UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

U N E S P

INSTITUTO DE QUÍMICA

CÂMPUS DE ARARAQUARA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

"ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE ALGUNS AGENTES ANTIFÚNGICOS UTILIZANDO POLAROGRAFIA DE PULSO DIFERENCIAL E VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA"

MESTRANDO
FRANCISCO CLAUDECE PEREIRA

ORIENTADORA
Profa. Dra. MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da UNESP - Araraquara para obtenção do Título de Mestre em Química.

ARARAQUARA - SÃO PAULO

1999.

COMISSÃO EXAMINADORA.

Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni - UNESP - Araraquara
ORIENTADORA

Profa. Dra. Hideko Yamanaka - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. Mauro Bertotti - USP - São Paulo

1.0 - DADOS CURRICULARES.

1.1 - DADOS PESSOAIS.

1.1.1 - NOME: Francisco Claudece Pereira.
1.1.2 - DATA DE NASCIMENTO: 12 de abril de 1961.
1.1.3 - NATURALIDADE: Palmácia - Ceará.
1.1.4 - NACIONALIDADE: Brasileiro.
1.1.5 - FILIAÇÃO: Antonio Claudio Pereira e
Francisca Juraci Martins Pereira.
1.1.6 - PROFISSÃO: Professor.
1.1.7 - ENDEREÇO RESIDENCIAL: Rua Ipiranga, 2124 - Conj. São Francisco I - Pio Saraiva - Fortaleza - Ceará - C.E.P. 60.352-780.

2.0 - FORMAÇÃO ACADÊMICA.

2.1 - GRADUAÇÃO:

2.1.1 - Curso de Licenciatura Curta em Ciências: concluido na Universidade Estadual do Ceará - UECE.
2.1.2 - Curso de Licenciatura Plena em Ciências com Habilitação em Química: concluido na Universidade Estadual do Ceará - UECE.

2.2 - PÓS-GRADUAÇÃO.

2.2.1 - MESTRADO EM QUÍMICA.

Curso de Pós-Graduação em Química, área de Concentração: Química Analítica no Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista –UNESP, concluído em 13/10/1999.

3.0 - RESUMOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.

3.1 - PEREIRA, F.C., GUARATINI, C.C.I., E ZANONI, M.V.B., "Polarografia de Pulso Diferencial de Clotrimazol Derivatizado com Corante Reativo." 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - S.B.Q. Poços de Caldas - Minas Gerais. 1998, vol.3.

3.2 - PEREIRA, F.C., ZANONI, M.V.B., "Determinação de Clotrimazol Através de Voltametria de Redissolução Catódica." XXXVIII Congresso Brasileiro de Química -A.B.Q. - São Luis-Maranhão - 1998 - pg. 140-1.

3.3 - PEREIRA, F.C., ZANONI, M.V.B., "Eletroanálise de Miconazol em Formulações Farmacêuticas" 10º Encontro Nacional de Química analítica - ENQA - Santa Maria - Rio Grande do Sul – 1999, EL-12.

4.0 - TRABALHOS COMPLETOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.

4.1 - ZANONI, M.V.B., e PEREIRA, F.C., "Estudo da redução Eletroquímica de Clotrimazol em Eletrodo de Mercúrio". XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE - Maragogi - Alagoas - 1999 - pg.273-5.

4.2 - SILVA, D.H.S., YOSHIDA, M., PEREIRA, F.C., e ZANONI, M.V.B., - "Avaliação Eletroquímica da Atividade Antioxidante de Tocotrienóis Isolados dos Frutos da Iryanthara Juruensis (Miristicaceae) - XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE - Maragogi - Alagoas - 1999 - pg. 276-8.

5.0 - TRABALHOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO.

5.1- PEREIRA, F.C., STRADIOTTO, N.R., ZANONI, M.V.B., - “Electrochemical Reduction and Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Clotrimazole”, **J. Braz. Chem. Soc.**

5.2- SILVA, D.H.S., PEREIRA, F.C., ZANONI, M.V.B., YOSHISDA, M., - Electrochemical Evaluation of Lipophilc Antioxidants from Iryanthera Juruensis Fruits (Myristicaceae) “, **J. Braz. Chem. Soc.**

5.3- PEREIRA, F,C., ZANONI, M.V.B., GUARATINI, C.C.I., FOGG, A.G., “Interaction of Clotrimazole with Procion Red HE - 3B. Differential Pulse Polarographic Study”. **Anal. Lett.**

DEDICATÓRIAS.

A AMIGA E ORIENTADORA VALNICE.

Em minha andanças cruzei os caminhos de pessoas tão valiosas e dispostas a estender a mão que assumi uma eterna dívida e, se tivesse que algum dia pagar, não saberia como iniciar.
Meu eterno agradecimento ao incentivo, amizade, paciência e as maduras lições de vida.
Minha admiração e respeito a seu profissionalismo, competência, amor e dedicação ao trabalho.
Deus abençoe sua família e seu trabalho.

AO AMIGO E ETERNO MESTRE ROUQUAYROL.

“Quem chegou, ainda que apenas em certa medida, à liberdade da razão, não pode sentir-se sobre a terra senão como um andarilho”.
(Nietzsche)
Meu profundo respeito e admiração ao profissional exemplar e a maravilhosa figura humana que sóis.

A ZÉLIA.

“Por mais que na batalha se vença um ou mais inimigos, a vitória sobre si mesmo é a maior de todas as vitórias”
(Buda)
Obrigado pelo apoio e incentivo que muito me ajudaram.

AO AMIGO E IRMÃO ERIDAN.

Pelas maravilhosas palavras de conforto e incentivo. Pelo apoio inesgotável nos momentos difíceis. Minha gratidão, respeito e admiração a uma família linda, coerente e iluminada por Deus.

AGRADECIMENTOS:

A DEUS.

A este mundo vimos com uma missão: aprender, evoluir e nos aperfeiçoar. Em nossa trajetória conhecemos o bem e o mal e devemos pedir lucidez para discernir entre ambos. Os percalços, as dificuldades e os sofrimentos que passamos são as provas na vida que devemos ser submetidos para formarmos nosso juízo e valores pessoais.
Sempre seremos eternos aprendizes!
Obrigado pela direção, luz e encaminhamento em minha vida.

A MEU PAI.

A você meu pai, meu agradecimento pela maior herança que podemos receber: dignidade, respeito próprio e bondade no coração.

AO MEU AMIGO E IRMÃO LEÔNCIO (LEO).

Meu muito obrigado a todo o apoio, incentivo, palavras de confiança e ajuda material. Aceite minha admiração, respeito e amizade.

AOS PROFESSORES DA MINHA QUERIDA **U E C E.**

AIRTON MARQUES, CLAUDIO COUTO, JADIR JUCÁ e a todo o Departamento de Química pela força, apoio financeiro e moral.

AS AMIGAS DO SPG.

IZOLINA, SANDRA E VILMA, pelos sorrisos e as mãos sempre estendidas no intuito de ajudar.

AOS AMIGOS E AMIGAS DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA.

Roni, Nedja, Buda (Eduardo), Erwing, Marie, Patrícia, Claudia e Sulene pelas informações, ajuda e apoio nos momentos difíceis.

AOS FUNCIONÁRIOS (AS) DA BIBLIOTECA DO NOSSO INSTITUTO.

Pela grandiosa ajuda e amizade.

AOS PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA.

Pela saudável convivência e lições profissionais.

AO PROFESSOR NELSON R. STRADIOTTO.

Pela amizade, assistências e informações de grande valia que tantas vezes foram requisitadas.

A FAPESP, CAPES, CNPq E CONSULADO BRITÂNICO.

Pelo suporte financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuiram para a realização deste trabalho.

RESUMO.

O comportamento voltamétrico de dois agentes antifúngicos denominados de Clotrimazol e Miconazol foi investigado em meio hidrometanólico sobre eletrodo de mercúrio. Clotrimazol e miconazol são reduzidos em potencial bastante negativo em solução tampão B-R pH > 6 através da transferência reversível de 1 elétron à ligação C-Cl, cujo mecanismo de redução foi investigado através de PPD e VC. Para a determinação destes compostos em meio aquoso, recomenda-se a adição de 0,001% de Triton X-100 através da qual obteve-se uma curva de calibração linear entre $5x10^{-6}$ a $2,8x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 e para miconazol 192,0 a 718,5 $ng.mL^{-1}$ em solução tampão B-R pH 8,0

Um novo método para determinação indireta de clotrimazol através da técnica polarográfica de pulso diferencial foi investigado através da reação de derivatização do fármaco com o corante reativo Procion Red HE-3B (RR 120). O produto da reação entre a função clorotriazina do corante e clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0 é estável e reduzido em potencial de -0,38V (vs Ag/AgCl) e apresenta grande potencialidade analítica para monitoramento do fármaco. Curva de calibração linear no intervalo de 10 a 34 $\mu g.mL^{-1}$ foi obtida em solução tampão B-R pH 2,0, a temperatura ambiente utilizando-se $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante. O método apresenta boa reprodutibilidade com desvio padrão relativo de 0,33 entre 14 medidas de 68 $\mu g.mL^{-1}$. Limite de detecção 6,55$\mu g.mL^{-1}$ foi obtido. Níveis médio de correlação de 99,4% (n=7) foram obtidos para análise de Canesten solução tópica comercial. O método proposto apresenta

concordância de 99,5% em relação ao método espectrofotométrico utilizado para comparação.

Clotrimazol e Miconazol são pré-concentrados em eletrodo de mercúrio e reduzidos em potencial de -1,35V e -1,75V, respectivamente em tampão fosfato pH 6,9 e tampão B-R pH 8,0. Uma curva de calibração com excelente linearidade no intervalo de 103 a 345 $ng.mL^{-1}$ e limite de detecção de 5 $ng.mL^{-1}$ foi obtido para clotrimazol utilizando Tac= 60s e Eac=-0,2V. Para miconazol a curva de calibração é linear no intervalo de 192,0 a 718,5$ng.mL^{-1}$ apresentando limite de detecção de 8$ng.mL^{-1}$ para Tac= 30s e Eac= 0V.

O método foi aplicado em amostras de Canesten, Dermobene, Daktarin e Vodol, para determinação de Clotrimazol e Miconazol, respectivamente. Correlação de 99,4% para Canesten e para Dermobene 148%, para Daktarin 100 % e 97,2% para Vodol, respectivamente. Os valores de correlação para os fármacos pelo método proposto mostram excelente concordância com o nível de concentração denominado pelos fabricantes e com o método espectrofotométrico realizado para as amostras.

ABSTRACT.

Clotrimazole is reduced at mercury electrode above pH 6 involving a reversible one-electron process. The electrodic process presents a large contribution of the adsorption effects. For the differential pulse polarographic determination is recommended the addition of Triton X-100, which promotes a linear calibration curve from $5x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ to $2,8x10^{-4}$$mol.L^{-1}$. In addition, clotrimazole can be determined by cathodic stripping voltammetry at $5ng.mL^{-1}$ level when pre-accumulated for 1 min at an accumulation potential of -0,2V. The proposed method have shown a linear calibration curve from 103 to $345ng.mL^{-1}$ and can be applied successfully for the determination of the clotrimazole in commercial formulations.

Interaction of the clotrimazole with reactive dye Procion Red HE-3B (RR 120) was investigated in aqueous solution by differential pulse polarography. The clotrimazole derivatized with the reactive dye in B-R buffer (pH 2) yielded a sensitive polarographic response at -0,38V (*vs* Ag/AgCl). Analytical parameters such as pH, buffer compositions, temperature, reaction time and concentration of dye have been optimised. Linear calibration curves for clotrimazole have been construted from 10-34 $\mu g.mL^{-1}$ using $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ of the dye at room temperature. The method has been applied to the determination of clotrimazole in pharmaceutical preparations.

A cathodic stripping voltammetric method was also developed for determining miconazole at low levels on HMDE. A linear calibration curve is observed from 192,0 to 718,5 $ng.mL^{-1}$ of miconazole in B-R buffer pH 8,0 using accumulation time of 30s and accumulation potential of 0 V. The limit detection was estimated at $8ng.mL^{-1}$ and the reproducibility tested showed a value of 3,8% (n=9). The method was

applied in commercial samples and have shown great agreement with Spectrophotometric method used as comparative assay.

SIMBOLOS E ABREVIATURAS.

Ag/AgCl = prata cloreto de prata
B-R = Britton e Robinson
C= concentração
CH= celulose hidratada
cm= centímetro
DC= corrente contínua
DME= eletrodo gotejador de mercúrio
E_{ac}= potencial de acúmulo
EDTA= ácido etilenodiaminatetraacético
Ep= potencial de pico
$E_{1/2}$= potencial de meia-onda
HCl= ácido clorídrico
HMDE= eletrodo de gota pendente de mercúrio
HPLC= cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-EC= cromatografia líquida de alta eficiência - eletroquímica
ipa= corrente de pico anódica
ipc= corrente de pico catódica
KCl= cloreto de potássio
Kg= kilograma
L= litro
log= logarítmo
m= meta
mg= miligrama
min= minuto
mL= mililitro
mM= milimolar
MTX= metotrexate
mV= milivolt
nA= nanoampere
ng= nanograma
nm= nanometro
pKa= constante de dissociação
PVC= policloreto de vinila
R= radical
RR= reactive red
RSD= desvio padrão relativo
s= segundo
SCE= eletrodo de Calomelano saturado
SMDE= eletrodo de mercúrio de gota estática

T_{ac}= tempo de acúmulo
UV= ultra violeta
V= volt
vs= versus
v/v= volume/volume
$W_{1/2}$= largura de pico a meia altura
$W_{1/4}$= metade da largura de pico a meia altura
αn= coeficiente de transferência eletrônica
βn= constante de estabilidade
ΔE= amplitude de pulso
λ= comprimento de onda
µ= micra
υ= velocidade de varredura
%= porcentagem

ÍNDICE GERAL.

