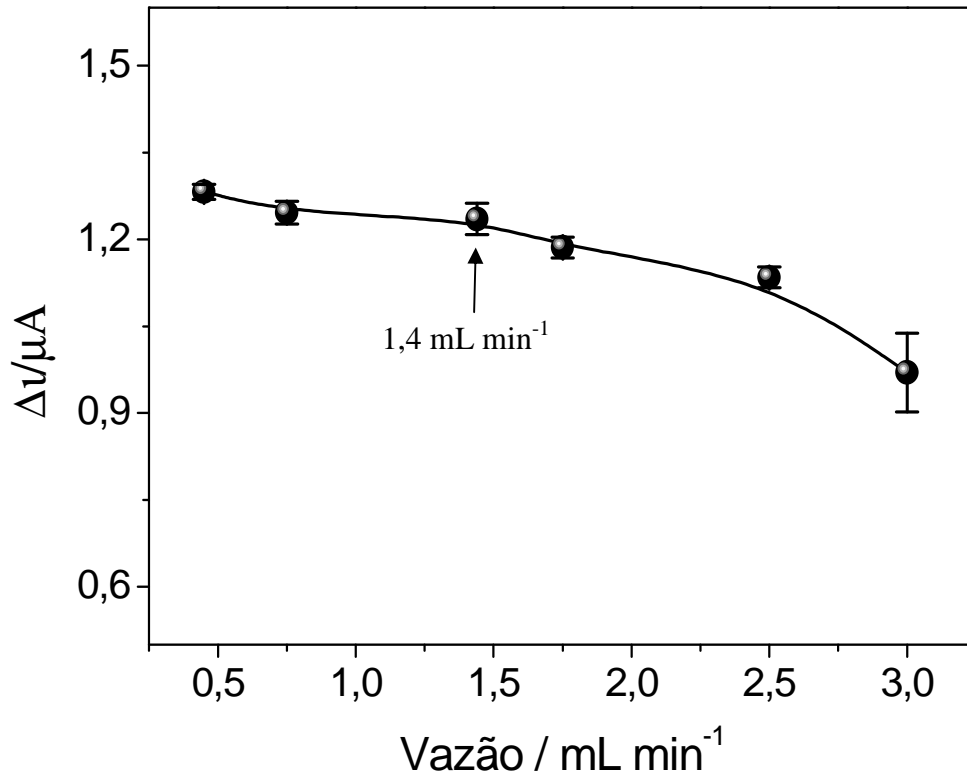


Figura 29: Influência do volume injetado de amostra no perfil da resposta do sensor em fluxo, a uma vazão de 1,4 mL min⁻¹.

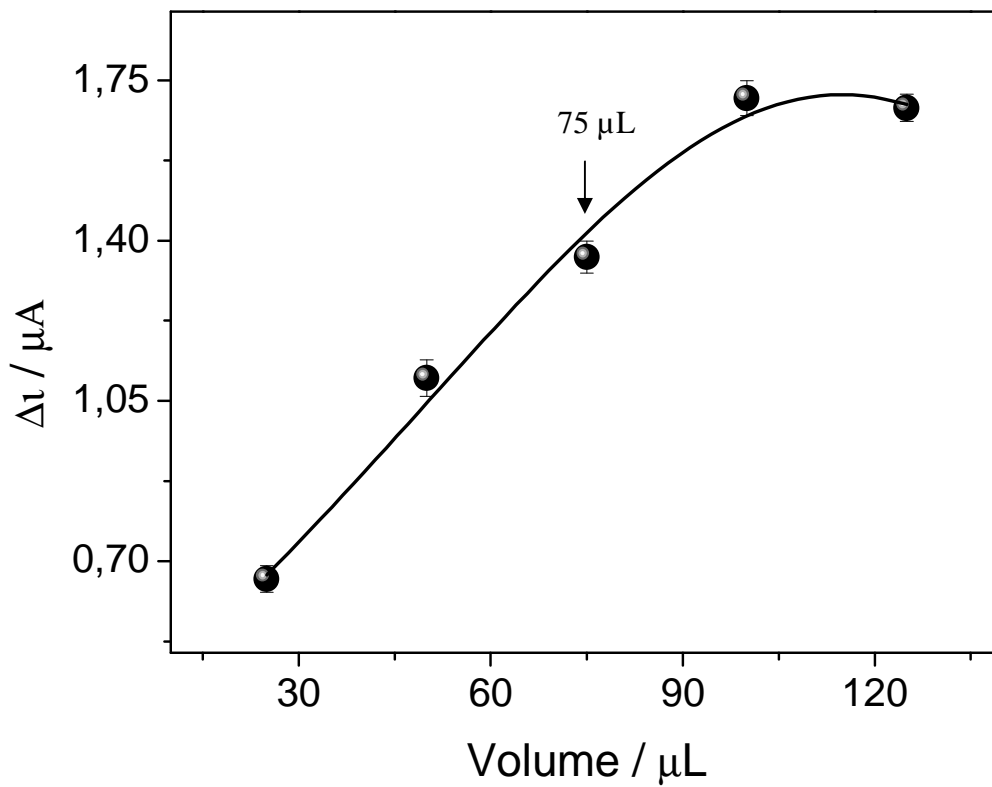


Figura 30: Perfil da resposta do sensor em fluxo no estudo da vazão do sistema, mantendo o volume fixo em 75 μL.

4.2.1.2. Estudo do potencial aplicado em fluxo

Para investigar o potencial que deveria ser aplicado na cela eletroquímica em fluxo *wall-jet*, na qual se emprega um eletrodo de referência Ag|AgCl *home made* e, desta forma, obter os maiores sinais de corrente na oxidação do captopril, foi realizada a otimização do potencial. A Figura 31 mostra o perfil de resposta do sistema em fluxo em função do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho.

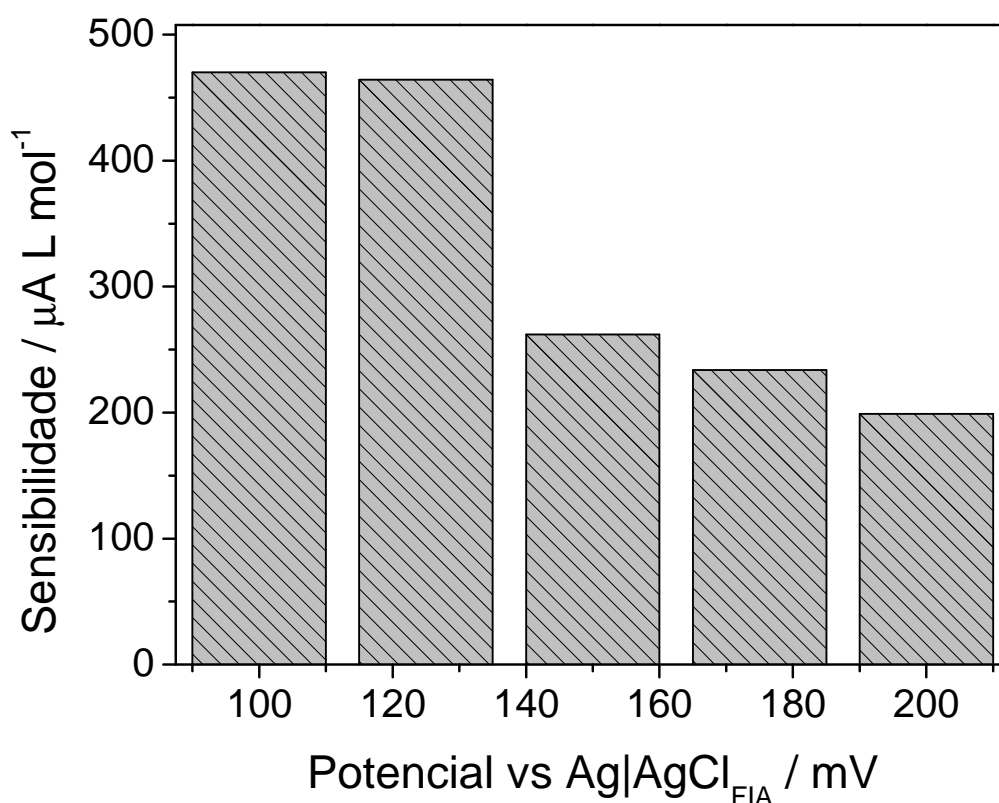


Figura 31: Perfil da resposta do sensor em fluxo em função da sensibilidade vs potencial aplicado. Medidas realizadas injetando 75 μL de soluções padrão de captopril; a uma vazão de 1,4 mL min^{-1} em fluido carregador de tampão TRIS 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0).

Pode-se observar da figura 31 que nos potenciais de +120 e +100 mV vs Ag|AgCl (KCl_{sat})_{FIA}, foram obtidas praticamente as mesmas sensibilidades. Desta forma, para garantir além da sensibilidade uma boa seletividade, o potencial escolhido para a realização das medidas em fluxo foi de +100 mV.

4.2.3. Perfil de resposta do sistema FIA

Com os parâmetros otimizados em FIA para o sensor proposto, foi construída a curva analítica, obtendo-se o perfil de resposta mostrado na Figura 32. O gráfico foi obtido através de injeções sucessivas em triplicata de dez soluções de captopril no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

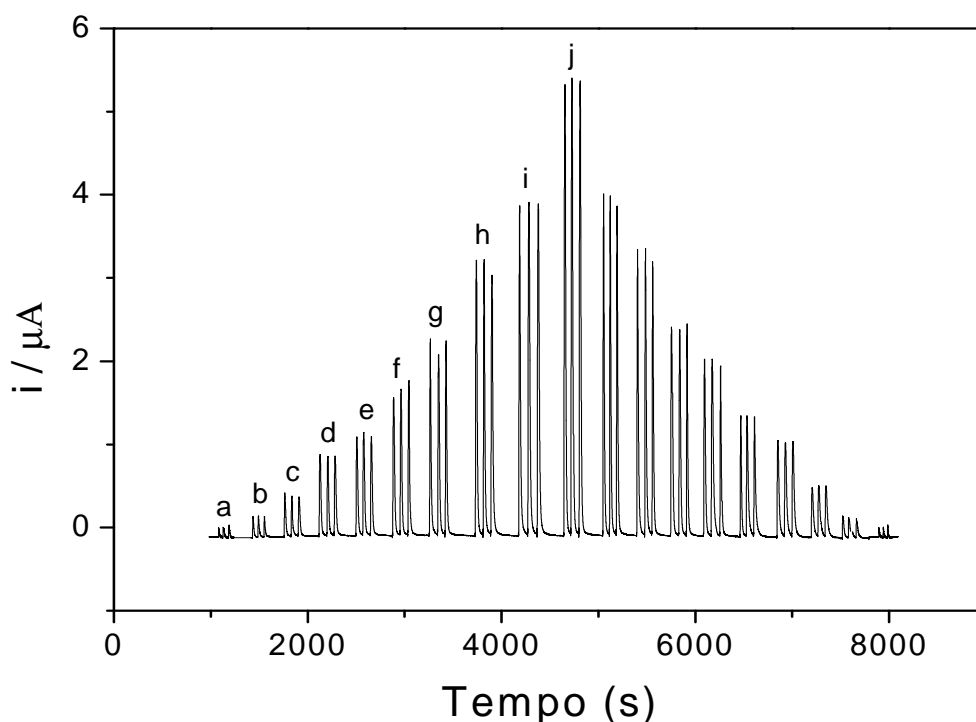


Figura 32: FIAGRAMA otimizado para o sensor proposto no intervalo de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril. Medidas realizadas em tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), $0,1 \text{ V vs Ag|AgCl (KCl}_{\text{sat}}$) e volume injetado de amostra de $75 \mu\text{L}$.