CAPÍTULO I

1.0 – INTRODUÇÃO 2

1.1- Considerações Gerais 2

1.2 - Exemplos de Aplicação das Técnicas Voltamétricas para Análise de Alguns Fármacos em Formulações Farmacêuticas e Fluidos Biológicos 6

1.3 – FUNGICIDAS 15
1.3.1 - Histórico e Desenvolvimento 15
1.3.2 –CLOTRIMAZOL 19
1.3.2.1 - Características Gerais 19
1.3.3 – MICONAZOL 23
1.3.3.1 - Características Gerais 23

1.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE CLOTRIMAZOL E MICONAZOL 27
1.4.1 – CLOTRIMAZOL 27
1.4.1.1 - Determinação Analítica de Clotrimazol 27
1.4.2 – MICONAZOL 33
1.4.2.1 - Determinação Analítica de Miconazol 33

1.5 – OBJETIVO 39

CAPÍTULO II

2.0 - PARTE EXPERIMENTAL 41
2.1 – Equipamentos 41
2.2 - Reagentes e Procedência 42
2.3 – Soluções 43
2.4 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 47
2.4.1 - Derivatização de Clotrimazol com o Corante Reactive Red 120 47
2.4.2 - Quantificação de Clotrimazol em Formulações Farmacêuticas Através de Método Espectrofotométrico 47
2.4.3 - Quantificação de Miconazol em Formulações Farmacêuticas Através de Método Espectrofotométrico 48

2.4.4 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS 49
2.4.4.1 - Amostras Comerciais em Solução 49
2.4.4.2 -Amostra Comercial sólida 50

CAPÍTULO III

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 52

3.1 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE CLOTRIMAZOL 52
3.1.1 - Estudo Polarográfico de Clotrimazol 52
3.1.2 - Influência do pH e Composição do Eletrólito Suporte 56
3.1.3 - Análise da Reversibilidade do Processo de Redução 59
3.1.4 - Características do Processo que Controla a Intensidade de Corrente 61

3.2 - COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO 72

3.2.1 - Estudo Voltamétrico de Clotrimazol 72
3.2.2 - Influência da Velocidade de Varredura 75
3.2.3 - Comportamento Voltamétrico em Meio Neutro 76
3.2.4 - Comportamento em Meio Alcalino 85

3.3 - REDUÇÃO DE CLOTRIMAZOL 90

3.4 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE CLOTRIMAZOL DERIVATIZADO COM CORANTE REATIVO 93
3.4.1 - Investigação Polarográfica da Interação RR 120 vs Clotrimazol 95
3.4.2 - Influência do pH e Composição do Eletrólito Suporte 97
3.4.3 - Características da Interação entre Clotrimazol e o Corante RR 120 99
3.4.4 - Estequiometria do Composto Derivatizado 106
3.4.5 - Estabilidade do Composto 110
3.4.6 - Curva Analítica 111
3.4.7 - APLICAÇÃO DO MÉTODO A OUTROS ANTIFÚNGICOS DA MESMA CLASSE DE FÁRMACOS 113
3.4.7.1 – Miconazol 113
3.4.7.2 – Tinizadol 115
3.4.8 - Aplicação Analítica 117

3.5 - ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA DE CLOTRIMAZOL 126
3.5.1 - Considerações Gerais 126
3.5.2 - Comportamento Adsortivo de Clotrimazol 126
3.5.3 - Influência do pH e Composição do Eletrólito Suporte 127

3.5.4 - Influência da Velocidade de Varredura 131
3.5.5 - Influência do Potencial de Acúmulo 132
3.5.6 - Influência do Tempo de Acúmulo 134
3.5.7 - Curvas de Calibração 135
3.5.8 - Aplicação em Formulações Farmacêuticas 138

3.6 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE MICONAZOL 141

3.6.1 - Comportamento Polarográfico 141
3.6.2 - Efeito do pH e Composição do Eletrólito Suporte 143
3.6.3 - Análise da Reversibilidade 147
3.6.4 - Características do Processo que Controla a Intensidade de Corrente 148

3.7 - ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE MICONAZOL 152
3.7.1 - Influência da Velocidade de Varredura 153

3.8 - ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA DE MICONAZOL 156
3.8.1 - Influência do pH 157
3.8.2 - Influência da Velocidade de Varredura 159
3.8.3 - Influência do Potencial de Acúmulo e Tempo de Acúmulo 161
3.8.4 - Estabilidade 164
3.8.5 - Curvas de Calibração 164
3.8.6 - Aplicação Analítica 166

3.9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS 171

3.10 - ESTUDOS FUTUROS 173

APÊNDICE I 174

3.11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 176

ÍNDICE DAS FIGURAS.

CAPÍTULO I

Figura 1.1: Estrutura molecular do clotrimazol. 20
Figura 1.2: Estrutura molecular do miconazol. 24

CAPÍTULO III

Figura 3.1: Polarograma de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0. 53

Figura 3.2: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 (curva II). Curva I= eletrólito suporte. 54

Figura 3.3: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução B-R pH 12,0 (curva II). Curva I= eletrólito suporte. 55

Figura 3.4: Influência do pH sobre o potencial de pico de redução de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R (pH ≥8,0) e solução tampão fosfato (pH 6 e 7). 58

Figura 3.5: Análise logarítmica da influência do tempo de gotejamento sobre a corrente de pico catódico de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0. 62

Figura 3.6: Análise logarítmica da influência do tempo de gotejamento sobre a corrente de pico catódico de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 63

Figura 3.7: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9/metanol (3:2) Curva I= eletrólito suporte; curva II= 2,5;curva III= 3,5;curva IV= 4,0;curva V= 4,5;curva VI= 5,0;curvaVII= 5,5;curva VIII= 6,0;curva IX= 7,0 e curva X= 7,5 ($x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol). 65

Figura 3.8: Efeito da concentração sobre a

corrente de pico catódico para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 67

Figura 3.9: Efeito da adição de TRITON X-100 sobre as ondas polarográficas de pulso diferencial de $2x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. Concentração de Triton X-100: Curva I= 0,0; curva II= $7,5x10^{-4}$ %; curva III= $1x10^{-3}$ % e curva IV= $2x10^{-3}$%. 69

Figura 3.10: Efeito da concentração sobre a corrente de pico catódico para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 contendo $1x10^{-3}$% de triton X-100. 71

Figura 3.11: Voltamograma cíclico de $1x10^{-4}$ mol. L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, υ = 60 mV.s^{-1}. 73

Figura 3.12: Voltamograma cíclico de $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0, υ = 60 mV.s^{-1}. 74

Figura 3.13: Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico (B) e pico anódico (A) no sistema $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 79

Figura 3.14: Efeito da velocidade de varredura sobre a função corrente no sistema $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 80

Figura 3.15: Efeito da velocidade de varredura sobre a razão corrente de pico anódico e corrente de pico catódico do sistema $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 82

Figura 3.16: Efeito da varredura sucessiva de potencial sobre a forma do voltamograma cíclico obtido para $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão pH 6,9. 84

Figura 3.17: Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico (A) e pico anódico (B) correspondente à redução e

reoxidação de $1x10^{-4}$ mol.L de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0. 87

Figura 3.18: Efeito da velocidade de varredura sobre a função corrente (pico catódico) correspondente à redução de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0. 88

Figura 3.19: Efeito da varredura sucessiva sobre a corrente de pico no sistema $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0. 89

Figura 3.20 : Estrutura Molecular do Corante REACTIVE RED 120. 94

Figura 3.21: Polarograma de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 3,0. 95

Figura 3.22: Polarogramas de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR120 (curva I) na ausencia e presença de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol (curvaII) em solução tampão B-R pH 3,0. 96

Figura 3.23: Polarogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I= $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR 120; curva II= adição de $2,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol. 99

Figura 3.24: Espectros de absorção UV-Vis para $1x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$; do corante RR 120 (curva I) na presença de $5x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol (curva II) e após adição de $8x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol (curva III) em solução tampão B-R pH 2,0. 101

Figura 3.25: Polarogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I= $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR 120; curva II= adição sucessiva de $7,5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol; curva III= $9,5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ e curva IV $2,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. 103

Figura 3.26: Efeito da razão molar sobre a corrente de pico das ondas polarográficas obtidas para o sistema clotrimazol/RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. 107

Figura 3.27: Relação entre potencial de pico e logarítmo da concentração de clotrimazol no intervalo de $2,2x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ a $4x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ e concentração do corante RR 120 fixo em $1x10^{-4}$

mol.L^{-1} em solução tampão B-R pH 2,0. 108

Figura 3.28: Curva de calibração para clotrimazol na presença de 1x10^{-4} mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução B-R pH 2,0. 112

Figura 3.29: Polarogramas de pulso diferencial de 1x10^{-4} mol.L^{-1} miconazol na presença de 5x10^{-4} mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0 (Curva II); e curva I=redução do RR 120. 114

Figura 3.30: Fórmula estrutural do tinidazol. 115

Figura 3.31: Polarogramas de pulso diferencial para tinizadol na presença de 5x10^{-4} mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I=RR 120, curva II= 1,5x10^{-4} mol.L^{-1} de tinidazol, curva III= 3,0x10^{-4} mol.L^{-1} de tinidazol e curva IV=5,0x10^{-4} mol.L^{-1} de tinidazol. 116

Figura 3.32: Polarogramas de pulso diferencial para Canesten na presença de RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. Curva 1= sem Canesten; curva 2= 29,28 µg.mL^{-1}; curva 3=36,21 µg.mL^{-1}; curva 4= 46,55 µg.mL^{-1} e curva 5= 60,34 µg.mL^{-1}. 118

Figura 3.33: Curva analítica para determinação de clotrimazol pelo método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz - 1993). 121

Figura 3.34: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para amostra de 41,38µg.mL^{-1} de Dermobene em solução tampão B-R pH 2,0 (curva II). Curva I= 5x10^{-4} mol.L^{-1} de RR 120. 123

Figura 3.35: Voltamogramas de redissolução catódica obtidos com varredura linear para $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V e υ= 100 $mV.s^{-1}$. Curva II= Tac de 30s; curva III= Tac de 90 s e curva I= eletrólito suporte em Tac= 30 s. 127

Figura 3.36: Influência da variação do pH sobre a corrente de pico obtido para $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R após pré-acúmulo de120s;Eac= 0,0V, υ=100$mV.s^{-1}$. 129

Figura 3.37: Voltamogramas de redissolução adsortiva para $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em soluções tampão B-R pH 7,0 (curva A) e tampão fosfato pH 7,0 (curva B);Tac= 120s;Eac=0V; υ= 100$mV.s^{-1}$. 130

Figura 3.38: Influência da Velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica de voltamogramas obtidos de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, Tac= 120s; Eac= 0,0V. 132

Figura 3.39: Influência do Eac sobre a corrente de pico catódico de voltamogramas obtidos de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9; υ= 100$mV.s^{-1}$, Tac= 120 s. 133

Figura 3.40: Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico catódico obtido de voltamogramas de $5x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ (curva a) e $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol, (curva b), em solução tampão fosfato pH 6,9; υ= 100$mV.s^{-1}$ e Eac= -0,2V. 135

Figura 3.41: Curva de calibração obtida do sistema em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V; υ=100$mV.s^{-1}$, Tac de 3 minutos. 137

Figura 3.42: Curva de calibração obtida do sistema em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V; υ=100$mV.s^{-1}$,Tac de 1minuto. 138

Figura 3.43: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 (curva B) e eletrólito suporte (curva A). 142

Figura 3.44: Polarograma de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 12,0. 143

Figura 3.45: Influência do pH no potencial de pico catódico obtido de polarogramas de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R. 145

Figura 3.46: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão fosfato pH 8,0/metanol (1:1) (curva B) e solução tampão fosfato pH 8,0/metanol (1:1) (curva A) 146

Figura 3.47: Gráfico logarítmico da influência do tempo de gotejamento sobre a intensidade de corrente do sistema $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0. 149

Figura 3.48: Comportamento da corrente de pico catódico vs concentração de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 e tempo de gotejamento de 0,8 segundos. 150

Figura 3.49: Voltamograma cíclico de $1x10^{-3}$ mol. L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0, υ=30 mV.s^{-1} 153

Figura 3.50: Voltamogramas de redissolução catódica obtidos de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 em Tac= 15 s (curva B); Tac=30 s (curva C); Tac=60 s (curva D) e curva A= eletrólito suporte em Tac= 60s. Eac= 0,0 V e υ = 100 mV.s^{-1}. 157

Figura 3.51: Influência do pH sobre a corrente de pico catódico no sistema $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R. Tac= 60 s, Eac= 0,0V; υ=100 mV.s^{-1}. 159

Figura 3.52: Efeito da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Tac= 45 s e Eac= 0,0V. 160

Figura 3.53: Influência do potencial de acúmulo sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Tac= 45s e υ= 100 $mV.s^{-1}$. 162

Figura 3.54: Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Eac= 0,0V e υ= 100 $mV.s^{-1}$. 163

Figura 3.55: Curvas de calibração obtida para miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 em Eac= 0,0V e υ= 100$mV.s^{-1}$. Curva I Tac= 100 segundos e curva II Tac= 30 segundos. 165

Figura 3.56: Curva analítica para miconazol segundo o método espectrofotométrico (Cavrini *et al* - 1981). 168

ÍNDICE DAS TABELAS.

CAPÍTULO II

Tabela 2.1: Efeito da presença de metanol sobre o valor final do pH das soluções tampão B-R utilizadas como eletrólito suporte. 45

Tabela 2.2: Efeito da adição de metanol sobre o valor final do pH das soluções de tampão fosfato utilizadas como eletrólito suporte. 46

CAPÍTULO III

Tabela 3.1: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R. 56

Tabela 3.2: Influência do pH nos valores da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) obtidos nos polarogramas de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R. 60

Tabela 3.3: Parâmetros voltamétricos do sistema $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. 77

Tabela 3.4: Parâmetros voltamétricos obtidos do sistema $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0. 86

Tabela 3.5: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial obtidos do sistema $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RED120 e $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R. 98

Tabela 3.6: Parâmetros espectrofotométricos obtidos dos espectros correspondentes ao sistema corante RR 120 e clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0. 102

Tabela 3.7: Determinação de clotrimazol no spray Canesten através do método polarográfico. 119

Tabela 3.8: Determinação de clotrimazol no spray Canesten, segundo o método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz - 1993) 121

Tabela 3.9: Determinação do teor de clotrimazol na solução tópica comercializada como Dermobene.Método proposto. 124

Tabela 3.10: Determinação de clotrimazol na solução tópica de Dermobene.Método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz - 1993). 125

Tabela 3.11: Resultados obtidos na determinação de clotrimazol em amostras comerciais de Canesten(spray) através do método voltamétrico de redissolução. 139

Tabela 3.12: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial obtidos de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1). 144

Tabela 3.13: Valores da largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) do sistema $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1). 147

Tabela 3.14: Parâmetros voltamétricos do sitema $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1) pH 8,0. 154

Tabela 3.15: Quantificação de miconazol na formulação farmacêutica denominada como Daktarin através da técnica voltamétrica de redissolução catódica. 166

Tabela 3.16: Quantificação de miconazol na formulação farmacêutica denominada de Vodol através da técnica voltamétrica de redissolução catódica. 167

Tabela 3.17: Determinação de miconazol na formulação farmacêutica comercializada como Daktarin utlizando-se o método espectrofotométrico (Cavrini *et al* -1981). 169

Tabela 3.18: Determinação de miconazol na formulação farmacêutica comercializada como Vodol utilizando-se o método espectrofotométrico (Cavrini *et al* – 1981). 170

ÍNDICE DOS ESQUEMAS.

CAPÍTULO I

Esquema 1.1: Metabólitos gerados na biotransformação de clotrimazol (Hoogerheide & Wika - 1982) 21

Esquema 1.2: Produtos de hidrólise do miconazol (Oyler *et al* - 1991). 25

CAPÍTULO III

Esquema 3.1: Esquema de redução para compostos halogenados, (onde X= F^-, Cl^-, Br^- e I^-) resumindo as principais rotas e produtos previstos(Baizer & Lund - 1983): 90

Esquema 3.2: Esquema de redução de clotrimazol 91

Esquema 3.3: Esquema de hidrólise ácida do clotrimazol ((Hoogerheide & Wika - 1982) 104

CAPÍTULO

I

INTRODUÇÃO.

1.0 - INTRODUÇÃO.

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.

A utilização de técnicas voltamétricas na investigação do comportamento eletroquímico de compostos farmacêuticos e de substâncias biologicamente ativas é reportado na literatura desde longa data (Brezina & Zuman, 1958). Dentre os métodos eletroquímicos existentes, as técnicas polarográficas e voltamétricas constituem importante ferramenta no estudo dessas substâncias, uma vez que, além de informações qualitativas e quantitativas, é possível ainda estabelecer mecanismo e cinética de redução ou oxidação de um dado sistema. Os métodos desenvolvidos têm possibilitado tanto o monitoramento do fármaco na forma pura quanto na forma disponível comercialmente ou ainda em fluidos biológicos.