As concentrações na Figura 32 correspondem a: (a) $5,0 \times 10^{-5}$; (b) $2,5 \times 10^{-4}$; (c) $1,8 \times 10^{-3}$; (c) $3,8 \times 10^{-3}$; (e) $5,0 \times 10^{-3}$; (f) $7,5 \times 10^{-3}$; (g) $1,0 \times 10^{-2}$; (h) $1,4 \times 10^{-2}$; (i) $1,8 \times 10^{-2}$ e (j) $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 33 são mostradas as curvas analíticas correspondentes ao sentido crescente (equação 3) e decrescente (equação 4), as quais ajustaram-se segundo as equações a seguir:

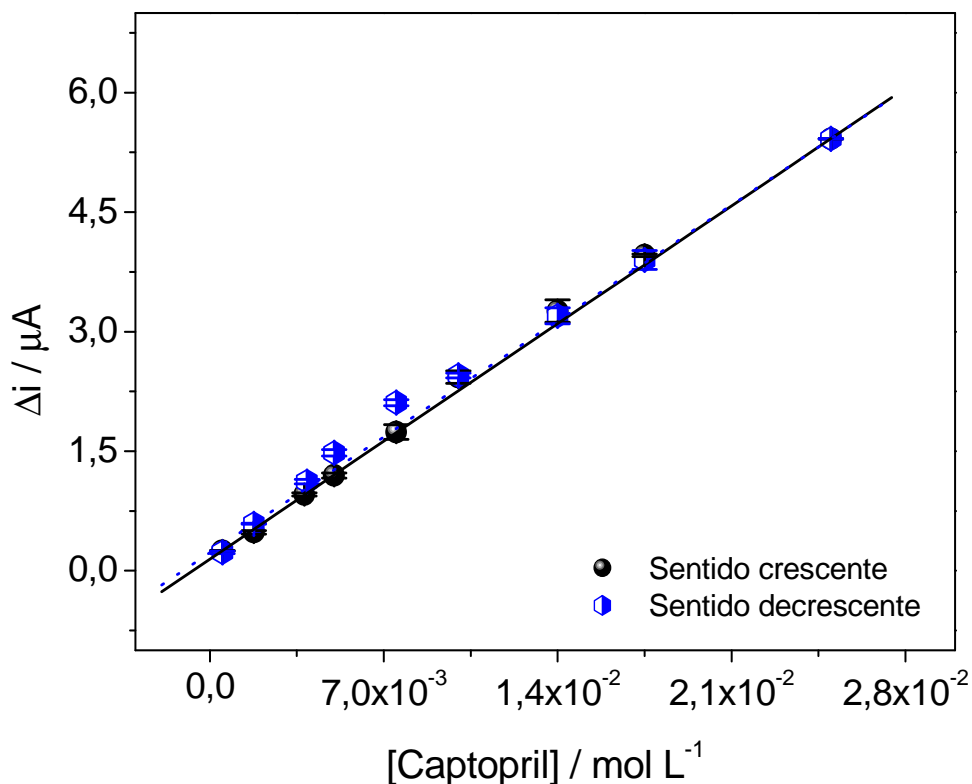


Figura 33: Curvas analíticas construídas no sentido crescente e decrescente de concentrações. Medidas realizadas em tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0), 0,1 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat}) e volume injetado de 75 μL.

$$\Delta i / \mu A = 0,13(\pm 0,01) + 211(\pm 1)[Captopril] / mol L^{-1} \quad \text{Equação 3}$$

Os dados foram ajustados com um coeficiente de correlação linear de 0,9999, para os 9 pontos.

$$\Delta i / \mu A = 0,20(\pm 0,03) + 208(\pm 1)[Captopril] / mol L^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

O coeficiente de correlação linear para esta reta foi de 0,9998, para os 9 pontos.

O limite de detecção foi calculado como $3xS/N$, sendo de $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. E o limite de quantificação foi calculado como $10xS/N$ (ou $3,3xL.D.$) e foi de $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ⁵⁷.

Para calcular a repetibilidade das medidas do sensor em fluxo foi realizado um experimento que consistiu em sete injeções sucessivas de solução $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril (Figura 34). Afim de avaliar a repetibilidade das medidas foi calculado o desvio padrão médio relativo (RSD) obtendo-se um valor de 3,5%.

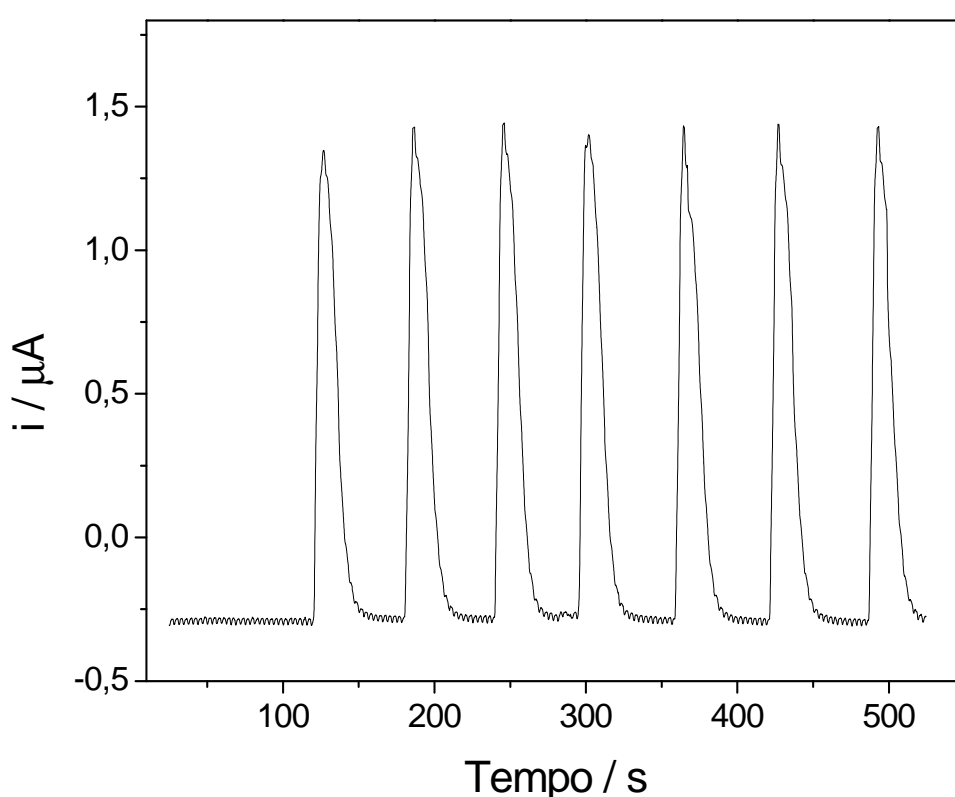


Figura 34: Estudo da repetibilidade para sete injeções consecutivas de solução de captopril $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os estudos da estabilidade operacional do sensor à base de *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II) em fluxo foram realizados durante 5 dias consecutivos sem desligar o fluxo. As medidas foram feitas em intervalos de tempo de 1 hora durante 8 horas por dia, sendo cada experimento corresponde a sete injeções de uma solução padrão de captopril de concentração $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 35.

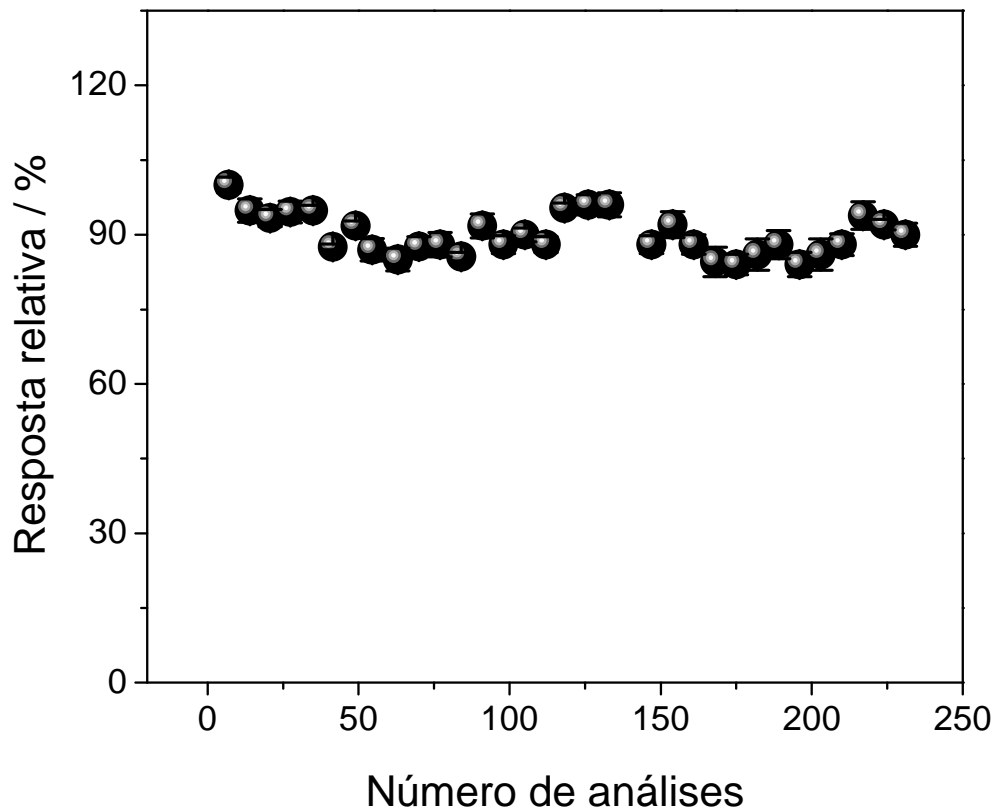


Figura 35: Perfil da resposta do sensor em fluxo para avaliação da estabilidade operacional do sistema.

Durante os experimentos pode-se observar uma queda do sinal após 280 injeções (5º dia – 40 horas x 07 injeções). Entretanto, em um dia de trabalho de 08 horas (56 análises) o número de determinações será suficiente para realização das análises sem perda de sinal.

A Tabela 9 mostra todos os parâmetros otimizados e as características analíticas do sensor em fluxo.

Tabela 9: Parâmetros otimizados e características analíticas do sensor biomimético em FIA.

Parâmetro / (unidade)	Resposta
Potencial aplicado vs Ag AgCl (KCl _{sat}) _{FIA} / (V)	0,1
Vazão / (mL min ⁻¹)	1,4
Volume injetado / (µL)	75
Faixa de resposta / (mol L ⁻¹)	5,0 x 10 ⁻⁵ – 2,5 x 10 ⁻²
Sensibilidade / (µA L mol ⁻¹)	210 ± 1
Limite de quantificação / (mol L ⁻¹)	4,6 x 10 ⁻⁵
Limite de detecção / (mol L ⁻¹)	1,4 x 10 ⁻⁵
Repetibilidade (%RSD) n=7	3,5
Estabilidade operacional / (% do sinal inicial após 5 dias de uso consecutivo)	80%
Freqüência de amostragem (amostras h ⁻¹)	70

4.2.4. Aplicação do sensor biomimético na análise de amostras empregando sistema FIA

4.2.4.1. Estudo dos Interferentes

A determinação do captopril sob a influência de diversas substâncias como potenciais interferentes na determinação de captopril em diversas amostras foi verificada, e os resultados obtidos para uma proporção m/m de interferente:captopril de 10:1, são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de recuperação (%) para solução 5,0 mg de captopril na presença de compostos interferentes na razão 10:1 (m/m) interferente:captopril.

Interferente	Recuperação
Ácido Ascórbico	257%
Ácido Esteárico	102%
Bissulfito de Sódio	100%
Ácido Acetilsalicílico	103%
Cafeína	102%
Lactose	100%
Hidroclorotiazida	99%
Talco	103%
Celulose	102%

Observando a Tabela 10 constatou-se que o ácido ascórbico foi o único composto que apresentou uma alta interferência na determinação de captopril.

Contudo, este resultado não seria um grave problema na análise de amostras como medicamentos, já que o captopril não é ministrado em associação com esta vitamina. Por outro lado, na análise de urina, como as amostras são colhidas em jejum, a presença deste composto seria nula, adicionalmente a ausência de ácido ascórbico nessas amostras pode ser contornada acompanhando a dieta do paciente antes da colheita da urina. E finalmente em amostras coletadas no ambiente é conhecido que o ácido ascórbico se apresenta na forma oxidada⁶⁰, a qual não interfere nas medidas com o sensor proposto. Desta forma, pode-se dizer que a interferência gerada pelo ácido ascórbico na detecção de captopril pode ser perfeitamente administrada.

4.2.4.2. Análise de medicamentos

O método adotado para quantificação do captopril nas amostras farmacêuticas foi o de adição de padrão. Os valores encontrados nas análises foram comparados com o método oficial⁵⁷⁻⁵⁸ na tentativa de validar esse método de determinação em fluxo. Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos nas análises de medicamentos realizados pelo método proposto e oficial.