A possibilidade de aplicação dos métodos voltamétricos na análise de compostos farmacêuticos é ampla se considerarmos que a grande maioria dos fármacos possuem grupos funcionais ou saturações na molécula. Adicionalmente, a utilização do método pode ainda ser analisado através da utilização de reações de condensação, adição, oxidação, hidrólise e complexação, que possibilitam a transformação de uma espécie não eletroativa em outra eletroquimicamente ativa permitindo assim, o monitoramento indireto destes compostos (Smith, 1980; Smith & Vos, 1992).

As inovações das técnicas voltamétricas se deu por volta da década de 70, através da introdução das técnicas de pulso que ampliaram a competitividade dos métodos

disponíveis (polarografia de corrente contínua), em relação às técnicas espectrofotométricas vigentes na época. Isto é, a utilização da polarografia de pulso normal, diferencial e onda quadrada mostraram a possibilidade de se detectar o analito em níveis de concentração na ordem de $1x10^{-7}$ a $1x10^{-8}$ $mol.L^{-1}$ aumentando significativamente a sensibilidade dos métodos polarográficos.

Nas últimas décadas, a utilização das técnicas voltamétricas de redissolução tem aumentado ainda mais a sensibilidade do método ampliando os níveis de detecção para a ordem de $1x10^{-10}$ a $1x10^{-11}$ $mol.L^{-1}$ através de uma simples etapa de pré-concentração (Hart, 1990; Wang, 1985; Wang & Bard, 1989).

O crescente interesse por métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis para determinação e monitoramento de fármacos e seus produtos de degradação tem aumentado nos recentes anos, basicamente devido aos grandes avanços na clínica médica que requerem métodos analíticos em níveis de ultra-traços para acompanhamento de compostos farmacêuticos nos mais diversos fluidos biológicos. Em resumo, métodos confiáveis, econômicos e rápidos têm sido o grande alvo de inúmeros pesquisadores na busca por metodologias analíticas cada vez mais eficazes a serem usados nas mais diversas matrizes e níveis de concentração (Hart, 1990).

No entanto, dentre todos os métodos analíticos comumente utilizados na determinação de fármacos, a aplicação das técnicas voltamétricas requer uma melhor compreensão do mecanismo eletródico para se obter um bom

aproveitamento da técnica, além da comparação de mais de uma técnica eletroquímica e investigação de diversos parâmetros que afetam a resposta analítica (Bersier, 1987).

Dentro das últimas tendências na área de eletroanalítica devemos ainda citar o uso de HPLC com detectores eletroquímicos e o uso de sensores eletroquímicos. A aplicação da eletroquímica acoplada ao método de HPLC tem contribuido significativamente para a sensibilidade e seletividade dos métodos cromatográficos. Técnicas híbridas como HPLC-EC, que combinam o poder de separação do HPLC com a sensibilidade da detecção eletroquímica têm se mostrado uma ferramenta poderosa na análise de fármacos e estudo de seus metabólitos em fluidos biológicos (Smyth & Egan, 1992).

O uso de eletrodos recobertos por filmes de reagentes imobilizados passíveis de reações específicas com o analíto tem ainda merecido especial atenção na ampliação das potencialidades analíticas das técnicas voltamétricas. Troca-iônica típica, incorporação de pares redox no recobrimento polimérico conferindo propriedades eletrocatalíticas ao eletrodo ou ainda com características ligantes capazes de interagir especificamente com o analíto através de reação de complexação, têm aumentado significativamente a sensibilidade e seletividade dos métodos eletroquímicos (Faci & Murray, 1981; Anson, *et al*., 1983; Oyama & Anson 1980).

Diante do exposto, é de nosso interesse investigar o desenvolvimento de novos métodos analíticos para monitoramento de alguns agentes antifúngicos utilizando-se a

técnica polarográfica de pulso diferencial e voltametria de redissolução.

1.2 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE ALGUNS FÁRMACOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS.

A utilização das técnicas voltamétricas na análise de compostos farmacêuticos tem mostrado resultados satisfatórios nas mais diversas classes de fármacos e matrizes. Métodos eletroanalíticos, tais como polarografia, voltametria, amperometria e potenciometria, têm recebido grande aceitação na literatura (Georgescu & Calusaru, 1971), como é demonstrado nos trabalhos relatados abaixo.

Agentes antituberculoses, tais como, derivados tiobenzamida, (Rihova, *et al*., 1976), têm sido investigados utilizando-se HPLC com detecção fotométrica e detecção eletroquímica. Detecção voltamétrica com um eletrodo de fibra de carbono foi utilizada aplicando um potencial de + 1,4V (*vs* Ag/AgCl) e mostrou maior sensibilidade que a detecção fotométrica-UV. Os limites de detecção para ambas as técnicas foram encontradas em 0,1 e 1,0 $ng.mL^{-1}$, respectivamente.

Benzoimetronidazol, um agente antibacterial usado sistematicamente contra uma larga variedade de bactérias anaeróbicas e especialmente no tratamento de *Trichomoniasis*, foi estudado por polarografia de pulso diferencial em solução tampão acetato 0,1 $mol.L^{-1}$ pH 6,0 na presença de metanol (9:1 - v/v) com 0,2% de gelatina. A quantificação mínima foi de 20 $ng.mL^{-1}$ (Dalkara*, et al*., 1984).

O comportamento polarográfico de diferentes rifamicinas foi extensivamente estudado por (Georgescu & Calusaru, 1971), utilizando polarografia de pulso diferencial e voltametria cíclica além de métodos quantitativos para determinação do fármaco. Os autores têm utilizado a técnica polarográfica para estudo de estabilidade e hidrólise destes fármacos.

Os antihelmínticos são drogas que têm a capacidade de livrar o corpo de vermes parasitas ou helmintos. A prevalência de infecções helmínticas em humanos é difundida por todo o planeta e representa o maior problema de saúde mundial, particularmente em países de terceiro mundo (Wilson & Gisvol's, 1982). As técnicas voltamétricas têm sido utilizadas também na determinação de vários agentes antihelmínticos, hidrocarbonetos clorados, fenóis e derivados, corantes, piperazinas e compostos correlatos, compostos antimaláricos, várias substâncias heterocíclicas, alcalóides e outros produtos naturais.

(Walash, *et al*., 1985), desenvolveram métodos analíticos baseados na polarografia de corrente contínua para sais de piperazina e compostos correlacionados. Os autores são capazes de discriminar aminas secundárias das primárias ou terciárias. Curva de calibração obtida nestas condições experimentais mostra linearidade na faixa de concentração entre $1,6x10^{-5}$ - $1,9x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. O método foi ainda aplicado na dosagem de piperazina em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos mostraram concordância com o método espectrofotométrico.

Mebendazol (metil 5-benzoilimidazol-2 - carbamate), apresenta largo espectro antihelmíntico,

especialmente útil contra infecções vermicidas. (Pinzauti & Casani, 1980), desenvolveram procedimento polarográfico para análise do composto. Em meio ácido pH <2, uma onda de redução bem definida foi observada a qual foi utilizada para obtenção de uma curva de calibração linear entre $1,7x10^{-5}$ a $1,7x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. Tabletes comerciais foram analisados segundo o procedimento e seus excipientes não apresentaram interferência. Análise espectrofotométrica comparativa foi realizada e os parâmetros de ambas as técnicas possibilitaram redescobrimento na ordem de 100 ±1%.

Miclosamida é considerada como um agente ativo no tratamento de muitas infecções com cestodes. Métodos espectrofotométricos, colorimetria diferencial, cromatografia gasosa e polarografia DC são mencionados na literatura para sua determinação (Mishra & Gode, 1985). Para o ensaio desta droga em tabletes, o princípio ativo é extraído com metanol e adicionado à solução tampão apropriada. Miclosamida pode ser estimada em níveis de 5 a 10 $\mu g.mL^{-1}$. Tabletes contendo 500 mg de miclosamida foram analisados mostrando descobrimento de 99,8 a 100,2%. Os nove excipientes contidos na formulação não apresentam interferência no ensaio.

A utilização de técnicas voltamétricas na determinação de drogas modernas usadas na quimioterapia contra a malária é bastante conhecida. HPLC com detecção eletroquímica tem sido utilizada por (Mount, *et al*., 1986), mostrando alta sensibilidade e seletividade na quantificação de aminodiaquina e 3 de seus metabólitos em sangue, requerendo somente uma etapa de extração. Limite de detecção de 1 $ng.mL^{-1}$ para aminodiaquine e níveis da

droga e seus metabólitos foram determinados em 2 voluntários após 9 semanas de regime quimioprofilático. Os referidos pesquisadores sugerem que a aplicação de seu procedimento pode ser estendido no estudo dos metabólitos de outras aminodiaquinas análogas em fluidos biológicos, incluindo amopiroquina, cicloquina e pironaridina.

Técnicas voltamétricas têm sido utilizadas para um grande número de antibióticos. Dentre eles, o comportamento polarográfico do cloranfenicol foi investigado por (Kazandzhieva, *et al*., 1986), que desenvolveram um seletivo, preciso e reprodutível método polarográfico DC para o ensaio simultâneo de cloranfenicol e furazolidomi em tabletes, após dissolução em solução tampão B-R ou acetato pH 4,6 contendo 10% de dimetilformamida e 0,01% de gelatina.

Adicionalmente, cloranfenicol exibe uma onda de redução bem definida em solução tampão piridina-ácido fórmico e cloreto de trimetilamônio pH 4,3, $E_{1/2}$ = -0,4V (*vs* SCE). Esse processo de redução foi usado para o ensaio em formulações farmacêuticas, como cápsulas contendo 250mg de cloranfenicol apresentado desvio padrão relativo de 1,1 (n=10) e tabletes contendo 100mg com RSD de 2,01% (Morales, *et al*., 1984).

Muitos agentes antineoplásticos são altamente tóxicos para os pacientes e devem ser administrados com extremo cuidado, uma vez que efeitos colaterais podem produzir efeitos tóxicos no coração, pulmões, ríns e em outros órgãos. Em vista de seus inerentes riscos de toxicidade, as dosagens devem ser cuidadosamente controladas. Isto requer

conhecimento detalhado dos níveis de plasma, distribuição nos tecidos ou excreção da droga e assim, confiáveis métodos analíticos são requeridos. A utilização da técnica voltamétrica de redissolução para algumas dessa classe de compostos foi utilizada por (Wang, *et al*., 1987). Os autores reportaram que clorambucil pode ser pré-concentrado em eletrodo de gota estacionária de mercúrio em ácido bórico 0,025 $mol.L^{-1}$ e solução tampão acetato pH 5,4. O fármaco exibe uma onda de redução irreversível em potencial de -1,3V (*vs* Ag/AgCl). Uma resposta linear entre corrente de pico e concentração do substrato foi obtida no intervalo de $2x10^{-7}$ a $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$.

Exemplos de aplicações de técnicas voltamétricas para monitoramento de antimetabólitos em formulação farmacêutica ou fluido biológico foram investigados por (Gurira & Bowers, 1983; Ellaithy, *et al*., 1982; Bowers & Gurira, 1981; Fijalek, *et al*., 1985). Antimetabólitos são compostos que previnem a biossíntese ou utilização normal dos metabólitos celulares. Altas doses estão sendo utilizadas no tratamento preventivo de câncer. Devido a seu alto risco de toxidez seu gerenciamento requer análise do plasma ou soro que permita o monitoramento confiável da terapia.

Metotrexate (MTX), exibe etapas de redução envolvendo 2 elétrons e 2 prótons em meio ácido e neutro. (Gurira & Bowers, 1983; Ellaithy*, et al*., 1982; Bowers & Gurira, 1981; Fijalek, *et al*., 1985) utilizaram-se das técnicas polarográficas de corrente alternada, corrente contínua, pulso normal e diferencial e oscilopolarografia para seu monitoramento. (Fijalek, *et al*., 1985) têm aplicado a técnica

oscilopolarográfica no ensaio do MTX e formulações farmacêuticas contendo o principio ativo em tabletes em níveis de concentração de mM e µM. (Wang, *et al*., 1986), desenvolveram um método voltamétrico altamente sensível baseado na pré-concentração adsortiva do MTX sobre a gota estacionária de mercúrio no eletrodo capilar ou no eletrodo de pasta de carbono. O limite de detecção com o HMDE foi de $2x10^{-9}$ $mol.L^{-1}$ usando um tempo de pré-concentração de 5 minutos. MTX pode ser analisado em amostra de urina sem pré tratamento ou diluído 1:4 com o eletrólito suporte. Amostra de urina contendo entre 5 a $15x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ de MTX produz picos bem definidos seguido de um curto período de pré-concentração. Para a análise de MTX em soro humano e urina, métodos envolvendo HPLC com detecção amperométrica têm também sido propostos. (Palmisano, *et al*., 1985), mostram um procedimento usando uma coluna C_{18} de fase reversa e detecção amperométrica com eletrodo de carbono vítreo a potencial de + 0,95V (*vs* Ag/AgCl). (Guerrieri & Palmisano, 1987), mostram um procedimento de HPLC com detecção polarográfica indireta usando um eletrodo de mercúrio em potencial de + 0,19V (*vs* Ag/AgCl) para a detecção de MTX em fluidos biológicos. Curva de calibração para o MTX foi obtido entre 5 a 1.000 $ng.mL^{-1}$. A mesma relação em soro foi obtida até 150 µM de MTX com o limite de detecção de 1,5µM.

A reorganização dos antibióticos como uma importante classe de drogas neoplásticas é bem recente. Em virtude dos antibióticos antitumor serem pobremente absorvidos pela mucosa gastrointestinal, eles são usualmente administrados intravenosamente. Agentes clínicos anticâncer usados,

incluem: sulfato de bleomicina, dactinomicina (actinomicina), daunorubicina (daunomicina), doxorubicina (adriamicina), mitomicina, plicamicina (mitracina), (Wilson & Gisvol's, 1982).

Somente informações sobre o comportamento polarográfico / voltamétrico e ensaio para bleomicinas (Ong & Lee, 1986) e dactinomicinas (Sakura & Imai, 1985), podem ser encontrados na literatura recente.

(Horn, *et al*., 1984), encontraram correlação entre o grau de redução dos antibióticos antraciclínicos (daunorubicina, doxorubicina, aclacinomicina, 5-imino-daunomicina, violamicina BI, violamicina BII) e medidas polarográficas de potencial de meia-onda. Os tipos das curvas de redução são diferentes e podem ser usadas para a caracterização das drogas com respeito a adsorção nas membranas e toxidez.

A propriedade ativa de superfície de daunorubicina (Wang, *et al*., 1987) e de dexorubicina (Smyth, 1986), tem sido explorada para o desenvolvimento de metodologia de voltametria de redissolução com um limite de detecção de $1x10^{-9}$ $mol.L^{-1}$ de daunorubicina após um tempo de pré-concentração de 5 minutos. As condições ótimas incluem o uso de potencial de acúmulo de - 0,3V (*vs* Ag/AgCl) com o HMDE em solução tampão acetato pH 4,4. A mistura de daunorubicina e 5-fluorouracila produz bem definidos picos adsortivos para ambos os compostos em potencial de -0,58V, -0,65V e -1,37V, respectivamente, permitindo simultânea determinação de ambos os fármacos.

Amostra sem prévio tratamento, diluída em 1 + 4 com eletrólito suporte e tempo de pré-concentração de 15 segundos é requerido para a análise de daunorubicina em

urina utilizando HMDE ou eletrodo de pasta de carbono (Smyth, 1986).

(Vire, *et al*., 1987), têm utilizado a técnica voltamétrica de redissolução com varredura de onda quadrada com (SMDE), para a detecção de ultra-traços de marcellomicina em solução de ácido acético e potencial de acúmulo de -0,2V (*vs* Ag/AgCl). Um limite de detecção de $5x10^{-9}$ $mol.L^{-1}$ foi facilmente alcançado após 120 segundos de tempo de acúmulo.

Polarografia de pulso diferencial é um conveniente método para a análise de nitrofurantoina e fenazopiridina em tabletes. Ambos os compostos mostram, em solução tampão Britton-Robinson pH 5,5 contendo 1% de dimetilformamida, duas ondas com picos de separação Ep= -0,1V e -0,4V (*vs* Ag/AgCl), respectivamente. O limite de detecção é significativamente inferior a $1\mu g.mL^{-1}$. A dependência da corrente de pico em função da concentração foi obtido entre 1-8 $\mu g.mL^{-1}$.

Fenazopiridina exibe, em uma mistura hidrometanólica (1:1) pH 7,0 em solução tampão fosfato, contendo 2% de acetato de sódio, uma onda de oxidação em potencial de +0,75V(*vs* Ag/AgCl). O processo eletródico é completamente irreversível (Belal, 1985). O referido autor descreve a determinação amperométrica do composto em HCl aplicando um potencial constante de +0,95V, que possibilitou uma curva de calibração linear na faixa entre 1-30$\mu g.mL^{-1}$ e limite de detecção de 0,2$\mu g.mL^{-1}$.

Uma determinação direta da droga antiviral 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina, que apresenta uma larga série de atividades contra herpes, citomegalovirus e vírus

Epstein - Beer, utilizando voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial foi desenvolvido por (Visor, *et al*., 1986), utilizando um eletrodo estacionário de carbono vítreo. Este composto exibe, em eletrólito suporte a 1% de ácido fosfórico em 50% de metanol uma onda bem definida envolvendo a participação de 2 elétrons e 2 prótons. Uma correlação entre corrente e concentração do substrato foi obtida entre 0,4 - 2,0 mM com um limite de quantificação de 0,1mM. O método voltamétrico de pulso diferencial para dosagem da forma parenteral é sensível, específico e rápido. A seletividade do procedimento para a droga e a guanina é baseada na diferença de seus potenciais de oxidação, fazendo desnecessária a separação cromatográfica.

Diante do exposto, é possível concluir que as técnicas polarográficas e voltamétricas constituem uma ferramenta versátil, sensível, precisa e de baixo custo capazes de permitir a detecção de uma grande diversidade de compostos farmacêuticos nas mais diferentes matrizes. Deste modo, é de nosso interesse investigar a possibilidade de se usar as técnicas voltamétricas para monitoramento e quantificação de dois agentes antifúngicos: clotrimazol e miconazol, ambos pertencentes à família dos imidazóis, de amplo uso na classe médica.

1.3 - FUNGICIDAS.

1.3.1 - HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTO.

Os fungos ocupam lugar privilegiado na medicina e do ponto de vista fisiopatológico, são responsáveis pelas micoses, capítulo dos mais importante na clínica médica.

As micoses podem ser superficiais, profundas ou sistêmicas. As micoses dos cabelos, mucosa, pele e unhas são tratadas como superficiais e causadas pelo gênero *Candida, Epidermophyton, Microsporum* e *Trichophyton*. As micoses profundas e sistêmicas são causadas pelo gênero *Aspergillus, Blastomyces, Coccidioides, Cryptcoccus, Histoplasma* e *Paracoccidioide* e se subdividem em dois grupos: micoses oportunistas, que surgem em organismos debilitados sob ação de terapêutica imunossupressora (leucemias, linfomatoses) ou com fatores predisponentes (diabetes); micoses de baixa incidência, que variam de acordo com a sua geografia.

Os agentes antifúngicos, (Drouhet, 1978), podem ser classificados em dois grandes grupos: (1) antibióticos, produzidos por diversos microorganismos e (2) agentes químicos obtidos por síntese. Entre os primeiros, várias centenas de antibióticos fungiostáticos já foram isolados nos últimos 30 anos, mas poucos tinham o tipo e grau de toxicidade para serem usados nas micoses humanas e animais (Silva, 1985).

Enquanto a quantidade de drogas disponíveis e eficazes contra bactérias atualmente é tão grande que o terapeuta freqüentemente se dá ao luxo de escolher

uma em várias opções, o número de drogas antimicóticas eficazes disponíveis ainda é muito limitado, embora alguns resultados promissores tenham sido obtidos nas últimas décadas.

As doenças bacterianas foram e continuam sendo um problema médico de dimensão bem maior do que as micoses. Contudo, o controle das micoses ainda é mais difícil do que aquele de ação bacteriana. Adicionalmente, com o avanço da medicina tem se constatado o crescente aumento do número de casos de micoses oportunistas cujo desenvolvimento tem sido proporcional ao aumento na administração de drogas como corticóides, citostáticos, imunossupressores e antibióticos de amplo espectro.

As células fúngicas, de modo semelhante às células humanas, são eucarióticas. Há portanto, menor diferença fisiológica entre ambas do que entre as células bacterianas procarióticas e as células do hospedeiro humano eucariótico. Conseqüentemente, em comparação com as bactérias, há menos pontos fracos nas células fúngicas que possam ser agredidas sem ao mesmo tempo afetar também as células do hospedeiro. Deste modo, a avaliação de substâncias químicas quanto a atividade antimicótica é mais difícil que a avaliação das atividades bacterianas. Os fungos são mais dificilmente mantidos em meios artificiais que as bactérias; seu desenvolvimento requer muito tempo, e as fases de crescimento e os tipos morfológicos são imensamente mais complexos do que as bactérias. Por essas razões, os métodos de avaliação da atividades das substâncias contra os fungos são menos padronizados e menos adequados do que aqueles

empregados para determinar o poder antibacteriano (Czerkowicz & Stuart, 1968).

Desde épocas muito antigas que alguns agentes antimicóticos são conhecidos, como por exemplo, o enxofre, que segundo Homero no século VIII AC, era empregado como purificante. Outros compostos eram também utilizados como sulfato de cobre, cloreto de zinco e o arsênio. No século XIX, foram utilizados várias formas de cobre menos tóxicas, como sulfato básico, óxidos e salicilato de cobre e outras formas de enxofre.

Somente a partir da década de 1930 é que ocorreu o desenvolvimento de compostos orgânicos fungicidas. Os primeiros compostos foram os ditiocarbamatos. Com o aperfeiçoamento dos métodos de extração de alguns ácidos graxos com atividades fúngicas, introduziu-se nesta época na clínica médica o uso do ácido propiônico e do ácido undecilênico. Diversos antibióticos foram introduzidos na clínica médica como agentes fungitóxicos na década de 50 onde se destacam a griseofulvina, a nistatina, a candidicina e a anfotericina (Valle, *et al*., 1991).

Dentre as substâncias manipuladas com esse propósito, há registros de sais de metais pesados, vários compostos sulfurados e alguns halogênios, substâncias contendo íons oxidantes, como permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e cromatos também são encontrados na literatura.

No entanto, significativos avanços na terapia antifúngica se deram apenas nas últimas décadas. Particularmente, muitos desses avanços foram registrados após a introdução dos compostos triazólicos, tais como: itraconazol, fluconazol, butaconazol e cetoconazol, clotrimazol e

miconazol.(Estruturas de alguns antifúngicos são mostradas no apêndice I).

A atividade e seletividade desses agentes antifúngicos dependem de sua afinidade com o íon ferro do heme no sistema enzimático 14α-desmetilase dependente do citocromo P450. Os derivados imidazólicos e triazólicos ligam-se ao ferro do citocromo, via nitrogênio terciário dos imidazóis ou ao nitrogênio quaternário dos triazois, formando um complexo hexacoordenado na ligação com o oxigênio. Isto resulta na inibição da reação monooxigenase catalisada pelo citocromo P450 de acordo com o esquema simplificado:

$$RH + NADPH_2 + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$$

(RH = um substrato lipofílico, em geral o lanosterol).

A complexação dos fármacos com o sítio ativo do heme, causa a inibição da síntese do ergosterol, provocando o acúmulo do esteroide 24-metilenodihidrolanosterol que, uma vez acumulado, provoca a desorganização do sistema compacto dos fosfolipídeos, prejudicando outros sistemas enzimáticos, como o ATPase e enzimas transportadoras de elétrons (Tumbay, *et al*., 1991; Bennett, 1996).

Dentre os diversos antifúngicos da família dos imidazóis, os fármacos clotrimazol e miconazol têm sido abundantemente utilizados no tratamento das mais diversas micoses provocadas por fungos e comercializadas indiscriminadamente por inúmeros laboratórios e farmácias de manipulação.

1.3.2 - CLOTRIMAZOL.

1.3.2.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS.

O clotrimazol 1-{[(2-clorofenil)difenil]metil} - 1H-imidazol, cuja estrutura é mostrada na Figura 1.1, é um agente antifúngico de amplo espectro antimicótico da família dos imidazóis. Embora seja um fungicida de primeira geração ainda é largamente utilizado pela classe médica no tratamento de dermatites patogênicas e infecções superficiais e sistêmicas além de apresentar atividades contra *candídiase.*

Clotrimazol se apresenta na forma de um pó sólido cristalino, incolor, inodoro e insípido, possui massa molar igual a 344,84 $g.mol^{-1}$ e ponto de fusão entre 147-149^{o}C; prontamente solúvel em solventes orgânicos como metanol, benzeno, clorofórmio e dimetilformamida e escassamente solúvel em água. Sua constante de dissociação (pKa) em solução etanólica (1:1) é reportada sendo igual a 4,7 (Hoogerheide & Wika, 1982).

Clotrimazol é estável no estado sólido quando estocado em condições normais e não é afetado por temperaturas inferiores a 70^{o}C. Em solução a estabilidade do fungicida depende do pH. Em meio alcalino é estável mas sofre hidrólise em meio ácido produzindo o álcool [(o-clorofenil)-difenilmetanol] e imidazol. A solução do fármaco é estável em temperatura ambiente por cerca de 5 anos (Bennett, 1996; Silva, 1985).

O fármaco pode ser encontrado em diferentes formulações farmacêuticas, tais como: creme, soluções de uso tópico, sprays, tabletes, loções e pastilhas de uso oral

e disponível comercialmente em formulações denominadas por: canesten, clomazen, clotrimix, micotrizol, dermobene, clogen, gino-clotrimix, tricosten, dentre outros. Em adultos a dosagem diária é de 200mg , gerando concentração plasmática na ordem de 0,2 a 0,35 $\mu g.mL^{-1}$ após uso oral (Hoogerheide, *et al*., 1982; D.E.F., 1997; Bennett, 1996; Redger, 1978).

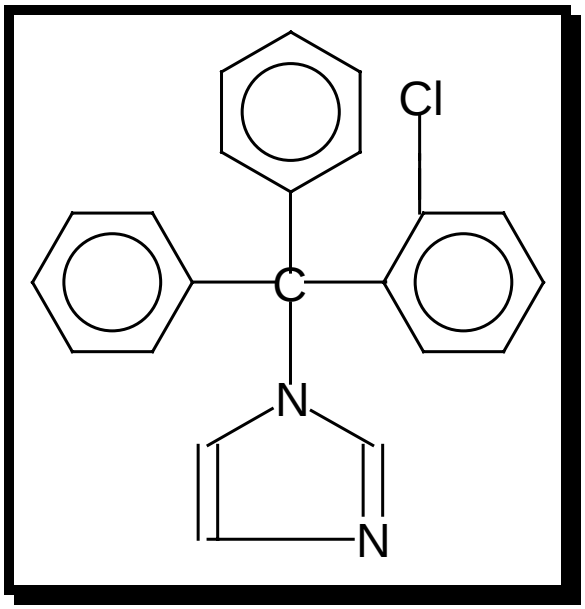
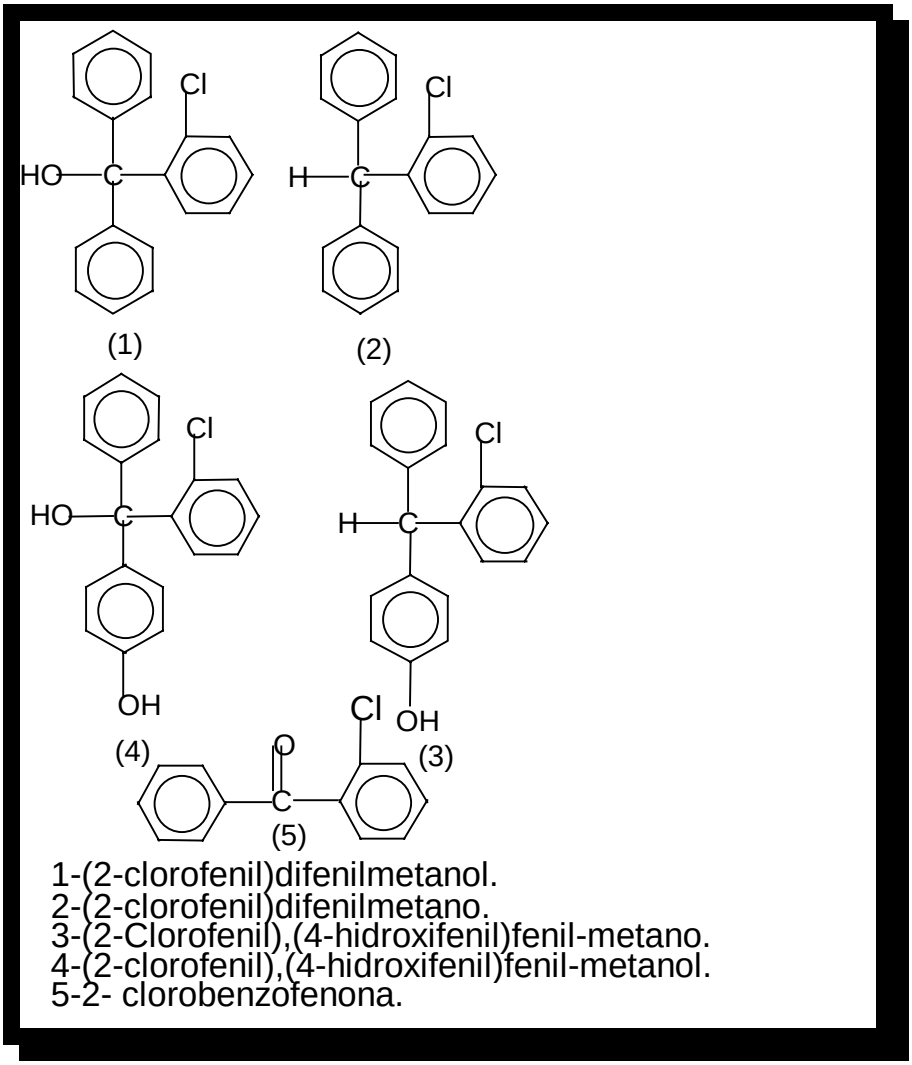


Figura 1.1: Estrutura molecular do clotrimazol.

Após administração tópica ou oral, clotrimazol sofre rápida biotransformação em metabólitos inativos. (Hoogerheide & Wika, 1982), mostram os 5 metabólitos isolados do clotrimazol obtidos em urina e bile de ratos, cujas estruturas são mostradas no Esquema 1.1.