Tabela 11: Comparação dos resultados obtidos com o sensor proposto em sistema por injeção em fluxo e o método oficial de análise.

Medicamento (marca, lote, validade)	Valores obtidos (mg comprimido ⁻¹)			Erro % (Sensor / HPLC)
	Valor Nominal	Método oficial	Método proposto	
Captopril genérico (Medley, 08090130, Jun 2010).	12,5	11,9	11,5	-3,3
Captopril genérico (Medley, 08101209, Out 2010).	25	23,8	24,0	+0,8
Capoten® (Bristol-Myers Squibb, 8k0663, Abr 2010).	25	25,0	23,5	-6,0
Captopril genérico (Medley, 09030185, Fev 2011).	50	47,5	46,5	-2,1
Captopril genérico com 50 mg de hidroclorotiazida (Medley, 08050794, Mai 2010)	50	50,0	49,5	-1,0
Lopril® com 25 mg de hidroclorotiazida (Bristol-Myers Squibb, 6M0257, Nov 2009)	50	42,5	44,5	+4,7

O sensor proposto apresentou resultados bem próximos ao método oficial, validando, portanto esse método de análise para determinação do captopril.

4.2.4.3. Análise de amostra biológica

As porcentagens encontradas na recuperação das amostras em fluxo das amostras 1H até 6M se encontraram dentro do esperado, não sendo constatado, portanto, nenhum efeito de matriz (Tabela 12).

Tabela 12: Dado dos experimentos de recuperação realizado no sistema FIA, a partir da urina enriquecida com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril de seis doadores voluntários saudáveis.

Análise	Injeção em fluxo (FIA)					
Amostra	1H	2H	3H	4M	5M	6M
Recuperação	95%	106%	98%	102%	99%	104%

Já a quantidade de captopril eliminada pelo usuário do medicamento foi determinada pelo método de adição de padrão, e o Diagrama, assim como a curva analítica correspondente é mostrado nas Figuras 36 e 37.

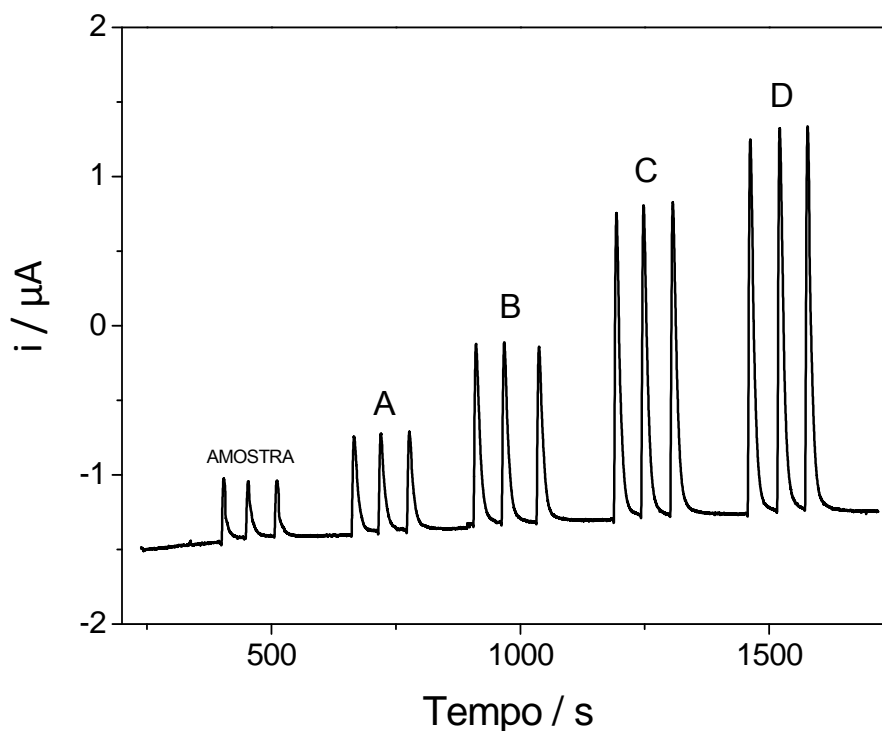


Figura 36: FIAGRAMA obtido na análise pelo método da adição de padrão da urina do usuário de medicamento à base de captopril. [Captopril] em mol L^{-1} : A = $5,0 \times 10^{-5}$; B = $2,0 \times 10^{-4}$; C = $4,0 \times 10^{-4}$; D = $5,0 \times 10^{-4}$.

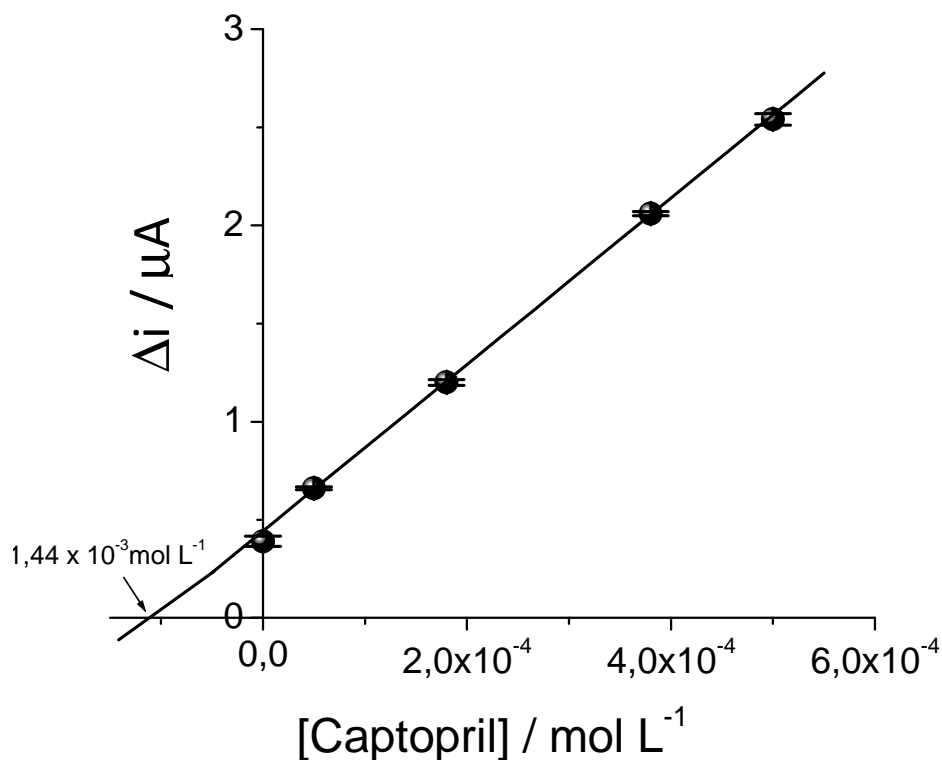


Figura 37: Perfil da curva analítica da adição de padrão na análise da urina do usuário de captopril.

Os resultados obtidos na análise da amostra biológica do indivíduo 7M em FIA e HPLC indicaram uma concentração de captopril encontrada de $1,44 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,47 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. Isso mostra que o sensor biomimético pode ser utilizado para determinar esse fármaco nesse tipo de matriz, uma vez que os valores encontrados na análise do captopril são bem próximos.

O teor de captopril por cada 100 mL de urina foi calculado a partir dos dados obtidos do sensor, sendo encontrado 36,9 mg.

4.2.4.4. Análise de amostra ambiental proveniente de diversas ETEs (Estações de tratamento de esgoto)

As amostras das águas de esgoto coletadas das ETEs das cidades de Araraquara, Campinas e São Carlos foram submetidas a um pré-tratamento conforme mencionado no procedimento experimental. Em seguida foram enriquecidas com captopril e analisada no sistema em fluxo (FIA) aqui proposto, com a finalidade de avaliar os valores da recuperação deste analito. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores da recuperação de captopril encontrados no esgoto bruto e tratado após enriquecimento com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril.

Cidade Amostrada	Valor da recuperação / %	
	Esgoto Bruto	Esgoto Tratado
Araraquara	105	99
Campinas	96	95
São Carlos	93	92

Os resultados encontrados permitiram afirmar que não ocorreram outras reações na qual pudessem comprometer a seletividade do sensor, ou seja, não houve efeito da matriz, apesar de se tratar de uma amostra complexa.

Por outro lado, as amostras de esgoto que não sofreram diluição, como as amostras de esgoto bruto provenientes da região de Araraquara e Campinas, apresentaram fortes indícios da presença de captopril, pois quando injetadas as amostras diretamente no sistema FIA, pequenos sinais de corrente foi observado (Figura 38). Por tal razão as amostras de esgoto bruto foram analisadas através do sistema FIA e do método cromatográfico, em ambos os casos usando adição de padrão.

Nas Figuras 38 e 39 são mostrados os resultados obtidos na análise por FIA do esgoto bruto sem etapa de diluição proveniente da cidade de Araraquara.

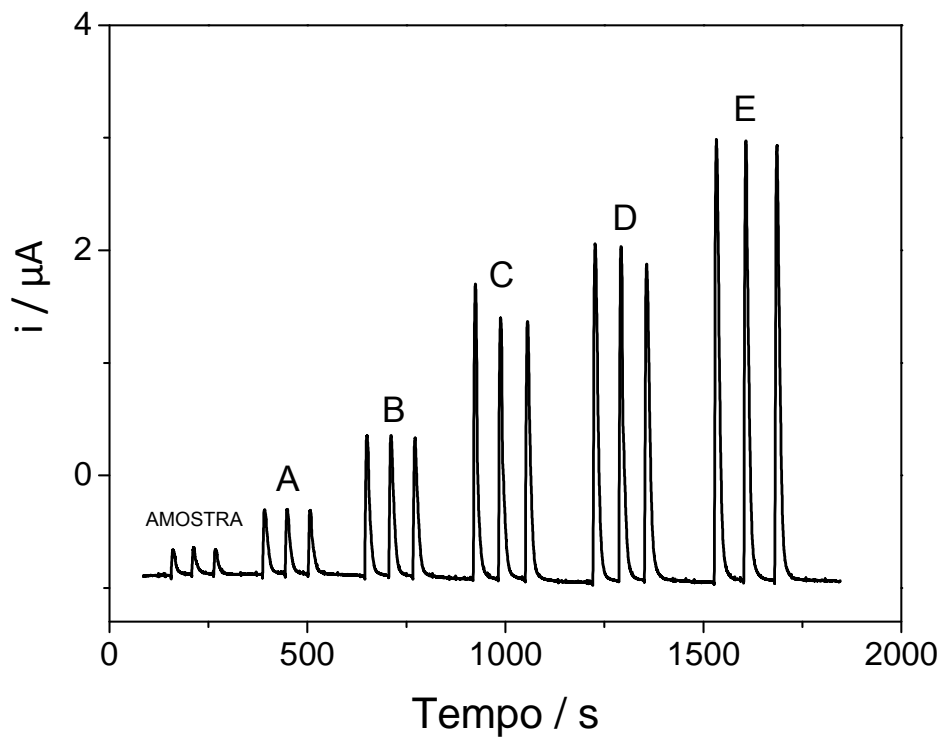


Figura 38: FIAGRAMA obtido na análise pelo método da adição de padrão do esgoto bruto da ETE da cidade de Araraquara. [Captopril] em mol L⁻¹: A = $5,0 \times 10^{-5}$; B = $1,8 \times 10^{-4}$; C = $2,8 \times 10^{-4}$; D = $3,8 \times 10^{-4}$; E = $5,0 \times 10^{-4}$.

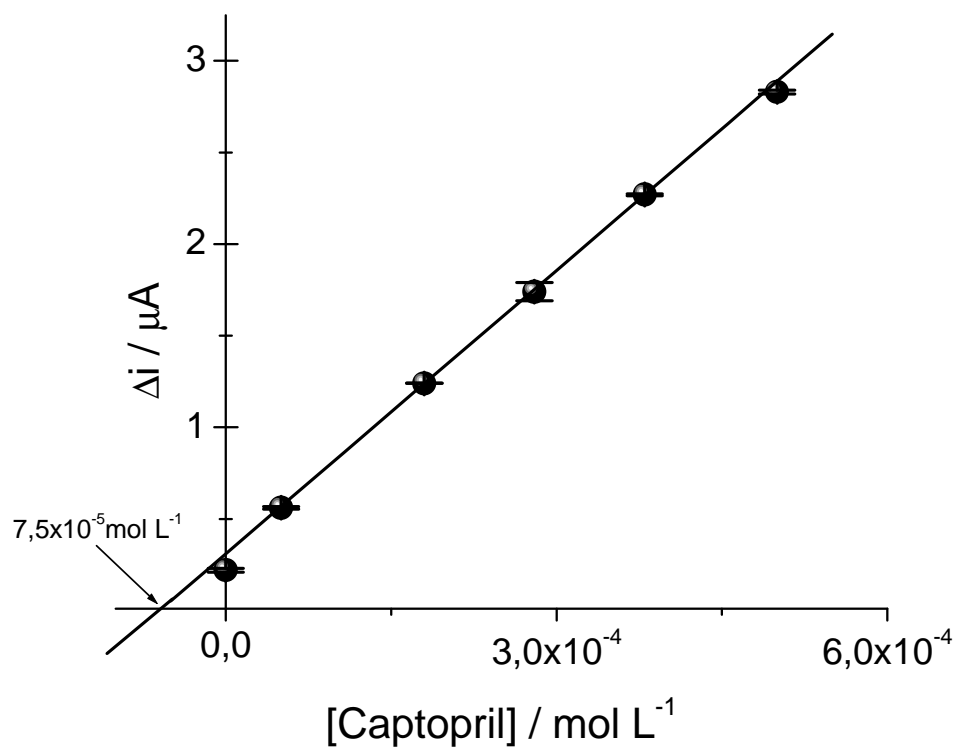


Figura 39: Perfil da curva analítica da adição de padrão na análise do esgoto da ETE de Araraquara.

A Tabela 14 mostra os resultados obtidos na análise das amostras de esgoto bruto das ETEs de Araraquara, Campinas e São Carlos, obtidos através do método FIA e do método de referência.

Tabela 14: Resultados obtidos pelo sensor e HPCL na análise de amostras de esgoto.

Cidade	Quantidade encontrada de captopril no esgoto bruto / ppm		Erro % (Sensor / HPLC)
	Sensor	HPLC	
Araraquara	16,3 ($7,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	18,3 ($8,4 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	-10,9
Campinas	14,6 ($6,7 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	14,0 ($6,4 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	4,2
São Carlos	n.d.	n.d.	---

n.d. – não identificado

O fato de o método proposto ter detectado inicialmente quantidades pequenas de captopril no esgoto bruto de Campinas e Araraquara, e que foram posteriormente confirmados através do método oficial de análise, demonstra a validade do sensor na análise desse tipo de amostras. Adicionalmente, pode ser observado na Tabela 14, que no nível de concentração de captopril nessas amostras, os dois métodos apresentaram resultados próximos.

5. CONCLUSÕES

- 5.1 O sensor desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas no sistema em batelada e em fluxo.
- 5.2 Estudos eletroquímicos e características do sensor como sensibilidade, seletividade e afinidade pelo captopril, indicam fortemente que o complexo *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II), esteja se comportando como um catalisador biomimético da enzima P450 na oxidação do fármaco.
- 5.3 Com base nos resultados obtidos em batelada e em fluxo, conclui-se que a versatilidade e simplicidade apresentadas com o eletrodo de pasta de carbono modificada com *bis*(piridil)ftalocianinaferro (II) possibilita que este método se torne uma ferramenta real para análise de captopril em diversas matrizes, assim como uma alternativa mais econômica, quando comparada aos outros métodos analíticos já existentes. Pois, foi satisfatoriamente demonstrada a aplicação deste sensor na detecção, quantificação e monitoramento de captopril em diversos tipos de matrizes.
- 5.4. Nas medidas eletroquímicas no sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) foi possível destacar as vantagens desse método de análise como a alta frequência de amostragem, baixo consumo de reagentes e a facilidade de automação, mostrando que esse sistema é uma ferramenta bastante versátil em análises químicas.
- 5.5. Desta forma o sensor aqui desenvolvido se torna a ferramenta eletroanalítica mais promissora para determinação de captopril em diversas matrizes.

REFERÊNCIAS

- 1 BASILE, R. P.; BASILE, A. C. **Farmacologia**: conceitos básicos. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/269/farmacologia-conceitos-basicos>>. Acesso em: 11 maio 2010.
- 2 REZENDE, J. M. **Droga, fármaco, medicamento, remédio**. Disponível em: <<http://usuarios.cultura.com.br/jmrezende/droga.htm>>. Acesso em: 15 maio 2010.
- 3 DELUCIA, R.; OLIVEIRA FILHO, R. M.; GALLACCIM, M.; PLANETA, C. S.; AVELLAR, M. C. W. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinder, 2007. p. 4-6.
- 4 REIS FILHO, R. W.; BARREIRO, J. C. B.; VIEIRA, E. M.; CASS, Q. B. Fármacos, ETEs e corpos híbridos. **An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.
- 5 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- 6 BRAGA, B.; HESSPANHOL, I.; CONEJO, J. G.; BARROS, M. T. Introdução à engenharia ambiental. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 318 p.
- 7 MAGOSSO, L. R.; BONACELLA, P. H. **Poluição das águas**. 2. ed. São Paulo: Moderna. 2003, 72 p.
- 8 GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 678, 2006.
- 9 FERREIRA, T. L. **Estudos de sistemas micelares usando voltametria com microeletrodos**. 2008. 136 f. (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 10 TAMBOSI, J. L.; YAMANAKA, L.Y.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F. P. M.; SCHORODER, H. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 411-420, 2010.
- 11 CARDOSO, D. M. **Fármacos, água e poluição**. Disponível em: <http://www.vozdodao.net/index.php?option=com_content&view=article&id=1820:farmacos-agua-e-poluicao&catid=37:livre-opiniao&Itemid=79>. Acesso em: 16 maio 2010.

12 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências.

Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.sanelab.com.br/legislacao/CONAMA357.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2010.

13 PASSOS, V. M. A.; ASSIS, T. D.; BARRETO, S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 2006, v. 15, n. 1, p. 35-45, 2006.

14 GRUFFAT, X.; NOVELLO, D.; SUMI, A.; SÁ, M. M. **Hipertensão**. Disponível em: <<http://www.criasaude.com.br/N2068/doencas/hipertensao.html>> .Acesso em: 22 maio 2010.

15 BUSATO, O. **Hipertensão arterial**: introdução. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?244>>. Acesso em: 20 maio 2010.

16 PLICIENNIK, A. M. A. **Hipertensão arterial**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/cronicas/dcnt_hiper.htm>. Acesso em: 7 maio 2010.

17 SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 644-648.

18 BERTRAM, G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 149-150.

19 VANCEA, S.; IMRE, S.; DONÁH-NAGY, G.; BELA, T.; NYULAS, M.; MUNTEAN, T.; BORBA-BALÁB, R. Determination of free captopril in human plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 436-441, Apr. 2009.

20 WANG, L.; YANG, X-F.; ZHAO, M. A 4-Methylumbelliferone-based fluorescent probe for the sensitive detection of captopril. **Journal of Fluorescence**, v. 19, n. 4, p. 593-599, 2009.

21 ALNAJJAR, A. O. Simultaneous determination of captopril and indapamide in pharmaceuticals and human plasma. **Chromatographia**, v. 68, n. 5-6, p. 437-442, Sept. 2008.

22 NI, Y.; WANG, Y.; KOKOT, S. Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 432-441, Apr. 2009.

23 FAVARO, G.; FIORANI, M. Determination of pharmaceutical thiols by liquid chromatography with electrochemical detection: use of an electrode with a conductive carbon cement matrix, chemically modified with cobalt phthalocyanine. **Analytica Chimica Acta**, v. 332, n. 2-3, p. 249, Out. 1996.

24 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

25 BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica**: princípio, métodos e aplicações. Coimbra: Almedina, 1997. p. 5-6.

26 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. *Enzymeless biosensors*: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.

27 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L.T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors**. New York: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195-210.

28 SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2841-2887, Nov. 1996.

29 KALGUTKAR, A. S.; OBACH, R. S.; MAURER, T. S. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interaction and idiosyncratic adverse drug reactions. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 407-447, June 2007.

30 SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 175-178.

31 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L.T. Tris (2,2'-bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 7, p. 855-865, 2003.

32 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; SIGOLI, A.; LANZ, M. R. V.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L.T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrroline as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 734-743, Apr. 2008.

33 BATISTA, I. V.; LANZA, M. R. V.; DIAS, I. L. T.; TANAKA, S. C. N.; TANAKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Electrochemical sensor highly selective for estradiol valerate determination based on a modified carbon paste with iron tetrapyrroline. **Analyst**, v. 133, n. 12, p. 1692-1699, Oct. 2008.

34 OLIVEIRA, M. C. Q.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector. **Analytical Methods**, v. 2, n. 5, p. 507-512, Feb. 2010.

- 35 SOUZA, M. D. B. Chemically modified electrodes applied to electroanalysis: a brief presentation. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p.191-195, 1997.
- 36 USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, n. 5, p. 817-853, Jan. 2007.
- 37 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 787-976, 2002.
- 38 TIWARI, A.; ARYAL, S.; PILLA, S.; GONG, S. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p.1401-1407, Feb. 2006.
- 39 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- 40 SHAI DAROVA, L. G.; ZIGANSHINA, S. A.; MEDYANTSEVA, E. P.; BUDNIKOV, G. K. Amperometric cholinesterase biosensors with carbon paste electrodes modified with cobalt phthalocyanine. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 241-248, Nov. 2004.
- 41 SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 820-825, 2009.
- 42 LI, Z.; JUN-FENG, S. Electrocatalytic oxidation of methanol and other short chain aliphatic alcohols at Ni(II)-quercetin complex modified multi-wall carbon nanotube paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, n. 1, p. 43-50, 2010.
- 43 GANJALI, M. R.; MOTAKEF-KAZEMI, N.; NOROUZI, P.; KHOEE, E. A modified Ho^{3+} carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes (mwcnts) and nanosilica. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, n. 7, p. 906-913, July 2009.
- 44 GLIGORA, D.; MAICANEANUB, A. Iron-enriched natural zeolite modified carbon paste electrode for H_2O_2 detection. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 12, p. 4050-4056, Feb. 2010.
- 45 GJALI, M. R.; MOTAKEF-KAZAMI, N.; FARIDBOD, F.; KHOEE, S.; NOROUZI, P. Determination of Pb^{2+} ions by a modified carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and nanosilica. **Journal of Hazardous Materials**, v. 173, n. 1-3, p. 415-419, Jan. 2010.

- 46 RAOOF, J. B.; OJANI, R.; KARIMI-MALEH, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1169-1175, Aug. 2009.
- 47 ONGERA, G.; SWAMY, B. E. K.; CHANDRA, U.; SHERIGARA, B. S. Simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using polyglycine modified carbon paste electrode: a cyclic voltammetric study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 636, n. 1-2, p. 80-85, Nov. 2009.
- 48 ALIZADEHA, T.; GANJALIB, M. R.; ZAREB, M.; NOROUZIB, P. Development of a voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer (MIP) for caffeine measurement. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 5, p. 1568-1574, 2009.
- 49 KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A. R. Fast and sensitive determination of captopril by voltammetric method using ferrocenedicarboxylic acid modified carbon paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, n.1, p. 9-15, 2010.
- 50 OZOEMENA, K. I.; STEFAN VAN STANDEN, R. I.; NYOKONG, T. Metallophthalocyanine based carbon paste electrodes for the determination of 2',3'-dideoxyinosine. **Electroanalysis**, v. 21, n. 1-4, p. 1651-1654, Mar. 2009.
- 51 YAGHOUBIAN, H.; KARIMI-MALEH, H.; KHALILZDEH, M. A.; KARIMI, F. Electrocatalytic oxidation of levodopa at a ferrocene modified carbon nanotube paste electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, n. 7, p. 993-1003, July 2009.
- 52 PORTACCIO, M.; DI TUOROA, D.; ARDUINI, F.; LEPORE, M.; MITA, D. G.; DIANO, N.; MITA, L.; MOSCONE, D. A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol a determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 9, p. 2003-2008, Jan. 2010.
- 53 MAZLOUM-ARDAKANIA, M.; TALEATA, Z.; BEITOLLAHIA, H.; NAEIMIB, H. Selective determination of cysteine in the presence of tryptophan by carbon paste electrode modified with quinizarine. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 251-259, Mar. 2010.
- 54 MARCOLINO JUNIOR, L. H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Química)-Departamento de Química Analítica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- 55 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. New York: John Wiley, 1988. v. 17, p. 69-73.
- 56 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Saunders College, 1997. p. 30-31.