Esquema 1.1: Metabólitos gerados na biotransformação de clotrimazol (Hoogerheide & Wika, 1982) .

Vasto estudo clínico empregando administração oral de clotrimazol fornecem dados sistemáticos sobre a farmacocinética da substância no organismo humano. Estudos analíticos apresentados por (Hoogerheide & Wika, 1982), mostraram que baixos níveis de (4µg.mL^{-1}) de clotrimazol

podem ser detectados em soro 20 minutos após sua administração.

Na forma de creme tem sido observado que clotrimazol penetra 2.000 µm na epiderme, enquanto que, a substância original ou seus metabólitos não são encontrados no soro quando administrado com o referido veículo. Uma pequena quantidade de material (cerca de 0,4%), foi detectado em urina após um período de 5 dias. Em um estudos similar, (Holt, 1976), usando um ensaio microbiológico, obteve êxito com uma detecção de 0,01 $\mu g.mL^{-1}$. Após um período de 30 dias pós tratamento com clotrimazol em creme, Holt observou a completa ausência da droga em soro e urina analisados. (Wallace*, et al*., 1977), observaram que 24 horas após um tratamento de 10 dias com preparação tópica de clotrimazol, os níveis do fármaco presentes no tecido epitelial alcançavam valores máximos de 2 $\mu g.mg^{-1}$; com diminuição de cerca de 0,4 $\mu g.mg^{-1}$ após 4 dias.

Em estudos utilizando-se tabletes vaginais de 100 mg, (Hoogerheide & Wika, 1982), relatam detecção em níveis de 0,03 $\mu g.mL^{-1}$ após 24 horas de admistração.

1.3.3 - MICONAZOL.

1.3.3.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS.

O nitrato de miconazol 1 -[2-(2,4-diclorofenil)-2-{(2,4-diclorofenil)metoxi}etil] - 1H - imidazol, cuja estrutura é mostrada na Figura 1.2, é um agente antifúngico de primeira geração dotado de um grupamento azólico que inibe a desmetilação do carbono 14 do esterol na membrana celular do fungo, inibindo conseqüentemente, a biossíntese normal deste esterol e alterando a composição bioquímica da parede celular (Bennett,.1996)

Miconazol apresenta-se na forma de um pó branco e cristalino, inodoro; fracamente solúvel em água e éter; prontamente solúvel em álcool metílico, clorofórmio, isopropanol, propileno glicol, dimetil sulfóxido e dimetilformamida. Possui massa molar igual a 479,1 g. mol^{-1}.

Miconazol encontra-se disponível comercialmente em formulações farmacêuticas denominadas por: daktarin, ginedak, ginodex, ginotarin, gini-daktarin, micofim, micoless, vodol, dentre outras. O fungicida pode ser encontrado na forma de loção, creme, tabletes, spray, óvulos, solução intravenosa etc. (D.E.F., 1997).

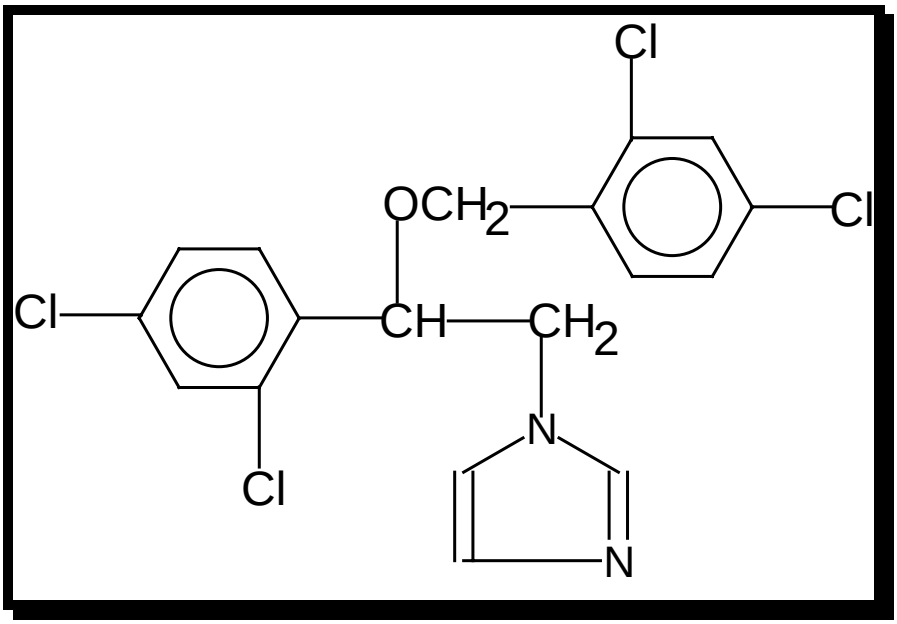


Figura 1.2: Estrutura molecular do miconazol.

O espectro antifúngico do miconazol é amplo e não se limita a tratamento de micoses superficiais, mas também de possível aplicação em micoses sistêmicas e profundas.

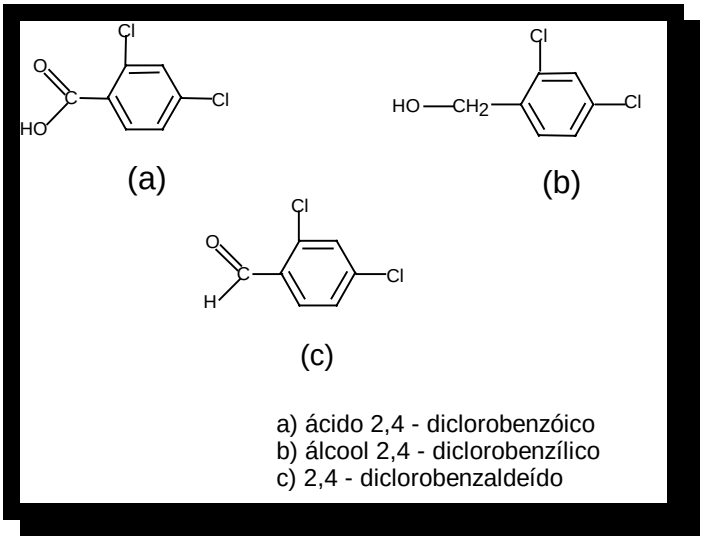
Miconazol é parcialmente absorvido pelo trato gastrintestinal e após administração oral biodisponível em níveis de 25 a 30% de sua posologia. Após 15 minutos de infusão intravenosa de 522mg de miconazol em humanos, concentração plasmática encontrada foi da ordem de 2 a 9 $\mu g.mL^{-1}$ apresentando declínio para 0,1 a 0,2 $\mu g.mL^{-1}$ após 8 horas. Miconazol é largamente distribuído nos tecidos. Penetra facilmente nos ossos, articulações e tecido pulmonar e apresenta baixa penetração nos fluidos cerebrais. As concentrações no sistema nervoso central variam de 3% a cerca de 50% da concentração plasmática. Cerca de 50% da droga se liga às proteínas do plasma.

Miconazol é extensamente metabolizado e menos de 1% é excretado na urina na forma original (Silva, 1985).

Na forma intravenosa miconazol pode ser administrado em 3 dosagens diárias de 200 mL em cloreto de sódio a 0,9% ou com dextrose a 5% contendo 1,2 a 2,4g do fármaco (em adultos) e 20 a 40mg.kg^{-1} para crianças.

Estudos envolvendo a degradação e isolamento de produtos de hidrólise de miconazol em etanol foram realizados por (Oyler, *et al*., 1991), os quais demonstraram a obtenção de 10 metabólitos.

Estruturas de alguns produtos de hidrólise do fármaco são mostrados no esquema 1.2.



Esquema 1.2: Produtos de hidrólise do miconazol (Oyler, *et al*., 1991).

A administração de miconazol deve ser rigorosamente controlada pois pode apresentar fortes efeitos adversos em níveis hematológicos, tais como, anemia, trombocitose,

hiperlipemia, e náuseas, vômitos, diarrérias à nível gast0rointestinal, além disso, índices de tromboflebite muito frequente, assim como, imunossupressão e outros efeitos colaterais (Silva, 1985; Heel, *et al*., 1980).

1.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANALÍSE DE CLOTRIMAZOL E MICONAZOL.

1.4.1 - CLOTRIMAZOL.

1.4.1.1 - DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CLOTRIMAZOL

Os principais métodos analíticos encontrados na literatura para análise de clotrimazol na forma pura e em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos serão resumidos a seguir.

A determinação indireta de clotrimazol através do método titulométrico é descrito por (Abdel – Khalek, 1993). O método consiste na reação de clotrimazol com N-bromossucinamida em excesso e posterior titulação de retorno com iodo.

Titulação espectrofotométrica de clotrimazol em sistema bifásico lauril sulfato de sódio e ácido sulfúrico com clorofórmio, foi realizada por (Volkmann, 1981). Os autores utilizam solução de N,N - dimetil - p - (m - tolilazo) anilina como indicador do ponto final, trabalhando no comprimento de onda de 570 nm. O mesmo autor, em outro trabalho (*ibid,* 1983), analisa clotrimazol em uma amostra de Canesten através de titulação espectrofotométrica de clotrimazol com ácido pícrico, em uma mistura bifásica de água, ácido sulfúrico e clorofórmio ou dicloroetano, utilizando também o N,N - dimetil - p - (m - tolilazo) anilina como indicador. Redescobrimento do fármaco ao redor de 98 - 102% foi obtido após análise do ponto final a 630 nm das amostras extraídas de tabletes e solução tópica.

(Ibrahim, *et al*., 1994), propuseram dois métodos para determinação de clotrimazol. O primeiro método consiste na titulação volumétrica do fármaco com tetrafenilborato utilizando como indicador o amarelo de metanila. O segundo procedimento baseia-se em um método espectrofotométrico utilizando-se uma reação de complexação da droga com o amarelo de metanila em pH 1,2. A absorbância do complexo colorido é medida em um comprimento de onda máximo ($\lambda_{max.}$) de 395 nm, segundo a lei de Beer na faixa de concentração entre 2 a 24 mg de clotrimazol e apresentando níveis de descobrimento na ordem de 100%.

(Massaccesi, 1986), reporta a titulação volumétrica de clotrimazol em sistema bifásico com diclorometano e utilização de azul de indofenol como indicador e sulfato dodecil de sódio como agente titulante. O método é aplicado na análise de clotrimazol em tabletes vaginais, supositórios, cremes e loções, atingindo descobrimento de 98% e coeficiente de variação de 0,3%.

A determinação espectrofotométrica em creme, tabletes e loções é também descrita por (Chainani, *et al*., 1981), através da complexação do fármaco com o corante azul de bromotimol em meio tamponado pH 3,4. O complexo amarelo, após extração, é analisado espectrofotometricamente em $\lambda_{máximo}$= 410 nm, obtendo-se uma relação linear entre absorbância e concentração na faixa de 2 - 20µg.mL^{-1}.

A aplicação do método espectrofotométrico foi proposto por (Dol & Altesor, 1988), para determinação de clotrimazol utilizando-se banda de absorção máxima entre 220 a 300 nm. Após extração do princípio

ativo em pó, tabletes vaginais, cremes e loções. A quantificação da droga na região UV é realizada através da derivada de ordem zero e segunda derivada. A mesma banda de absorção de clotrimazol foi ainda utilizada por (Prassad, *et al*., 1997), para determinação do fungicida em tabletes na presença de 0,01mol.L^{-1} de hidróxido de sódio.

(Bedair, *et al*., 1989), descreveram também um método espectrofotométrico utlizando espectros de primeira e segunda derivada para determinação indireta de clotrimazol, monitorando seu produto de hidrólise, obtido após secura da amostra em banho maria e posterior hidrólise do resíduo a 90^{o}C na presença de ácido clorídrico. O método apresenta excelente linearidade no intervalo de concentração entre 2 a 10 µg.mL^{-1}. O método permite determinação de clotrimazol em creme com coeficiente de variação de 1,93% entre as medidas.

Um método proposto por (Osama & Pakinaz, 1993), é reportado para determinação de clotrimazol através de formação de par iônico com o corante alaranjado de metila na presença de ácido cítrico 0,1mol.L^{-1}. O complexo é extraído com clorofórmio e quantificado a 422 nm, mostrando excelente linearidade na faixa de concentração entre 2 a 14 µg.mL^{-1} de clotrimazol. O método proposto permitiu redescobrimento de 99,4% ± 0,34 e limite de detecção de 0,05µg.mL^{-1}.

Além dos métodos volumétricos e espectrofotométricos, técnicas cromatográficas têm sido bastante utilizadas para a quantificação de clotrimazol.

(Cavrine, *et al*., 1982), têm utilizado a aplicação da técnica de cromatografia líquida (HPLC)

para determinação de clotrimazol em tabletes, cremes, loções e pó. O método envolve etapas de extração com metanol e eluição com misturas de metanol e fosfato diácido de amônio (85:15), em coluna de sílica gel octadecil silanizada e detecção na região UV de 230 nm. O desvio padrão relativo encontrado entre as medidas foi de 0,5 a 1,32%.

(Hoogerheide, *et al*., 1981), também propuseram um método para determinar clotrimazol e seu produto de hidrólise ácida [(o-clorofenil) difenil- metanol], em tabletes, solução tópica e cremes, utilizando-se HPLC com detecção UV em 254nm. As soluções hidrolisadas foram obtidas após aquecimento do fármaco em ácido clorídrico a temperatura entre 75 a 95^{o}C.

HPLC com detecção na região de ($\lambda_{máximo}$= 230nm) foi também utilizada por (Stuber & Mueller, 1984), para analise de clotrimazol em cremes. O método utiliza a separação isocrática do fármaco a temperatura de 40^{o}C em mistura de metanol/água (3:1 e 1:1) e ácido fosfórico e mistura de metanol contendo 0,5% de ácido fosfórico como eluente.

A aplicação de HPLC para testar o grau de pureza de clotrimazol também é descrito por (Suzuki, *et al*., 1992). A análise da amostra pura ou de seu principal produto de hidrólise foi investigado em acetonitrila - água (65:35) contendo trifenilmetanol como solução padrão. O método permite obtenção de uma curva de calibração linear entre 5 a 60 µg.mL^{-1} de clotrimazol e redescobrimento próximo a 100%.

(Wang, *et al*., 1996), têm também demonstrado o uso de HPLC com detecção na região UV para quantificação de clotrimazol utilizando-se mistura de metanol/tampão acetato pH 3,6 e brometo de tetrabutilamônio (55:45). O método apresenta níveis de redescobrimento na ordem de 99,12% e desvio padrão relativo de 1,15% entre as medidas.

A aplicação das técnicas eletroquímicas na análise de clotrimazol é muito pouco explorada.

O único trabalho potenciométrico encontrado na literatura (Karandeeva, *et al*., 1998), relatam a utilização de um eletrodo íon-seletivo construído com membrana plástica à base de policloreto de vinila (PVC) e celulose hidratada (CH) e o ânion do ácido 12 - fosfomolibídico como ionôforo. O complexo formado entre clotrimazol e o ionôforo, possibilitou a obtenção de curvas Nernstianas (Ewing, 1972) na faixa de concentração entre $2x10^{-5}$ a $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ (membrana de PVC) e $3,1x10^{-5}$ a $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ (CH) com limite de detecção de $5x10^{-6}$ e $8,3x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$, respectivamente. O tempo de vida do eletrodo íon-seletivo foi estimado entre 65 - 90 dias.