57 EUROPEAN pharmacopéia. 3rd. ed. Strasbourg: Concil of Europe, 1997. p. 535-536.

58 BRITISH pharmacopoeia. 3rd ed. London: Stationary Office, 2001. p. 295.

59 REZAEI, B.; DAMIRI, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate(II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. **Sensors and Actuators B**, v. 134, n. 1, p. 324-331, Aug. 2008.

60 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 163-168, July 1978.

61 BARD, A. J.; FAULKNER, R. D. **Electrochemical methods-fundamental and applications**. 2nd ed. Wiley: NewYork, 2001, 833 p.

62 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Saunders College, 1997. p. 25-29.

63 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 157

64 BERGMEYER, H. U.; BERGMEYER, J.; GRABL, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd ed. Weinheim: Chemie, 1983. v. 1, p. 86.

ANEXOS

Anexo 1 - ARTIGO

Development and Application of a Highly Selective Biomimetic Sensor for Detection of Captopril, an Important Ally in Hypertension Control

Ademar Wong¹, Marcos R.V. Lanza² and Maria D.P.T. Sotomayor^{*,1}

¹Departamento de Química Analítica – IQ - Universidade Estadual Paulista, 14801-970 Araraquara-SP, Brazil

²Departamento de Química e Física Molecular – IQSC - Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil

Abstract: A biomimetic sensor is proposed as a promising new analytical method for determination of captopril in different classes of samples. The sensor was prepared by modifying a carbon paste electrode with iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) [FePc(dipy)] complex. Amperometric measurements in a batch analytical mode were first carried out in order to optimize the sensor response. An applied potential lower than 0.2 V vs Ag|AgCl in 0.1 mol L⁻¹ of TRIS buffer at pH 8.0 provided the best response, with a linear range of 2.5 × 10⁻⁵ to 1.7 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. A detailed investigation of the selectivity of the sensor, employing seventeen other drugs, was also performed. Recovery studies were carried out using biological and environment samples in order to evaluate the sensor's potential for use with these sample classes. Finally, the performance of the biomimetic sensor was optimized in a flow injection (FIA) system using a wall jet electrochemical cell. Under optimized flow conditions, a broad linear response range, from 5.0 × 10⁻⁴ to 2.5 × 10⁻² mol L⁻¹, was obtained for captopril, with a sensitivity of 210 ± 1 μA L mol⁻¹.

Keywords: Iron phthalocyanine, biomimetic sensor, captopril, FIA analysis.

INTRODUCTION

Effluents generated from pharmaceutical industries and sewage treatment plants are the main sources of environmental contamination by drugs. The literature reports that even after sewage treatment, drugs are still often found in natural waters such as rivers and lagoons. These waters could eventually be used for human consumption, and therefore cause health problems [1].

Fast, sensitive and selective techniques for *in situ* monitoring of pharmaceuticals include electrochemical sensors, amongst which are biomimetic sensors. These can be defined as a subtype of enzymatic biosensors, in which electrodes are modified with redox compounds possessing analogous structures to the active sites of enzymes used as models.

Biomimetic sensors are a result of attempts to produce chemical sensors that are more stable and durable than conventional biosensors based on the use of biological materials such as enzymes or antibodies. These devices aim to overcome limitations of conventional enzymatic biosensors, such as availability, cost and enzyme instability, as well as to improve electronic transfer between electrode / active site (biomimetic catalyst / substrate), since in biomimetic sensors the "active site" is free, in contrast to enzymes, where the active site is surrounded by a dense layer of residual amino-acids [2, 3]. One of the conditions for selection of an enzyme for the construction of biomimetic sensors is that the chemistry of the enzymatic reaction catalysis and the structure of its active site should be very well known, and from this perspective the P450 enzymes are highly suitable [3].

Currently approximately 450 different P450 enzymes are known, which catalyze diverse types of chemical reactions in organisms, producing metabolites that are physiologically essential or beneficial to them [4]. Amongst these reactions, the degradation of xenobiotics, such as drugs, pesticides and endocrine disruptors, is possible through hydroxylation, oxidation or reduction reactions [5].

All P450 enzymes contain a common active site, protoporphyrin IX (Chart 1a), which is an iron porphyrin (protohemin IX) complex, and the selectivity of each P450 is a consequence of the chemical environment surrounding the hemin group in the enzyme. Thus, compounds derived from phthalocyanines and porphyrin of iron and other metallic ions, such as manganese or cobalt, have been satisfactorily used in solution as biomimetic active sites of different P450 enzymes, however only few reports have described their application in the construction of biomimetic chemical sensors for analytical use [6, 7]. Amongst the complexes that could be possible P450 biomimetic catalysts is the iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) complex (Chart 1b), due to its similarity with protohemin IX.

The use of amperometric sensors based on modified carbon pastes has increased exponentially during the last 40 years (Fig. 1), and continues to be attractive because of its applicability to a diverse range of sample types, as well as flexibility in the method of paste preparation, which can range from the conventional mixture of graphite powder with a selective modifier (enzyme or catalyst), to more complex preparations used for molecularly imprinted polymers (MIP) [8] and carbon nanotubes [9]. Electrochemical sensors constructed using modified carbon pastes have been demonstrated to have high chemical stability and high electrocatalytic activity. Some recent applications reported in the literature are provided in Table 1 [10-17].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Química Analítica – IQ - Universidade Estadual Paulista, 14801-970 Araraquara-SP, Brazil; Tel: +55-1633016620; E-mail: mpilar@iq.unesp.br

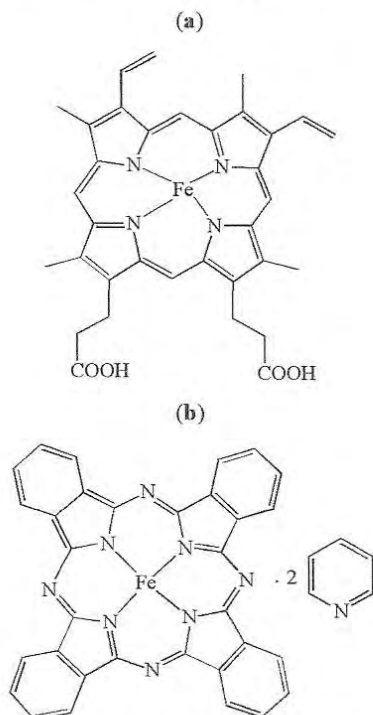


Chart 1. Chemical structures of (a) protoporphyrin IX, the active site common to the P450 enzymes, and (b) the iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) [FePc(dipy)] complex.

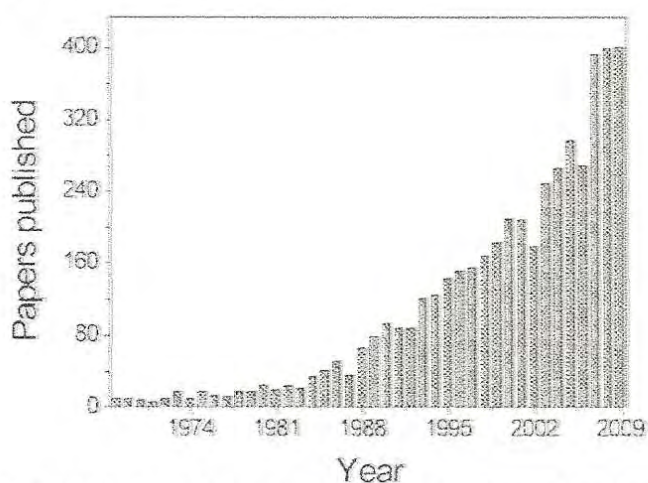


Fig. (1). Number of papers published concerning sensors based on modified carbon paste electrodes; data obtained from SciFinder Scholar (2007 version).

Increased levels of stress, associated with modern living, has increased the incidence of diseases such as hypertension and ulcers, and has therefore increased the consumption of drugs designed to combat these problems, resulting in a new source of environmental contamination.

Captopril (Chart 2) is a crystalline, white or slightly yellowish powder, with a characteristic smell of sulfur, available commercially under various pseudonyms and at different dosages. The compound is soluble in water, ethanol, chloroform, methanol and in alkaline solutions. It is an antihypertensive classified as an inhibitor of the

angiotensin-converting enzyme, and is indicated for patients with congestive cardiac hypertension, myocardial infarction and diabetic nephropathy [18]. Captopril is rapidly absorbed, has a bioavailability of about 65 % and is eliminated in urine (between 40 and 50% in its original form, with the remaining amount as disulfide dimers of captopril-cysteine).

Table 1. Some Articles Published in 2009/2010 Describing the Use of Sensors Based on Carbon Paste Electrodes for Determination of Analytes of Pharmaceutical and Environmental Interest

Modifier	Target Compound
Phenothiazine derivative adsorbed on zeolite and on mineral clay	NADH [10]
Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and nanosilica	Pb ²⁺ ions [11]
2,7-bis-(ferrocenyl-ethyl) fluoren-9-one	Glutathione [12]
Polyglycine	Dopamine and Ascorbic acid [13]
Molecularly imprinted polymer	<i>p</i> -nitrophenol [14]
Ferrocenedicarboxylic acid	Captopril [15]
Metallophthalocyanine	2,3-Dideoxinosine [16]
Ferrocene-modified carbon nanotube	Levodopa [17]

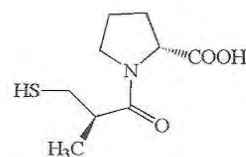


Chart 2. Chemical structure of the captopril molecule.

Various methods for the quantification of captopril in diverse materials can be found in the literature, including spectrophotometric, fluorimetric, chemiluminescent and chromatographic techniques [19-21].

This work describes the construction, application and coupling in a flow injection analysis (FIA) system of an amperometric sensor based on a carbon paste electrode modified with the iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) complex, which has been identified as a potential biomimetic catalyst of the P450 enzyme in the sensitive and selective quantification of captopril in a variety of matrices.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Solutions

All chemicals used were of analytical or HPLC grade. Iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) [FePc(dipy)], captopril, mineral oil and graphite powder were acquired from Sigma-Aldrich. KH₂PO₄ and NaOH were obtained from Synth-Brazil. TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane], HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid] and PIPES [salt of sodium 1,4-piperazinediethanesulfonate] buffers were provided by Merck. Methanol and phosphoric acid were purchased from Ecibra-Brazil.

Captopril and buffer solutions were prepared using water purified in a Milli-Q (Direct-0.3) system, and pH was determined using a Thermo Scientific® pH meter (Orion 3 Star, Benchtop) fitted with a combination pH electrode.

Sensor Construction

The modified paste was prepared by mixing 30 mg of [FePc(dipy)] with 100 mg of graphite powder and 1.0 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0), in order to obtain an homogeneous material. After drying at room temperature, mineral oil was added, with mixing to obtain an homogeneous paste. The paste was then placed into the cavity of a glass tube (4 mm internal diameter, 1 mm depth), with a platinum slide inserted for electrical contact with the paste. The influence on the sensor response of the amount of FePc(dipy) used in paste preparation was evaluated with four different pastes, prepared with weight percentages of FePc(dipy) varying from 13 % to 37.5 %. Additionally, for comparative purposes, an unmodified paste was prepared by mixing 100 mg of graphite powder with 1.0 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0).