A utilização de polarografia de corrente contínua para monitoramento indireto de clotrimazol é descrita por (Mpasi, *et al.*, 1987). Para estabelecer a constante de estabilidade (β n) dos complexos formados entre clotrimazol e maganês (II), ferro(II), cobalto(II) e zinco(II) os autores mostram que a complexação entre o fármaco e os íons metálicos segue a seguinte proporção: maganês e ferro (1:1); e zinco e cobalto (1:4) e (1:6), respectivamente. Os estudos mostram apenas que as ondas polarográficas dos referidos

metais deslocam-se para potenciais mais negativos quando complexados com o fármaco.

O comportamento polarográfico de clotrimazol também é descrito por (Fijalek, *et al*., 1992), através da técnica oscilopolarográfica. Os autores mostram que o fármaco apresenta onda de redução e pode ser monitorado polarograficamente. Entretanto, nenhuma proposta para redução eletroquímica ou aplicação do método em formulações farmacêuticas é descrito.

1.4.2 - MICONAZOL.

1.4.2.1 - DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE MICONAZOL

O desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar miconazol nas mais diversas matrizes têm sido extensivamente investigado por diversos pesquisadores, uma vez que a administração e dosagem do fármaco requer controle rigoroso, devido a seus fortes efeitos colaterais. Os principais métodos encontrados na literatura são descritos abaixo.

Titulação volumetrica de miconazol, utilizando-se como indicador o azul de indofenol em diclorometano e como titulante solução aquosa de sulfato sódico de dodecila são descrito por (Massaccesi, 1986). O método descrito permite a quantificação de miconazol em tabletes, supositórios vaginais, cremes e loções com recuperação de 100% e desvio padrão relativo de 0,30 - 0,35%.

(Chen, 1993), tem demonstrado a aplicação da técnica espectrofotométrica na quantificação de miconazol através do uso da segunda derivada e monitoramento da banda de absorção do fármaco em ($\lambda_{max.}$= 228 - 233 nm). A média de redescobrimento obtida foi de 100% e desvio padrão relativo de 0,2%.

A complexação entre miconazol e tiocianato de cobalto é descrita por (Lemli & Knockaert, 1983). A reação ocorre através da formação de par-iônico do substrato com o tiocianato, após dissolução do fármaco em diclorometano e posterior tratamento com sulfato de sódio e ácido

clorídrico. Após extração, o cromóforo final apresenta banda de absorção na região visível e pode ser monitorado em λ_{maxima}= 625nm. A correlação entre absorbância *vs* concentração apresenta curva linear na faixa entre 0 a 400 $\mu g.mL^{-1}$.

Um outro método espectrofotométrico para determinação de miconazol é descrita por (Cavrini, *et al*., 1981). Os autores mostram a formação de um complexo de cor amarela após interação da droga com o corante verde de bromocresol, com máxima absorção (λ_{max}= 424nm) quando extraído com clorofórmio em meio ácido. Uma resposta linear foi obtida na faixa de concentração entre 3 a 13 $\mu g.mL^{-1}$ com absortividade molar de $1,845x10^{4}$ $mol.L^{-1}.cm^{-1}$.

A utilização das técnicas cromatográficas no monitoramento de miconazol têm sido bastante explorada.

(Szathmary & Luhmann, 1988), determinaram miconazol em plasma 24 h após sua administração na forma de óvulos. A extração do princípio ativo foi realizada com n-heptano e álcool isoamílico (98,5:15 V/V) obtendo-se uma curva de calibração linear no intervalo de concentração entre 0,25 a 250 $ng.mL^{-1}$. O método apresenta precisão entre 95,6 - 107,2% com coeficiente de variação na ordem de 2,4 a 22,2% entre as medidas.

A utilização da técnica cromatográfica de HPLC acoplada a espectroscopia de massa foi investigada por (Neill, *et al*., 1991), com o intuito de identificar miconazol em conjunto com outras 120 drogas de interesse clínico. Embora o método mostre a possibilidade de identificação de miconazol, os autores não reportam sua aplicação.

A utilização de cromatografia na separação de miconazol é descrita por (Quian, *et al*., 1991). Misturas de n-hexano, clorofórmio, metanol e dietilformamida (42:21:13:5) foram utilizadas pelos autores para separação da droga identificada através de densitometria a 220 nm. O método mostrou curva de calibração com relação linear entre 12 a 36 µg.

Método para determinação de miconazol em cremes e supositórios foi desenvolvido por (Tyler & Genzale, 1989), através de HPLC com detecção na região de λ_{maxima}= 214nm. A amostra em etanol é diluida em solução aquosa de cianeto de metila (1:1) e eluída através da fase móvel contendo 55% de cianeto de metila e solução tampão de trietilamônio. O redescobrimento do fármaco em cremes e supositórios utilizando o método foi 99,7 e 98,8%, respectivamente.

(Oyler, *et al*., 1991), isolaram e caracterizaram os produtos de degradação do miconazol em solução hidroetanólica (1:9) sob aquecimento de 77^{o}C por 27 horas e vigorosa agitação. Alíquotas foram periodicamente removidas do reator e analisadas por HPLC.

Miconazol foi ainda analisado através de HPLC em plasma humano por (Kobylinska, *et al*., 1996), após administração oral do Daktarin ou da forma pura do fármaco em 12 voluntários com idades compreendidas entre 22 - 40 anos. Utilizando tempo de retenção de 7,5 minutos, curva analítica foi obtida na faixa de concentração entre 10 a 1.000 ng.mL^{-1}. Interpolação das leituras obtidas das amostras de Daktarin na curva padrão registrou redescobrimento de 58,82 ±4,83%.

O uso de HPLC na determinação de miconazol em secreção vaginal foi investigado por (Krzysztof, *et al*., 1988). O método permite a obtenção de uma curva de calibração entre 0,20 a 200 $\mu g.mL^{-1}$ e coeficiente de variação entre as medidas na faixa de 3,2 a 9,4%. A aplicação do método em formulações farmacêuticas e fluido biológico envolveu a prévia extração do principío ativo com clorofórmio.

(Turner & Warnock, 1982), quantificaram miconazol em saliva humana, utilizando HPLC com fase reversa. Metanol a 77% e EDTA a uma razão de fluxo de $1,5mL.min^{-1}$ e detecção UV na faixa de concentração entre 3,5 a 40 $mg.L^{-1}$ e 5,3 a 51,6 $mg.L^{-1}$ foram utilizados como melhores condições experimentais. O método apresenta um limite de detecção de 0,5 $mg.L^{-1}$.

A determinação de miconazol em soro humano é investigada através de HPLC por (Hosotsubo, 1988). Sistema de fase estacionária a base de octadecilsilano e fase móvel contendo solução tampão acetato pH 7,4 e cianeto de metila foram utilizados para quantificação da droga. A precisão do método foi de 3,21% para $0,5mg.L^{-1}$ e 0,85% para $2,0mg.L^{-1}$ com limite de detecção de 0,1 $mg.L^{-1}$.

Em plasma de coelho, (Zhang & Deng, 1992), descrevem na literatura alguns estudos sobre identificação de miconazol. A droga é extraída com cianeto de metila e determinada por HPLC, utilizando como fase móvel metanol e dihidrogenofosfato de amônio (84:16) e detecção a 230 nm. O limite de detecção calculado foi de 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ e redescobrimento médio de 96,5%.

O único estudo baseado na técnica eletroquímica encontrado para miconazol na literatura (Willens, *et al*., 1981), mostra o uso da técnica polarográfica de corrente contínua na caracterização da interação do miconazol com os íons metálicos maganês (II), ferro (II), cobalto (II) e zinco a fim de estabelecer a constante de estabilidade (βn) dos complexos miconazol - íon metálico. O estudo foi fundamentado no deslocamento seletivo do nível de energia livre do elétron por complexação, resultando em um deslocamento das curvas voltamétricas corrente - potencial. O presente trabalho não reporta determinação e nem aplicação para o fármaco.

Deste modo, a análise dos principais métodos analíticos utilizados para determinação de clotrimazol e miconazol encontrados na literatura mostram diversas metodologias baseadas, principalmente, nas técnicas titulométricas, espectrofotométricas e cromatográficas. De um modo geral, os métodos disponíveis requerem altas concentrações, como no caso das titulações volumétricas, sofisticados equipamentos, tais como no caso de HPLC, ou são complicados devido a um grande número de etapas de extração, como no caso dos métodos espectrofotométricos. Adicionalmente, a análise espectrofotométrica na região do UV utilizada para análise destes fungicidas é limitada a uma baixa absortividade e ausência de bandas características. Os métodos espectrofotométricos têm apresentado ainda longas etapas de reação e curta estabilidade dos complexos formados e baixa sensibilidade dos complexos extraídos com solventes orgânicos.

Deste modo, considerando que a aplicação de técnicas eletroquímicas na análise de compostos farmacêuticos têm ganhado notoriedade por fornecer métodos analíticos confiáveis, sensíveis e de baixo custo é de nosso interesse investigar o comportamento eletroquímico do clotrimazol e do miconazol utilizado-se técnicas voltamétricas.

1.5 - OBJETIVO.

Em virtude da inexistência de estudos sobre o comportamento eletroquímico dos agentes antifúngicos clotrimazol e miconazol, assim como, ausência de métodos polarográficos e voltamétricos modernos aplicados para determinação destes fármacos em baixos níveis de concentração é de nosso interesse investigar o comportamento voltamétrico desses fármacos sobre eletrodo de mercúrio, visando estabelecer um mecanismo de redução para esses compostos em meio aquoso.

Considerando que os métodos eletroanalíticos normalmente são rápidos, sensíveis, seletivos e econômicos pretende-se, a seguir, investigar sua aplicação na determinação destes compostos utilizando-se a técnica polarográfica de pulso diferencial e monitoramento de traços de ambos os fármacos através da técnica voltamétrica de redissolução catódica.

Finalmente, uma vez estabelecido as melhores condições experimentais para monitoramento destes compostos em meio aquoso é de nosso interesse investigar a possibilidade de aplicação dos métodos eletroanalíticos mais eficientes para determinação de clotrimazol e miconazol em formulações farmacêuticas visando contribuir e/ou complementar os métodos disponíveis na literatura.

CAPÍTULO

II

EXPERIMENTAL.

2.0 - PARTE EXPERIMENTAL.

2.1 - EQUIPAMENTOS.

As medidas polarográficas de pulso diferencial (PPD), foram efetuadas em um polarógrafo da marca Metrohm, modelo E 506 com interface da Microquímica (MQI 12/8PCC). O sistema é acoplado a um sistema de eletrodos, também fabricados pela Metrohm, modelo 663 VA, com três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 $mol.L^{-1}$); um eletrodo auxiliar de grafite e um eletrodo de trabalho de mercúrio usado no modo DME (eletrodo gotejador de mercúrio) e no modo HMDE (eletrodo de gota pendente de mercúrio). Foi também utilizado um polarógrafo modelo 264 A, acoplado a um registrador EG&G Parck, modelo RE 0091 e um gotejador automático 303 A da EG&G Parck com três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 $mol.L^{-1}$), um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de trabalho (capilar de mercúrio usado no modo DME).

As medidas de pH de todas as soluções investigadas foram realizadas com um pHmetro da marca Micronal, modelo B222, equipado com um eletrodo combinado de vidro, após prévia calibração. As medidas de pH apresentadas ao longo do presente trabalho são aparentes, uma vez que as soluções foram compostas de uma mistura tampão/metanol.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro GBC 911 A UV-visível Spectrophotometers, usando cubetas de quartzo de 1 cm.

Os estudos de estabilidade térmica em solução foram realizadas em banho termostático Nova Técnica Pt - 100.

2.2 - REAGENTES E PROCEDÊNCIA.

Os reagentes utilizados foram: ácido acético (Merck); ácido bórico (Sigma); ácido fosfórico (Merck); hidróxido de sódio (Merck); fosfato diácido de sódio (Sigma); fosfato ácido de sódio (Sigma); mercúrio metálico (Merck); metanol (Merck); imidazol (Sigma); triton X-100 (Merck); acetato de sódio (Sigma); reactive red 120 (Sigma); ácido cloridrico (Merck); clorofórmio (Merck); ácido cítrico (Merck); citrato de sódio (Merck); verde de bromocresol (Sigma); alaranjado de metila (Sigma), os compostos clotrimazol, nitrato de miconazol e tinidazol, com comprovado grau de pureza, gentilmente cedidos pelo laboratório Bayer S/A. Foram ainda analisadas as amostras de Canesten (Bayer S.A), Dermobene (Legrand), Daktarin (Janssen Farmacêutica) e Vodol (Andrômaco).

2.3 - SOLUÇÕES.

O sistema de solução tampão utilizado nos experimentos polarográficos de pulso diferencial no intervalo de pH de 2 a 12 foi Britton - Robinson $4x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ e nos experimentos voltamétricos de redissolução catódica foi B-R $2x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$. O Tampão B-R foi obtido pela mistura de soluções de ácido orto fosfórico, ácido acético e ácido bórico com ajustes nos valores de pH com adição de hidróxido de sódio 1 $mol.L^{-1}$. Soluções tampão fosfato $4x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ e $2x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ foram ainda utilizadas no intervalo de $6 \leq pH \leq 8$ obtidas pela mistura de fosfato ácido de sódio e fosfato diácido de sódio. Em valores de pH< 2 utilizaram-se soluções de ácido clorídrico/cloreto de potássio 0,2 $mol.L^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada em sistema milli-Q (milipore).

Soluções estoque de $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol e miconazol foram preparadas através da dissolução da amostra pura e seca em metanol absoluto. Soluções estoque de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol e miconazol foram utilizadas nos estudos voltamétricos de redissolução catódica dos fármacos. Preparou-se ainda, solução estoque $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ do corante reactive red 120 (RR120) através da dissolução direta do sal em água desmineralizada. Solução metanólica de imidazol $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ foi obtida pela dissolução do composto puro e seco em metanol.

As soluções de trabalho foram sempre preparadas por transferência de alíquotas das soluções estoque dos substratos em 20 mL de eletrólito suporte contendo em média 40% de metanol na célula eletroquímica. Todas as soluções foram previamente deaeradas, através de borbulhamento de gás nitrogênio por 10 minutos. A seguir, as medidas polarográficas de pulso diferencial foram realizadas utilizando-se tempo de gotejamento controlado mecanicamente em 0,8 segundos e amplitude de pulso mantida constante em 50 mV.

Tendo em vista que os fármacos acima descritos são muito pouco solúveis em água e prontamente solúveis em solventes orgânicos como metanol, tornou-se necessária a adição de metanol no eletrólito suporte; deste modo, os valores de pH utilizados neste trabalho são valores aparentes de pH. Novos valores de pH obtidos em meio aquo-orgânico são mostrados na Tabela 2.1 e 2.2 para solução tampão B-R e fosfato, respectivamente. Os dados apresentados são correspondentes a um volume final de 20 mL na célula eletroquímica.

Tabela 2.1: Efeito da presença de metanol sobre o valor final do pH das soluções tampão B-R utilizadas como eletrólito suporte.

pH sistema tamponante B-R	pH (aparente) adição de 40% de metanol
2,0	2,2
3,0	3,5
4,0	4,4
5,0	5,4
6,0	6,6
7,0	7,6
8,0	8,7
9,0	9,7
10,0	10,8
11,0	11,9
12,0	12,9

Tabela 2.2: Efeito da adição de metanol sobre o valor final do pH das soluções de tampão fosfato utilizadas como eletrólito suporte.

pH Solução tampão fosfato	pH (aparente) adição de 40% de metanol.
6,3	7,3
6,9	7,6
7,4	8,0
7,9	8,4
8,3	9,2

2.4 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.