Electrochemical Measurements and Flow Manifold

The batch electrochemical experiments were conducted at room temperature in a conventional three-electrode cell, with the modified carbon paste electrode used as the working electrode and an Ag|AgCl(KCl_{sat}) electrode and a platinum wire as the reference and counter electrodes, respectively. Data acquisition was performed with a PalmSense potentiostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a microcomputer for potential control and

data acquisition. The amperometric measurements were carried out using previously optimized 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer at pH 8.0 and potential of 175 mV vs Ag|AgCl, with continuous recording of the current until a steady state was reached (after approximately 3s). At this point recording was interrupted in order to add aliquots (μL) of captopril standard (or sample) solution to the electrolyte, with stirring of the solution for 10 seconds for complete homogenization. The current was then again monitored in the quiescent solution for 10s, during which time a new steady state was achieved. The analytical curve was obtained by successive additions of captopril standard solutions.

For coupling to a flow system, the biomimetic sensor was inserted into a flow-through wall-jet amperometric cell, and used as the working electrode (Fig. 1). A home-made Ag|AgCl(KCl_{sat}) electrode was used as the reference, and a platinum wire as the auxiliary electrode. The electrodes were connected to the PalmSense potentiostat. The flow rate of the 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer carrier solution was maintained using an Ismatec® peristaltic pump. The standards and samples containing captopril were injected into the carrier using a sliding central bar sampling valve [22].

HPLC Analyses

Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu® Model 20A liquid chromatograph coupled to an SPD-20A UV/Vis detector, an SIL-20A autosampler and a DGU-20A₅ degasser, controlled by a microcomputer. A C18 column (250 x 4.6 mm, Shim-Pack CLC-ODS) was used, positioned inside a Shimadzu® CTO-10AS oven to maintain a constant temperature.

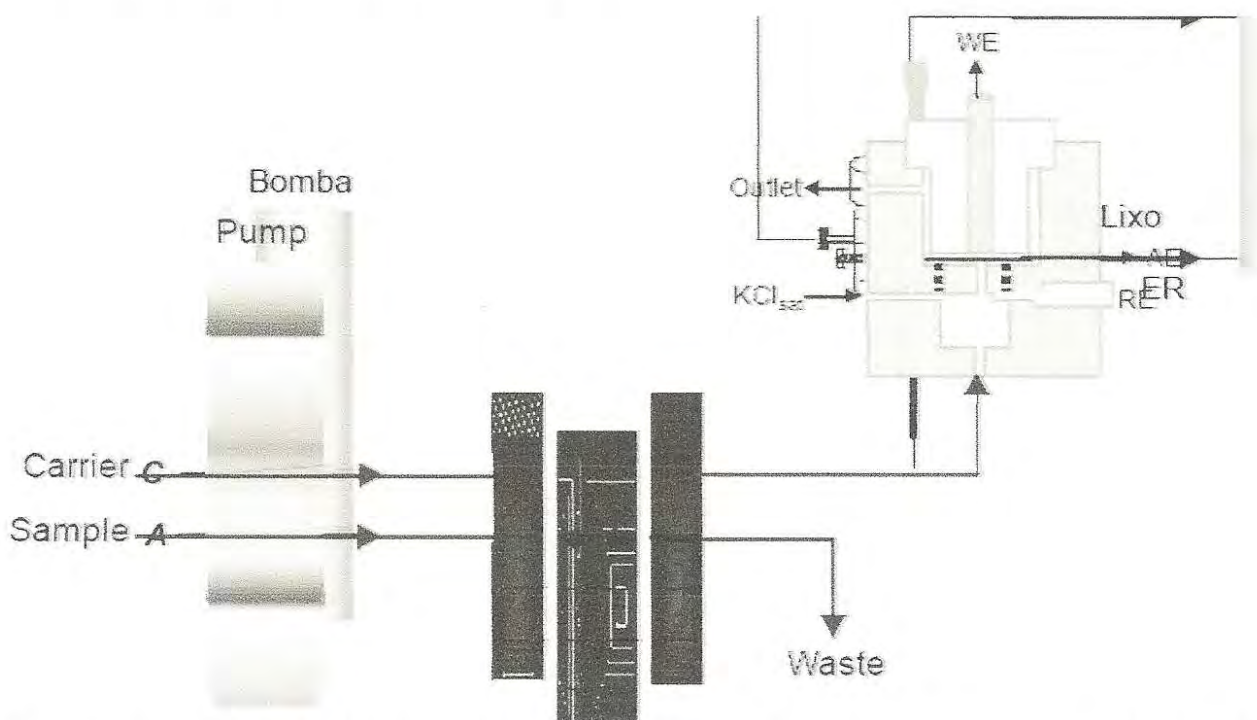


Fig. (2). Schematic diagram of the flow injection system for amperometric determination of captopril. L: sample loop (75 μL); WE: working electrode (biomimetic sensor); AE: auxiliary electrode (platinum); RE: home-made reference electrode (Ag|AgCl(KCl_{sat})).

The official analytical procedure for captopril quantification [23] was followed, using a mobile phase composed of a mixture of 550 mL methanol, 450 mL water and 0.5 mL concentrated phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹ and the sample injection volume was 20 µL. The column temperature was maintained at 25°C. The measurement wavelength was 220 nm and the analysis time was 5.5 minutes for each standard and sample.

Pharmaceutical Formulation Analysis

Quantification of captopril in six commercial formulations was carried out according to the multiple standard additions method, using the proposed sensor in batch mode. To prepare each sample solution, ten tablets were ground and homogenized in a mortar, then a suitable amount of triturated sample was weighed out and dissolved in deionized water, followed by a filtration step in order to remove any insoluble substances present in the tablets.

Biological Sample Analysis

Urine samples were collected from six volunteers. Samples V1 to V5 were from healthy people aged between 20 and 40 years. Sample V6 was from a volunteer who consumed two doses of captopril daily, for control of arterial pressure. Each sample was enriched with 2.5 × 10⁻³ mol L⁻¹ of captopril, directly added to the batch electrochemical cell, in order to calculate recovery values. No sample pretreatment was used.

Aquatic Sample Analyses

Four water samples collected from rivers near the city of Araraquara (298 km from São Paulo, Brazil) were enriched with 2.5 × 10⁻³ mol L⁻¹ of captopril and analyzed using the proposed sensor in batch mode, in order to calculate recoveries.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical Characterization of the Sensor Response

The voltammetric behavior of captopril on a carbon paste electrode, either unmodified or modified with FePc(dipy), is illustrated in Fig. (3). It can be seen that the response of the electrode based on unmodified paste showed practically no difference after captopril addition (Fig. 3a). Using the sensor based on carbon paste modified with the iron (II) complex (Fig. 3b), in the absence of the analyte two peaks were obtained, at 0.050 V and 0.175 V vs Ag|AgCl, which were related to the Fe²⁺ in the complex and its corresponding redox couple, the ferric ion (Fe³⁺). After addition of captopril, an increase of the anodic current only occurred at 0.175 V vs Ag|AgCl, suggesting the presence of an electrocatalytic process. In addition, the reverse peak observed in the presence of captopril corresponds to the ferrous ion in the paste plus oxygen dissolved in the buffer, since all measurements were carried out in air-saturated solutions.

It is known that a catalytic system behaves as an electrochemical system controlled by diffusion [24]. To confirm this, the process of oxidation of captopril on the

sensor surface was evaluated at different scan rates. From the results obtained (Fig. 4) a linear dependence could be observed between the anodic current and the square root of the scan rate, in the potential range between 10 and 400 mV s⁻¹, indicating that the oxidation of captopril on the surface of the sensor was controlled by a diffusion process.

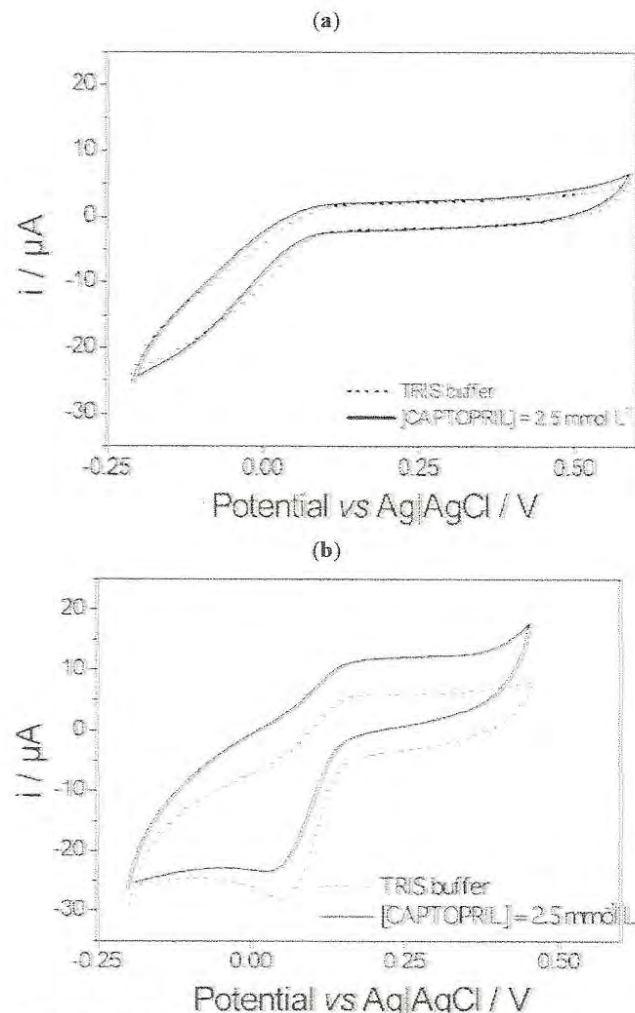


Fig. (3). Voltammetric profiles in aerobic conditions for (a) unmodified and (b) FePc(dipy)-modified carbon paste electrodes, in the presence (solid line) or absence (dotted line) of captopril. Potential scan rate: 20 mV s⁻¹.

Additionally, when the scan rate-normalized current ($\Delta i v^{-1/2}$) was plotted vs v (Fig. 5), the profile obtained suggested that captopril oxidation occurred via an electrocatalytic mechanism [25] characterized by a chemical step coupled with an electrochemical process.

When the response profile was investigated beyond the linear range of the sensor, the curve presented a hyperbolic shape (inset in Fig. 6), which is characteristic of enzymatic biosensors and biomimetic sensors that follow Michaelis-Menten kinetics [3, 26]. A Lineweaver-Burk graph (Fig. 6) was constructed in order to calculate the apparent Michaelis-Menten constant (K_{MM}^{app}) for captopril on the proposed sensor. A value of 4.8 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ was obtained, which is in line with values expected for enzymatic and biomimetic

catalysts [3], and also indicative of a high affinity between the catalyst (iron complex) and the analyte.

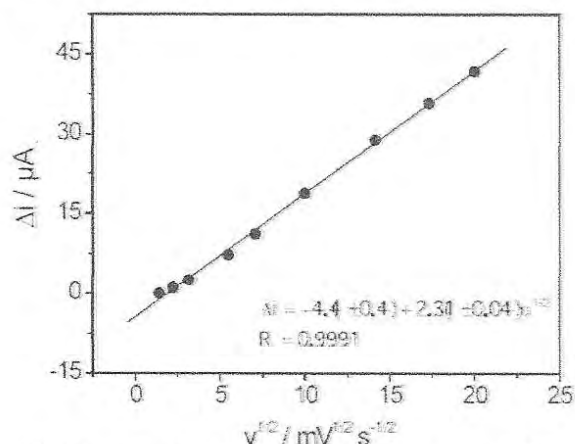


Fig. (4). Linear profile of the variation of the current (Δi) as a function of the square root of the scan rate ($v^{1/2}$).

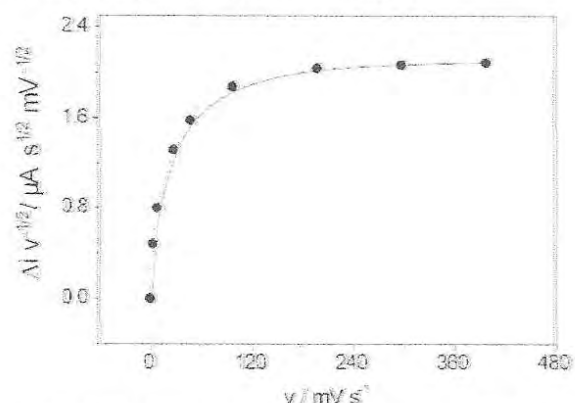


Fig. (5). Plot of the current variation (Δi), normalized by the square root of the scan rate ($v^{1/2}$), as a function of the scan rate (v). Measurements carried out in 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer (pH 8.0) containing 24.5 μmol L⁻¹ of captopril.

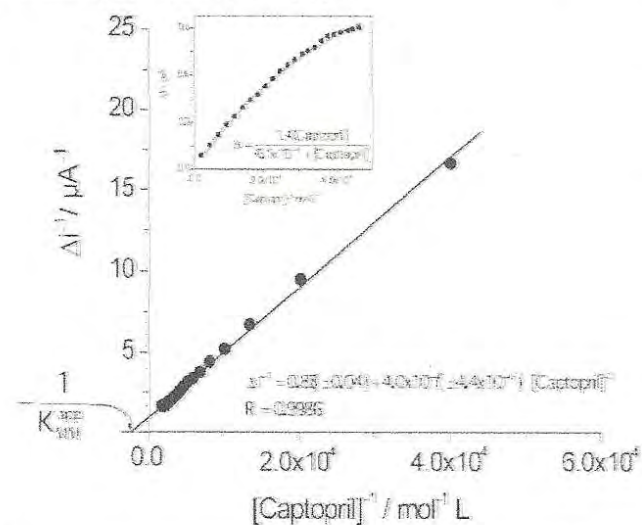


Fig. (6). Lineweaver-Burk plot for the catalyzed oxidation of captopril on the FePc(dipy)-based sensor. Inset: the hyperbolic response presented by the biomimetic sensor.

The above results confirm that the sensor constructed using the FePc(dipy) complex in a modified carbon paste is biomimetic.

Optimization of the Sensor Response

The amperometric technique was used for optimization of sensor sensitivity and stability, with evaluation of parameters including the nature, pH and concentration of the electrolyte solution, the applied potential and the amount of iron complex in the carbon paste. The results obtained are provided in Table 2. The sensor prepared with a carbon paste containing 23 % (w/w) of iron complex showed the best performance in batch mode using a 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer solution at pH 8.0 and applied potential of 0.175 V vs Ag|AgCl.

Sensor Analytical Characteristics

The amperometric profile of the biomimetic sensor under optimized conditions is shown in the inset of Fig. (7). The linear response for captopril detection was from 25 to 165 μmol L⁻¹, with a sensitivity of 2315 ± 61 μA L mol⁻¹, and limits of detection and quantification were 1.4 × 10⁻⁸ mol L⁻¹ and 3.4 × 10⁻⁸ mol L⁻¹, respectively, calculated as recommended by IUPAC [27]. A linear correlation coefficient of 0.9983 was obtained, and the data in Fig. (7) could be described by:

$$\Delta i (\mu A) = 0.08 (\pm 0.01) + 2315 (\pm 61) [\text{Captopril}] (\text{mol L}^{-1}) \quad (1)$$

Sensor Selectivity

Adequate selectivity is a vital characteristic of sensors and biosensors, so this parameter was investigated in detail for the FePc(dipy)-based sensor. In addition to captopril, the response of the sensor was tested using seventeen solutions containing the compounds acetaminophen, amitriptyline, clindamycin, diclofenac, digoxin, dipyrone, ephedrine hydrochloride, fluconazole, lidocaine, mebendazole, metronidazole, neomycin sulfate, pyridoxine, quinine hydrochloride, ranitidine, secnidazole and tetracycline. The cyclic voltammetry results obtained showed that the biomimetic sensor did not present a signal for any of these compounds. These results clearly show that the proposed sensor, in addition to being highly sensitive, is also highly selective, as expected for a device designed to mimic an enzymatic biosensor.

Sensor Application

Application of the proposed sensor was tested in batch mode for three different types of real sample. The first application was in analysis of the six commercial pharmaceutical formulations, the second was in analysis of the six urine samples, and the last application was in the analysis of water samples obtained from four rivers near Araraquara city. In the two last cases, samples were enriched with captopril in order to demonstrate the applicability of the proposed sensor to biological and environmental media.

The results obtained using the sensor for captopril quantification in the pharmaceutical formulations were compared with those obtained using the official

Table 2. Parameters Evaluated in the Optimization of the Biomimetic Sensor for Captopril Determination

Parameter	Value					
	13	23*	30	37.5	---	---
Amount of the complex in the paste (% w/w)	13	23*	30	37.5	---	---
Buffer (electrolyte)	Acetate	Phosphate	HEPES	PIPES	TRIS*	---
[TRIS] (mol L ⁻¹)	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1*	0.15
Buffer pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0*	8.5
Applied potential (mV vs Ag AgCl)	100	125	150	175*	200	250

*Optimized value.

chromatographic method [23]. Table 3 shows that the two methods were not significantly different at a confidence level of 95 %, suggesting that the proposed methodology is an efficient and rapid alternative for determination of captopril in pharmaceutical preparations.

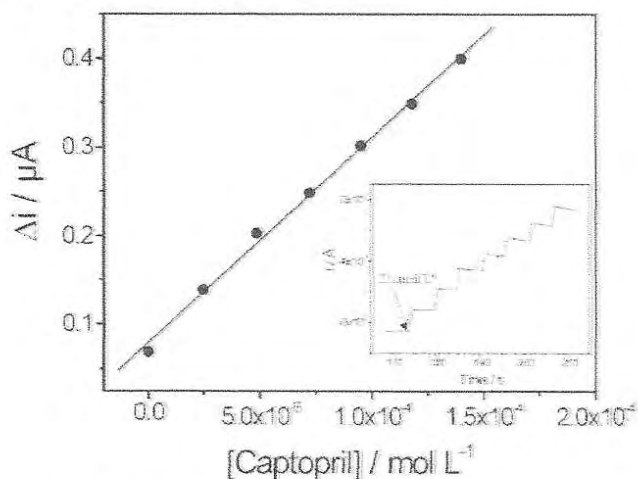


Fig. (7). Typical analytical curve profile in batch mode of the FePc(dipy) sensor for determination of captopril under optimized conditions. Inset: chronoamperometric measurement for successive additions of 25 μmol L⁻¹ of the analyte.

The recovery values obtained for the six urine samples are shown in Table 4. These were in the expected range for samples V1 to V4, while the high value for sample V6 was due to the volunteer's twice daily use of captopril. The high

value for sample V5 could be due to the presence of thiol compounds in the urine [17], probably because the samples were not collected after periods of fasting.

The acceptable recovery values (Table 5) for the river water samples enriched with 2.5×10^{-3} mol L⁻¹ of captopril demonstrate that the sensor can be successfully used for the direct analysis of surface waters.

Sensor Application as a Sensitive and Selective Amperometric Detector in FIA Systems

Flow injection analytical techniques have been increasingly used in quality control and in the control of industrial processes, due to inherent advantages over the batch mode including improved precision, easier sample manipulation, economical use of reagents and reduced costs.

Since a home-made Ag|AgCl(KCl_{sat}) reference electrode was used in the wall jet cell, optimization of the applied potential was necessary under flow conditions (Fig. 8). Maximum response of the system was obtained at an applied potential of 100 mV, thus this potential was selected in further experiments. Although in the batch system the highest sensitivity was obtained at 175 mV versus a commercial Ag|AgCl(KCl_{sat}) electrode (Table 2), under flow conditions a deviation of -75 mV was observed.

The influence of injected sample volume (V_i) on the biomimetic sensor response was also studied. The signal magnitude (Fig. 9a) increased with increasing V_i , probably due to a longer sample contact time with the catalytic zone of the FePc(dipy)-modified carbon paste electrode. A V_i of 75

Table 3. Determination of Captopril in Pharmaceutical Formulations Using the Proposed Sensor in Batch Mode and the Official Chromatographic Method

Sample (Lab, Lot, Validity)	Captopril Amount Per Tablet (mg)			Error (%)
	Declared Value	Official Method (HPLC)	Proposed Sensor	
Captopril (Medley®, L08090130, 06/10)	12.5	11.9	11.9	0.0
Captopril (Medley®, L08101209, 10/10)	25	23.8	24.8	+ 4.0
Capoten® (Bristol-Myers Squibb®, L8k0663, 04/10).	25	25.0	24.5	- 2.0
Captopril (Medley®, L09030185, 02/11)	50	47.5	48.0	+ 1.1
Captopril plus 25 mg of hydrochlorothiazide (Medley®, L08050794, 05/10)	50	50.0	48.0	- 4.0
Lopril® plus 25 mg of hydrochlorothiazide (Bristol-Myers Squibb®, L6M0257, 11/09)	50	42.5	43.0	+ 1.1

Table 4. Recovery Values for Urine Samples from Six Volunteer Donors, One of Whom (V6) was a Daily User of Captopril. Each Sample was Enriched with 2.5 mmol L⁻¹ of Captopril

Volunteer Sample	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Recovery value (%)	94	98	105	107	151	220

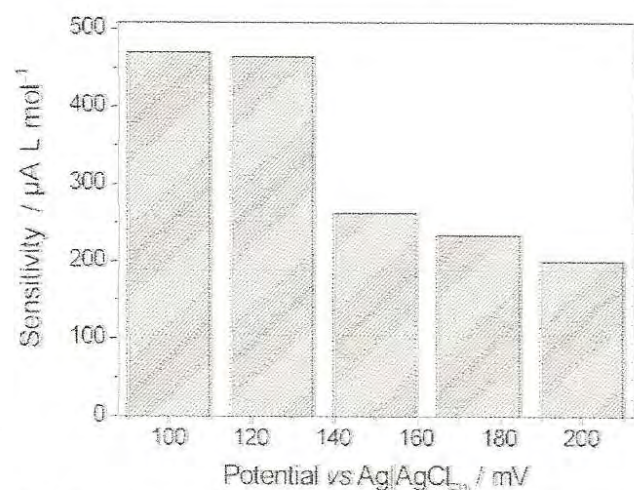


Fig. (8). Influence of applied potential on sensor response in the FIA system. Carrier solution: 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer solution at pH 8.0; V_i : 75 μ L; flow rate: 1.4 mL min⁻¹.

μ L was selected due to better repeatability, as evaluated from the standard deviation of three replicates, without any adverse influence on analysis frequency.

The flow rate dependence of the signal response of the FePc(dipy)-modified carbon paste electrode was also investigated, and a decrease in the signal was observed at higher flow rates (Fig. 9b). Since mass transfer increases with increasing flow rate, this decrease was due to limitations of the catalytic reaction [28], with a smaller fraction of the captopril being oxidized during transit through the electrode. At slower flow rates, the response increased as a consequence of the longer contact time between the sample and the catalyst/electrode. An optimum flow rate of 1.4 mL min⁻¹ was selected.

Fig. (10) shows the FIA signal as a function of captopril concentration, after optimization of the system. There were no sensor memory effects, as confirmed by the Fig. (10) inset, where the straight lines obtained for the data obtained during increasing (Equation 2) and decreasing (Equation 2)

concentrations show practically the same sensitivities in the range from 5.0×10^{-4} mol L⁻¹ to 2.5×10^{-2} mol L⁻¹, described by the following equations:

$$\Delta i(\mu A) = 0.15(\pm 0.02) + 210(\pm 1)[\text{Captopril}](\text{mol L}^{-1}) \quad (2)$$

with a correlation coefficient of 0.9999 for $n = 9$;

$$\Delta i(\mu A) = 0.22(\pm 0.03) + 207(\pm 1)[\text{Captopril}](\text{mol L}^{-1}) \quad (3)$$

with a correlation coefficient of 0.9998 for $n = 9$.

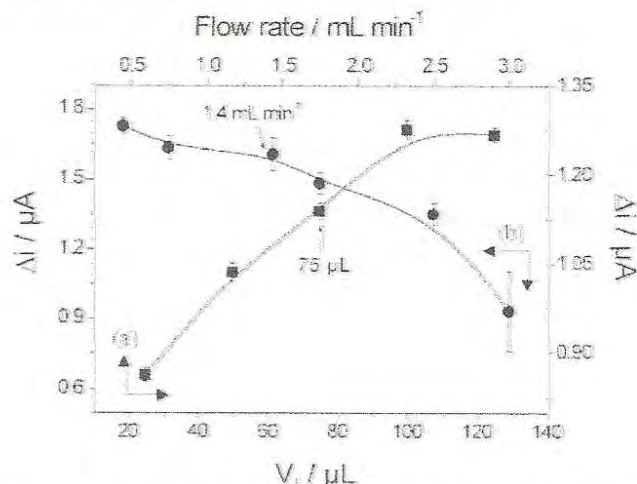


Fig. (9). Influence of different parameters in the proposed FIA system. (a) Effect of injected sample volume (V_i) on the response to captopril, using a flow rate of 1.4 mL min⁻¹. (b) Effect of flow rate on the response to captopril, using a V_i of 75 μ L. The experiments were carried out with 0.1 mol L⁻¹ TRIS buffer at pH 8.0 as carrier, applying a potential of 100 mV vs Ag/AgCl(KCl_{sat}). The error bars correspond to the standard deviation of three replicates.