2.4.1 - DERIVATIZAÇÃO DE CLOTRIMAZOL COM O CORANTE REACTIVE RED 120.

A reação de derivatização do clotrimazol com o corante RR 120 foi realizada diretamente na célula voltamétrica após adição de alíquotas previamente calculadas do cromóforo em volume apropriado de solução tampão B-R pH 2,0. Após registro das curvas voltamétricas da solução correspondente ao branco, volumes previamente calculados de uma solução padrão de $1x10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol foram adicionados à célula.

2.4.2 - QUANTIFICAÇÃO DE CLOTRIMAZOL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS ATRAVÉS DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

O método espectrofotométrico realizado com o objetivo de comparar os resultados obtidos através do estudo polarográfico de pulso diferencial e voltamétrico de redissolução catódica para quantificação de clotrimazol em formulações farmacêuticas, foram realizados segundo o procedimento descrito por (Osama & Pakinaz, 1993).

Os autores monitoram clotrimazol através da formação de par-iônico do fármaco com o corante alaranjado de metila obtido em solução tampão de ácido cítrico 0,1 $mol. L^{-1}$ e posterior extração em clorofórmio.

A solução padrão de clotrimazol foi obtida após pesagem de 25 mg do fármaco puro e dissolução em metanol

absoluto em um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, alíquotas da solução estoque de clotrimazol são diluídas em uma série de soluções com concentração final entre 50 a 350 $\mu g.mL^{-1}$.

O procedimento para obtenção do complexo entre clotrimazol e o corante alaranjado de metila é realizado em um funil de separação de 100 mL onde se adicionam 3 mL da solução tampão de ácido cítrico 0,1 $mol.L^{-1}$, 2 mL da solução 0,1% do corante alaranjado de metila seguido de 1 mL das soluções de trabalho de clotrimazol. Após vigorosa agitação durante 5 min., adicionou-se clorofórmio e o complexo formado e extraído é coletado em um balão volumétrico de 25 mL. O produto foi submetido à análise espectrofotométrica utilizando-se comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{máxima}$) 422 nm.

2.4.3 - QUANTIFICAÇÃO DE MICONAZOL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS ATRAVÉS DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

A análise de miconazol em formulações farmacêuticas foi realizado segundo o procedimento descrito por (Cavrine, *et al*., 1981), com o objetivo de comparar os resultados obtidos através da técnica voltamétrica de redissolução catódica.

Os autores monitoram espectrofotometricamente o miconazol após sua interação com o corante verde de bromocresol obtido em meio tamponado em solução de citrato de sódio e ácido clorídrico pH 3,0. O complexo obtido é extraído em clorofórmio e monitorado em

comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{máxima}$) = 424 nm.

Uma solução estoque de miconazol foi obtida após dissolução de 20,0 mg do fármaco na forma pura em clorofórmio e diluída em um frasco volumétrico de 20 mL. Em seguida, alíquotas da solução estoque foram diluídas em balões volumétricos a fim de obter soluções padrão cujas concentrações final seriam na faixa entre 6 a 40 $\mu g.mL^{-1}$.

O procedimento experimental para obtenção do complexo foi realizado em um funil de separação de 50 mL onde foram adicionados 5 mL de solução padrão de miconazol, seguida de 15 mL de solução $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante verde de bromocresol e 5 mL de solução tampão pH 3,0. Após vigorosa agitação, o complexo foi extraído em 2 alíquotas de 2 e 3 mL de clorofórmio e coletado em um balão volumétrico de 10 mL.

2.4.4 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS.

2.4.4.1 - AMOSTRAS COMERCIAIS EM SOLUÇÃO.

Na aplicação dos métodos desenvolvidos para formulações farmacêuticas comerciais contendo clotrimazol e miconazol como princípio ativo utilizou-se solução ou spray, denominadas de Canesten, Dermobene e Vodol; soluções estoque foram obtidas após evaporação do solvente através da passagem de ar comprimido, seguida da dissolução do resíduo final em metanol absoluto.

A formulação farmacêutica denominada de Dermobene é constituída, além do princípio ativo, com os excipientes metilparabeno, propilparabeno, polietilenoglicol, álcol etílico e

ácido cítrico. A amostra comercial de Canesten é constituída pela dissolução do princípio ativo em etanol. A amostra farmacêutica comercializada como o nome de Daktarin possui óxido de zinco, talco, e dióxido de silício além do fármaco. A formulação comercializada com o nome de Vodol não especifica os constituintes utilizados como solventes e/ou conservantes.

2.4.4.2 - AMOSTRA COMERCIAL SÓLIDA.

A formulação farmacêutica denominada de Daktarin, disponível comercialmente sob a forma de pó, foi analisada diretamente, sem prévio tratamento.

CAPÍTULO

III

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE CLOTRIMAZOL.

3.1.1 - ESTUDO POLAROGRÁFICO DE CLOTRIMAZOL.

A redução polarográfica de clotrimazol sobre eletrodo gotejante de mercúrio foi inicialmente investigada em solução tampão B-R em ampla faixa de pH no intervalo de 2 a 12, utilizando-se a técnica polarográfica de pulso diferencial. Os polarogramas obtidos para concentração de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do fármaco exibem ondas de redução em meio ácido pH $\leq$ 3, em meio neutro e em meio alcalino, conforme é mostrado nas Figuras 3.1 3.2 e 3.3, respectivamente.

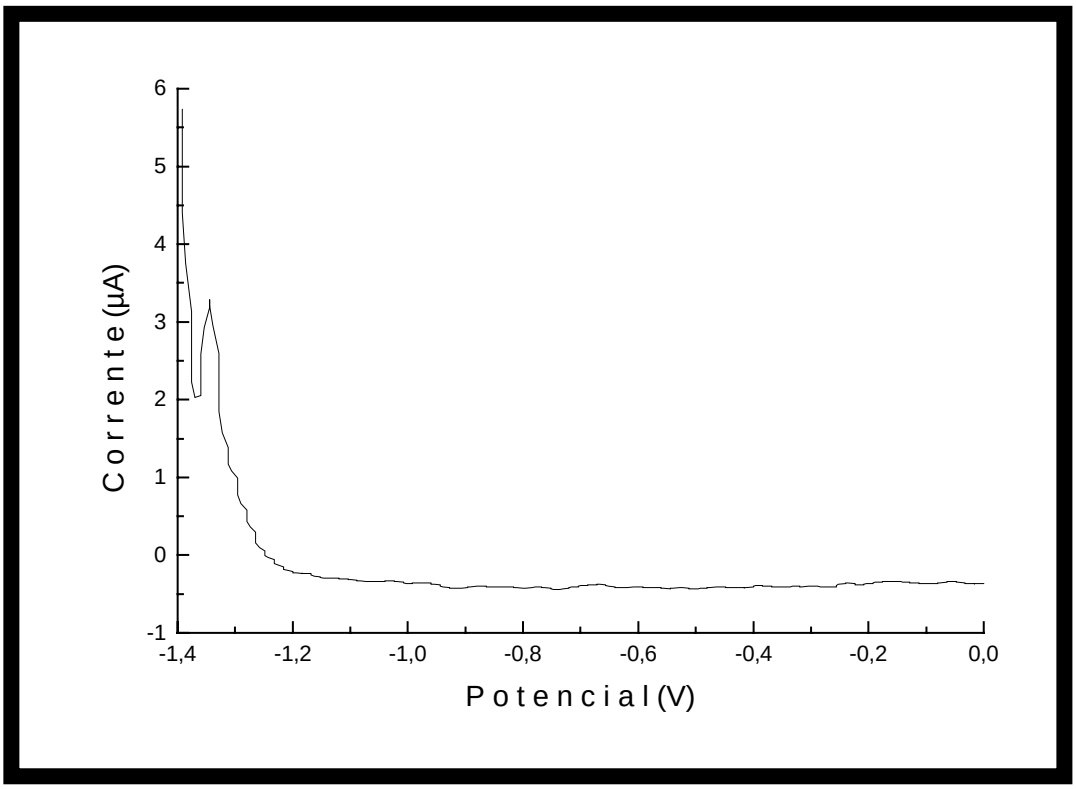


Figura 3.1: Polarograma de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0.

Em meio fortemente ácido (pH 2,0), os polarogramas mostram um pico de redução em potencial de -1,35 V, porém as ondas são mal definidas devido à proximidade da descarga do eletrólito suporte. Este comportamento torna o monitoramento do fármaco inviável neste valor de pH.

Em valores de $6,0 \leq pH < 8,0$ clotrimazol ($5x10^{-4}$ mol. L^{-1}) exibe ondas de redução somente em solução tampão fosfato, conforme mostra a Figura 3.2. Em valores de pH 6,9, clotrimazol é reduzido em potencial de -1,66 V, cujo valor é ligeiramente mais negativo do que aquele observado em meio ácido. A onda polarográfica é caracterizada por

um valor de largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) de 83,7 mV, com características assimétricas, isto é, os valores de metade da largura de pico a meia altura mostram valores diferentes em cada lado do polarograma. Valores de ($W_{1/4}$) = 23,2 mV são obtidos no lado mais negativo do pico de redução e ($W_{1/4}$) = 60,5 mV no lado menos negativo. O lado mais negativo de potencial na curva polarográfica apresenta ainda, deformação na linha base em relação ao eletrólito suporte. Este comportamento pode ser indicativo de que o processo eletródico pode estar complicado por fenômeno de adsorção.

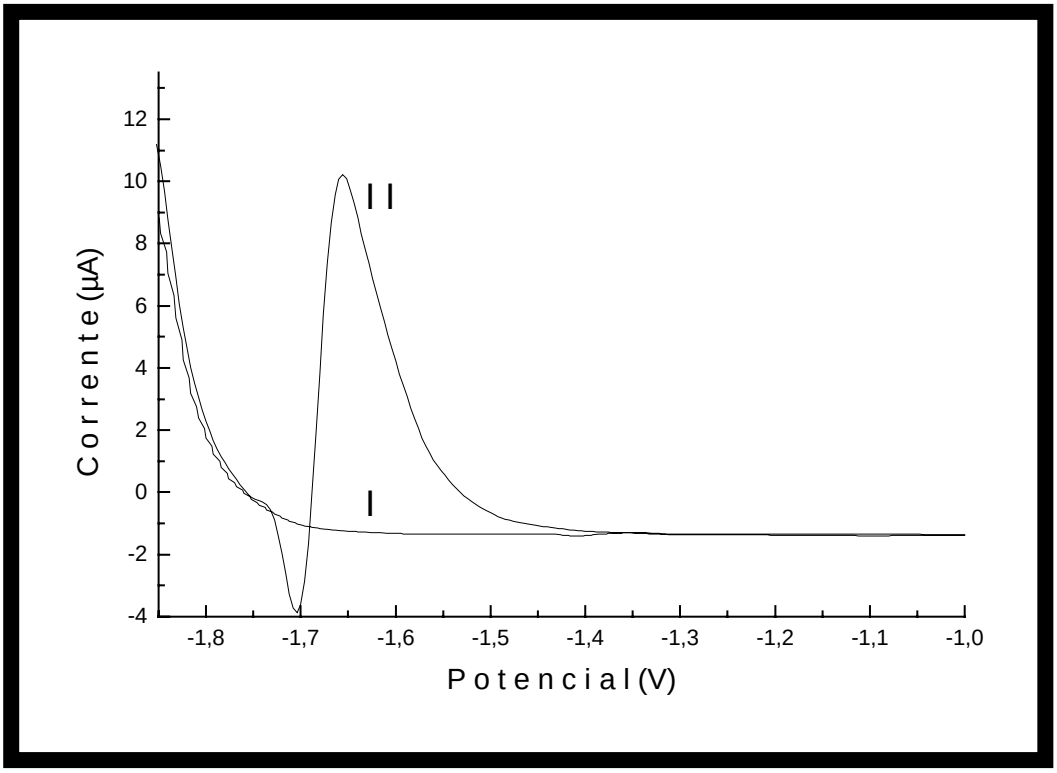


Figura 3.2: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 (curva II). Curva I= eletrólito suporte.

Em meio alcalino, os polarogramas obtidos para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol mostram um pico de redução em potencial de -1,52 V, como mostra a Figura 3.3. Embora a onda de redução da droga apresente-se bem definida em relação à descarga do eletrólito suporte, a corrente de pico é nitidamente inferior àquela obtida em meio neutro.

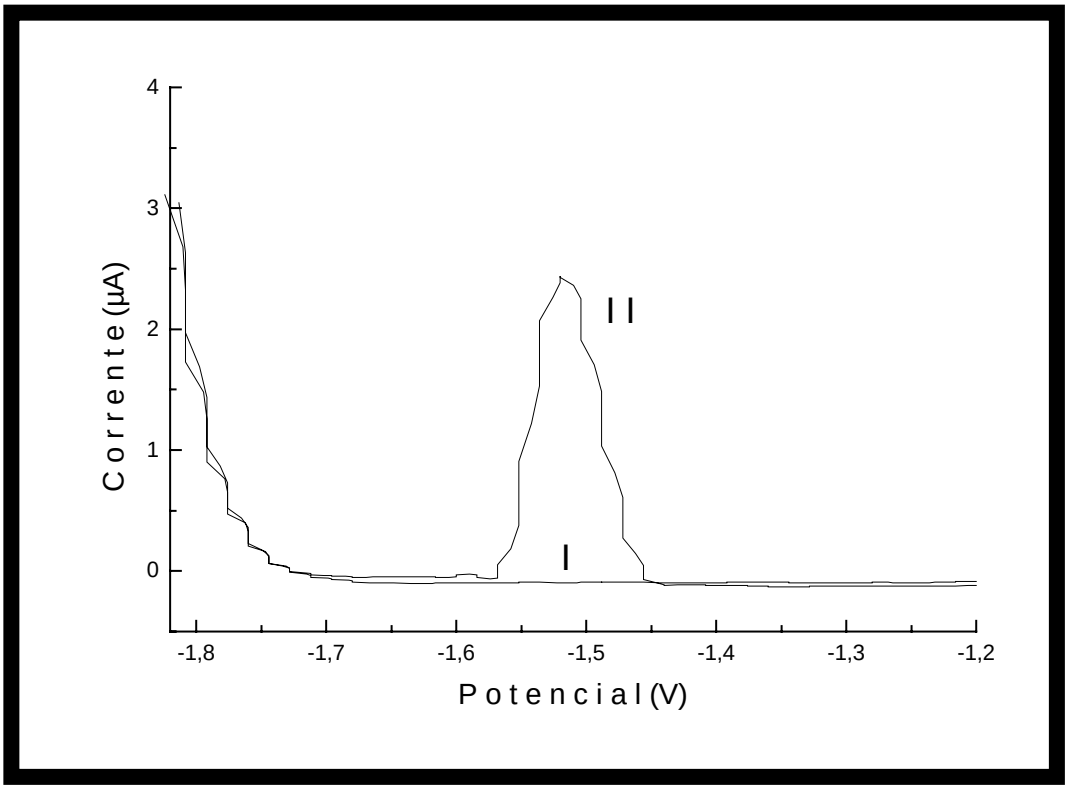


Figura 3.3: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução B-R pH 12,0 (curva II). Curva I= eletrólito suporte.