Detection and quantification limits were determined from the standard deviation of ten independent measurements of the blank, calculated according to IUPAC recommendations [27], and were 8.0×10^{-7} mol L⁻¹ and 2.5×10^{-6} mol L⁻¹, respectively.

The repeatability of the sensor was investigated using injections of 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ captopril solution, for which a relative standard deviation (RSD) of 3.5 % ($n = 7$) was obtained. Under the conditions employed, the biosensor could be operated with an analytical frequency of 70 injections h⁻¹.

Finally, Fig. (11) shows the operational stability of the sensor under flow conditions. This parameter was investigated using eight consecutive injections of 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ of captopril standard solution, every hour over a

Table 5. Recovery Values for Captopril in River Water, Using the Proposed Sensor in Batch Mode

River	Captopril (mmol L ⁻¹)		Recovery (%)
	Added	Found	
Jacaré Pepira	2.50	2.25	90
Tietê river at the outskirts of Igarapu town	2.50	2.53	101
Tietê river under the bridge at Barra Bonita town	2.50	2.45	98
Tietê river at the Usina da Barra club	2.50	2.10	84

period of 8 hours per day during 5 days, totalling 64 injections per day or 320 injections over the 5 days of the evaluation. During this time, the sensor response decreased by 20 %, relative to the initial signal. This should not present any difficulty, since calibration of the sensor should always be performed prior to its use.

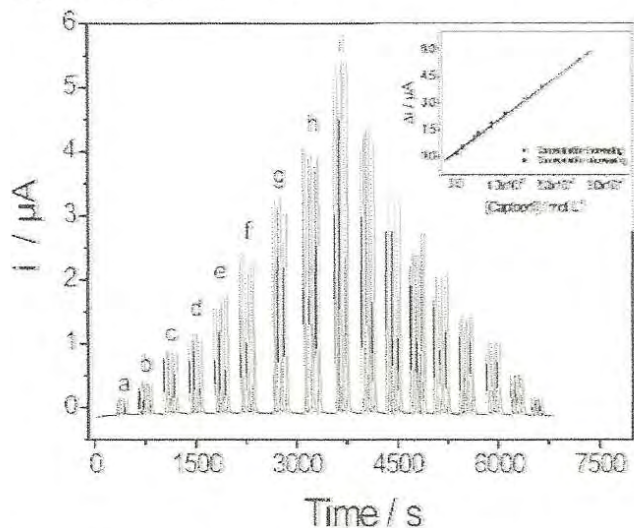


Fig. (10). FIA signals obtained for different captopril concentrations, using a biomimetic sensor under flow conditions. [Captopril]: *a* = 5.0×10^{-4} mol L⁻¹; *b* = 1.8×10^{-3} mol L⁻¹; *c* = 3.8×10^{-3} mol L⁻¹; *d* = 5.0×10^{-3} mol L⁻¹; *e* = 7.5×10^{-3} mol L⁻¹; *f* = 1.0×10^{-2} mol L⁻¹; *g* = 1.4×10^{-2} mol L⁻¹; *h* = 1.8×10^{-2} mol L⁻¹; *i* = 2.5×10^{-2} mol L⁻¹. Inset: Typical analytical curves for decreasing and increasing captopril concentrations.

Table 6 provides the analytical parameters for quantification of captopril using the FIA system developed here. All characteristics support the viability of this biomimetic sensor for determination of captopril in different samples using FIA systems, with good performance achieved for analysis of diverse materials including pharmaceutical formulations as well as environmental and biological samples.

Table 6. Analytical Parameters of the FIA System Employed for Captopril Determination Using the Biomimetic Sensor Based on the [FePc(dipy)] Catalyst

Parameter	Value
Applied potential vs Ag/AgCl(KCl _{sat})	0.1 V
Flow rate (mL min ⁻¹)	1.4
V _i (μL)	75
Linear range (mol L ⁻¹)	5.0×10^{-4} – 2.5×10^{-2}
Sensitivity (μA L μmol ⁻¹)	210 ± 1
Quantification limit (μmol L ⁻¹)	2.5
Detection limit (μmol L ⁻¹)	0.8
Measurement repeatability (RSD, n = 7)	3.5 %
Operational stability	320 measurements or 5 days (80 % of the initial signal retained)
Analytical frequency	70 samples h ⁻¹

CONCLUSIONS

This work describes a pragmatic alternative methodology for the determination of captopril, using a sensitive and selective amperometric sensor based on a carbon paste modified with FePc(dipy). The results obtained suggest that the iron (II) phthalocyanine bis(pyridine) complex could be considered a biomimetic catalyst. The sensor was satisfactorily applied in analyses of drug tablets, urine and river water samples, opening up possibilities for captopril quantification in quality control situations, as well as in biological and aquatic samples, using either batch or FIA systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from FAPESP (Proc. 2008/00303-5). AW is also indebted to FAPESP (Proc. 2008/08035-0) for a fellowship.

REFERENCES

- [1] Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barceló, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *D. Trends Anal. Chem.*, **2003**, *22*(10), 685-696.
- [2] Sotomayor, M.P.; Kubota, L.T. Enzymeless Biosensors: Uma Nova Área para o Desenvolvimento de Sensores Amperométricos. *Quim. Nova*, **2002**, *25*(1), 123.
- [3] Sotomayor, M.P.; Tanaka, A.A.; Freire, R.S.; Kubota, L.T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, **2006**, vol. 1, 195-210.
- [4] Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter, E.D.; Dawson, J.H. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*(7), 2841-2888.
- [5] Kalgutkar, A.S.; Obach, R.S.; Maurer, T.S. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions. *Curr. Drug Metab.*, **2007**, *8*(5), 407-47.
- [6] Sotomayor, M.D.P.T.; Sigoli, A.; Lanza, M.R.V.; Tanaka, A.A.; Kubota, L.T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrroline porphyrin as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2008**, *19*(4), 762-768.
- [7] Santos, W.J.R.; Sousa, A.L.; Sotomayor, M.D.P.T.; Damos, F.S.; Tanaka, S.M.C.N.; Kubota, L.T.; Tanaka, A.A. Manganese phthalocyanine as a biomimetic electrocatalyst for phenols in the development of an amperometric sensor. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, *20*(6), 1180-1187.
- [8] 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. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *389*(6), 1919-1929.
- [9] Li, Z.; Jun-Feng, S. Electrocatalytic oxidation of methanol and other short chain aliphatic alcohols at Ni(II)-quercetin complex modified multi-wall carbon nanotube paste electrode. *J. Solid State Electrochem.*, **2010**, *14*(1), 43-50.
- [10] Gligor, D.; Balaj, F.; Maicananu, A.; Gropeanu, R.; Grosu, I.; Muresan, L.; Popescu, I.C. Carbon paste electrodes modified with a new phenothiazine derivative adsorbed on zeolite and on mineral clay for NADH oxidation. *Mater. Chem. Phys.*, **2009**, *113*(1), 283.
- [11] Reza, G.M.; Motakef-Kazami, N.; Faridbod, F.; Khoei, S.; Norouzi, P. Determination of Pb²⁺ ions by a modified carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and nanosilica. *J. Hazard Mater.* **2010**, *173*(1-3), 415-419.
- [12] Kenneth, O.; Staden, S.V.; Nyokong, T. Metallophthalocyanine based carbon paste electrodes for the determination of 2',3'-Dideoxyinosine. *Electroanalysis*, **2009**, *21*(14), 1651-1654.
- [13] Yaghobian, H.; Karimi-Maleh, H.; Mohammad, A.K.; Karimi, F. Electrocatalytic oxidation of levodopa at a ferrocene modified carbon nanotube paste electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2009**, *4*(7), 993-1003.

- [14] Alizadeh, T.; Mohammad, R.G.; Norouzi, P.; Zare, M.; Zeraatkar, A. A novel high selective and sensitive para-nitrophenol voltammetric sensor, based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta*, **2009**, *79*(5), 1197-1203.
- [15] Raouf, J.B.; Ojani, R.; Karimi-Maleh, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis(ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. *J. Appl. Electrochem.*, **2009**, *39*(8), 1169-1175.
- [16] Ongera, G.; Swamy, B.E.K.; Chandra, U.; Shergara, B.S. Simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using polyglycine modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J. Electroanal. Chem.*, **2009**, *636*(1-2), 80-85.
- [17] Karimi-Maleh, H.; Ensafi, A.A.; Allafchian, A.R. Fast and sensitive determination of captopril by voltammetric method using ferrocenedicarboxylic acid modified carbon paste electrode. *J. Solid State Electrochem.*, **2010**, *14*(1), 9-15.
- [18] Silva, P. *Farmacologia*, Guanabara Kooga: Rio de Janeiro, **2002**.
- [19] Rezaei, B.; Damiri, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate(II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. *Sens. Actuators, B: Chem.*, **2008**, *134*(1), 324-331.
- [20] Liping, W.; Xiao-Feng, Y.; Zhao, M. A 4-Methylumbelliferone-based fluorescent probe for the sensitive detection of captopril. *J. Fluoresc.*, **2009**, *19*(4), 593-599.
- [21] Toito, S.W.; Gomes, B.V.; Alves, M.A.; Orlando, F.F. Flow-injection spectrophotometric determination of captopril exploiting silver chloranilate solid-phase reactor. *Anal. Letters*, **2009**, *42*(7), 973.
- [22] Bergamin F^o, H.; Medeiros, J.X.; Reis, B.F.; Zaggatto, E.A.G. Solvent extraction in continuous flow injection analysis : Determination of molybdenum in plant material. *Anal. Chim. Acta*, **1978**, *101*(1), 9.
- [23] European Pharmacopeia, Council of Europe, 3rd ed., 1997, pp. 535-536.
- [24] Andrieux, C.P.; Savéant, J.M. J. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs homogeneous catalysis of electrochemical reactions. *J. Electroanal. Chem.*, **1978**, *93*(2), 163-168.
- [25] Bard, A.J.; Faulkner, L. *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 2nd ed., **2001**.
- [26] Batista, I.V.; Lanza, M.R.V.; Dias, I.L.T.; Tanaka, S.M.C.N.; Tanaka, A.A.; Sotomayor, M.D.P.T. Electrochemical sensor highly selective for estradiol valerate determination based on a modified carbon paste with iron tetrapyridinoporphyrazine. *Analyst*, **2008**, *133*(12), 1692-1699.
- [27] Currie, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *391*(10), 105-126.
- [28] Rosatto, S.S.; Sotomayor, M.D.P.T.; Gushikem, Y.; Kubota, L.T. SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection. *Electrochim. Acta*, **2002**, *47*, 4451.

Anexo 2 - Linearização da hipérbole e obtenção da reta para o gráfico de duplo recíproco⁵⁹. Onde [S]: representa a concentração molar de captopril; Δi_s , representa a variação da corrente na presença de uma concentração conhecida de captopril; K_M^a , representa a constante aparente de Michaelis-Menten e Δi_{MAX} , representa a variação de corrente máxima nas condições de saturação do sensor.

Pela equação da hiperbóle tem-se:

$$\Delta i_s = \frac{\Delta i_M [S]}{[S] + K_M^a} \quad \text{eq.1)}$$

Invertindo a equação a.1, tem-se:

$$\frac{1}{\Delta i_s} = \frac{[S] + K_M^a}{\Delta i_M [S]} \quad \text{eq.2)}$$

Rearranjando a equação a.2, tem-se a equação linearizada conhecida como

Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{\Delta i_s} = \frac{1}{\Delta i_M} + \frac{K_M^a}{\Delta i_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) \quad \text{eq.3)}$$

Graficando $\frac{1}{\Delta i_s}$ vs $\frac{1}{[S]}$, obtem-se o gráfico do duplo recíproco.