3.1.2 - INFLUÊNCIA DO pH E COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE.

O efeito da variação do pH sobre o potencial de pico de redução de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ clotrimazol em solução tampão B-R e fosfato é mostrado na Tabela 3.1. Estes resultados são colocados em gráfico na Figura 3.4. A análise dos valores mostra que no intervalo entre $8,0 \leq pH \leq 10,0$ o potencial de pico desloca-se para valores menos negativos e torna-se constante em valores de pH superior.

Tabela 3.1: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R.

Valores de pH	-Epc (V)	ipc (µA)
6,3*	1,66	10,0
6,9*	1,66	12,0
8,0	1,65	3,4
9,0	1,56	1,0
10,0	1,52	1,6
11,0	1,51	2,0
12,0	1,52	2,5

* = solução tampão fosfato.

Segundo a literatura (Bard, 1980), o potencial de pico catódico (E_{pc}), obtido pela técnica polarográfica de pulso diferencial pode ser relacionado com o potencial de meia onda ($E_{1/2}$) na técnica polarográfica de corrente direta (DC_T), pela seguinte expressão:

$$E_{PC} = E_{1/2} - \Delta E/2 \text{ (mV)}.$$

Onde ΔE = amplitude de pulso.

Dentro deste contexto, e considerando que todas as medidas polarográficas do clotrimazol foram realizadas utilizando-se a técnica polarográfica de pulso diferencial a uma amplitude de pulso (ΔE) mantida constante em 50 mV; todo o diagnóstico envolvendo deslocamento de potencial em função do pH obtido através da técnica DC_T, poderia ser estendida ao comportamento polarográfico de pulso diferencial.

Normalmente, sistema redox reversível que não envolve nenhuma transferência de prótons e sistema irreversível no qual não ocorre nenhuma transferência de prótons, após a etapa de transferência eletrônica, mostram potenciais de $E_{1/2}$ inalterados com a mudança nos valores de pH (Bond & Hefter, 1976). Por outro lado, é comum observar deslocamento dos valores de $E_{1/2}$ para valores mais negativos de potencial com a variação de pH, para sistemas irreversíveis em que a transferência de prótons seja precedente ou subseqüente ao processo de transferência eletrônica lenta.

Entretanto, alguns autores (Laviron, 1962; Person & Laviron, 1968; Bond & Hefter, 1976), mostram ainda, que o deslocamento de potencial de meia onda com o pH pode ser atribuído a uma variação de energia livre de adsorção do reagente ou do produto do processo eletródico e/ou a um sistema que sofre auto-inibição, onde a variação de pH provoque mudanças na estrutura do filme formado sobre a superfície do eletrodo, cuja presença influencie a reação eletroquímica.

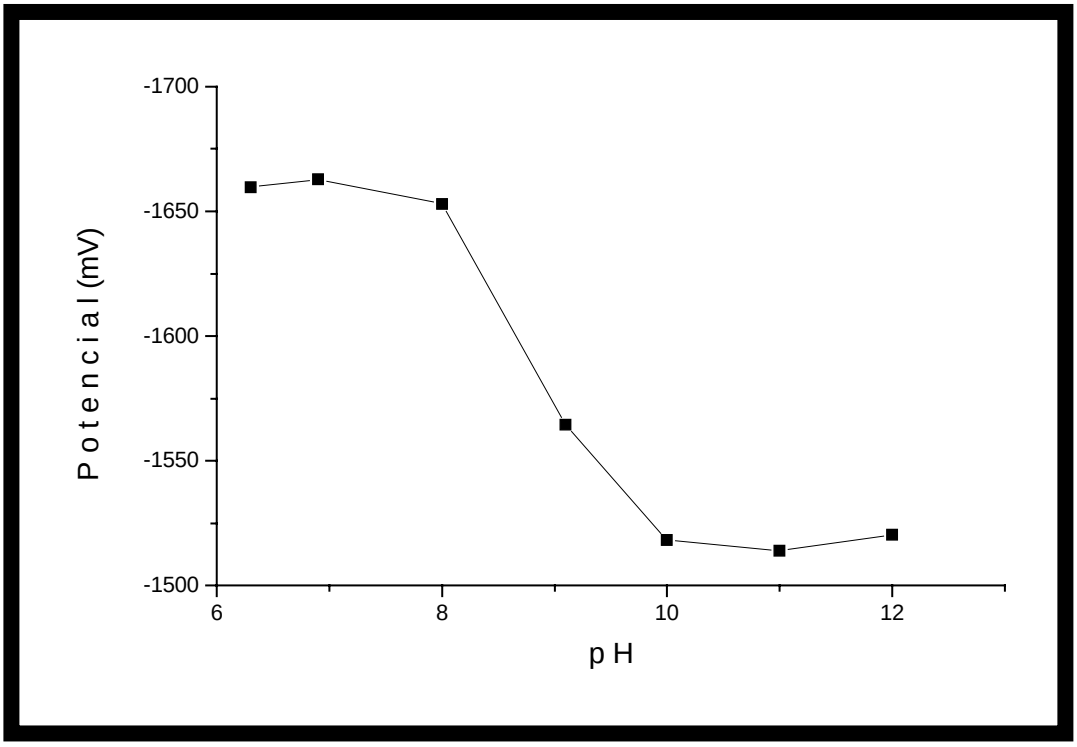


Figura 3.4: Influência do pH sobre o potencial de pico de redução de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R (pH ≥8,0) e solução tampão fosfato (pH 6 e 7).

Deste modo, o deslocamento de potencial para valores menos negativos observado para Ep vs pH na redução de clotrimazol poderia ser indicativo de que o processo de redução envolve forte adsorção do produto reduzido na superfície do eletrodo. Neste caso, o aparecimento das ondas de adsorção ocorrem em potenciais menos negativos do que a onda difusional, visto que, uma diminuição no teor de energia requerida para a redução na forma oxidada é observada quando o produto encontra-se adsorvido (Galus, 1976).

A análise do efeito do pH sobre a corrente de pico observada na redução de clotrimazol é mostrado na Tabela 3.1. A análise da tabela sugere que na solução tampão fosfato pH 6,9 a intensidade de corrente é maior e, portanto, foi escolhida como melhor eletrólito suporte para as medidas analíticas.

3.1.3 - ANÁLISE DA REVERSIBILIDADE DO PROCESSO DE REDUÇÃO.

O critério para a análise da reversibilidade utilizada na técnica polarográfica de pulso diferencial é a medida da largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$), que fornece valores a respeito do grau de reversibilidade do processo de redução.

Os valores previstos para um processo reversível envolvendo um elétron são $W_{1/2}$= 90,58 mV, 45,29 mV para picos envolvendo dois elétrons e 30,19 mV para picos envolvendo a participação de três elétrons (Bond, 1980). Os respectivos valores de $W_{1/2}$ obtidos para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em diferentes valores de pH em solução tampão B-R e fosfato são mostrados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Influência do pH nos valores da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) obtidos nos polarogramas de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R.

valores de pH	largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) (mV)
6,3*	100,0
6,9*	83,7
8,0	80,0
9,0	78,9
10,0	77,8
11,0	74,1
12,0	57,6

*= solução tampão fosfato.

O exame destes parâmetros mostra que o sistema não apresenta características de transferência eletrônica simples, uma vez que todos os valores obtidos em ampla faixa de pH se afastam dos valores teóricos de um comportamento eletródico reversível simples. Este comportamento é típico de um processo envolvendo participação de processos adsortivos, dependentes da variação de pH, que distorce a largura das ondas (Bard, 1980).

3.1.4 - CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO QUE CONTROLA A INTENSIDADE DE CORRENTE.

A análise da variação da corrente em função do tempo de gotejamento e concentração do substrato pode fornecer informações importantes sobre o processo que governa a corrente de pico do sistema estudado.

O efeito do tempo de gotejamento sobre a corrente de pico catódico de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol foi investigado em solução tampão fosfato pH 6,9 e B-R pH 12,0 entre 0,4 a 2,0 segundos. A corrente de pico, obtida em solução tampão fosfato pH 6,9, aumenta com o aumento no tempo de gotejamento até 1,2 segundos seguido da diminuição na corrente de pico em tempos de gotejamentos superiores. Em solução tampão B-R pH 12,0, a corrente de pico aumenta com o aumento no tempo de gotejamento em toda a variação de tempo de gotejamento investigado. Em ambos os casos, o potencial de pico mantém-se praticamente constantes em meio neutro ou alcalino com o aumento no tempo de gotejamento.

A análise da curva logarítmica obtida no intervalo de tempo de gotejamento investigado para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0 (Figura 3.5) mostra uma relação linear em todo o intervalo investigado com inclinação de 0,65.

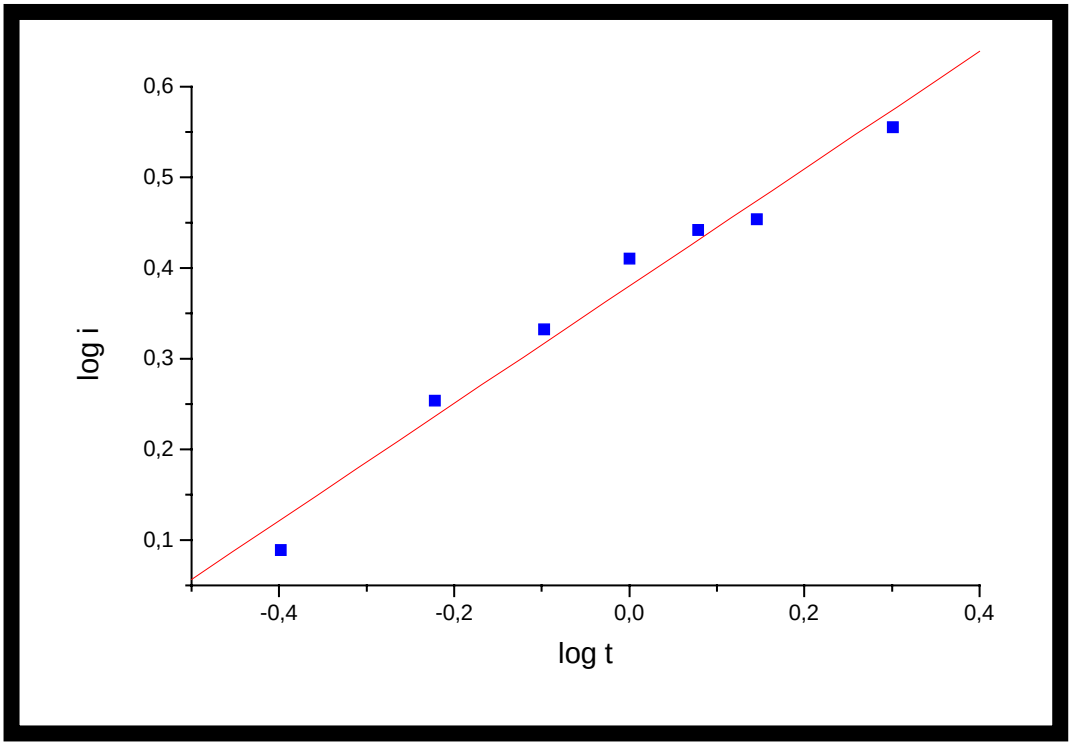


Figura 3.5: Análise logarítmica da influência do tempo de gotejamento sobre a corrente de pico catódico de $5x10^{-4}$ mol. L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0.

Valores previstos na literatura para inclinação da reta log i *vs* log t para processo difusional, cinético e adsorção são: 0,16; 0,66 e 0,33, respectivamente (Bond, 1980; Zuman & Kolthoff, 1962). Deste modo, os resultados obtidos para clotrimazol em meio alcalino pH 12,0; são indicativos de que em meio fortemente básico o processo é controlado cineticamente.

A análise logarítmica da curva log i *vs* log t para $5x\ 10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 (Figura 3.6), apresenta inclinação de 0,86 no intervalo de tempo de gotejamento entre 0,6 a 1,2 segundos. Este

valor está muito acima dos valores teóricos que caracterizam o processo cinético ou puramente controlado por adsorção, mostrando que, provavelmente o processo de transferência eletrônica sofre influência de outros processos envolvendo formação de filmes ou auto-inibição. A diminuição nos valores de corrente em longos tempos de gotejamento mostra que neste intervalo de pH, provavelmente o processo eletródico poderia estar sendo auto inibido pelo produto adsorvido.

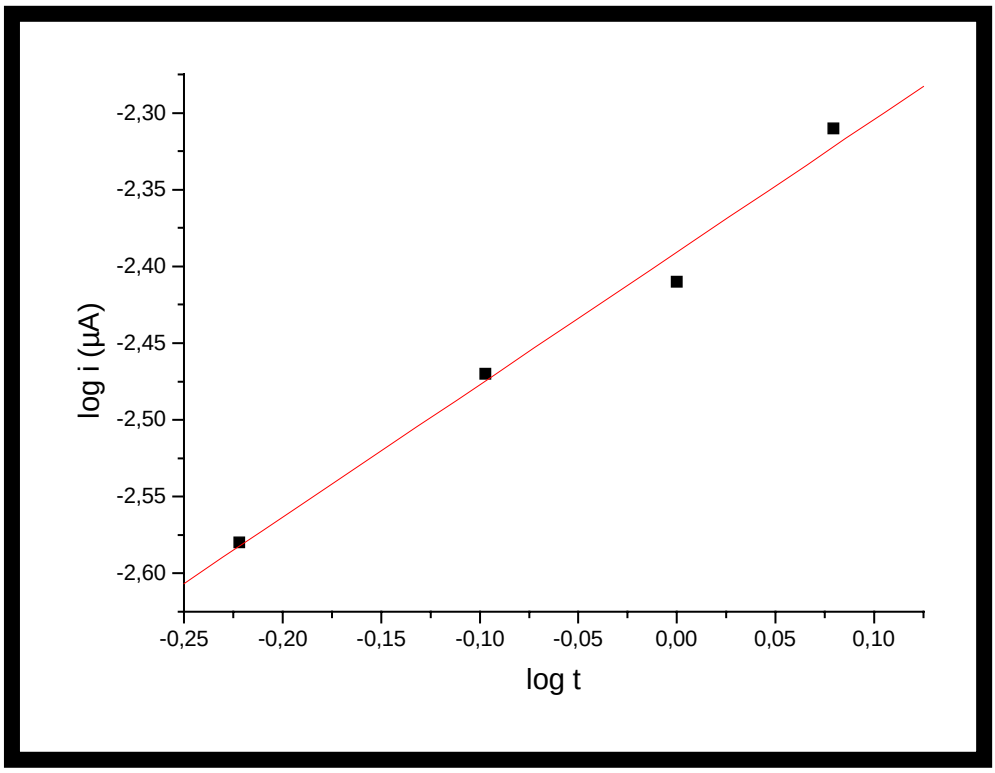


Figura 3.6: Análise logarítmica da influência do tempo de gotejamento sobre a corrente de pico catódico de $5x10^{-4}$ mol. L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

Considerando que estudos realizados com o intuito de caracterizar o processo que controla a intensidade de corrente de pico no sistema clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 mostram uma forte evidência de que a corrente é controlada por um fenômeno de adsorção, neste caso, um estudo que pode apresentar informações para um diagnóstico conclusivo sobre o controle da intensidade de corrente é o estudo da corrente em função do aumento na concentração do fármaco.

Polarogramas de pulso diferencial obtidos em tempo de gotejamento de 1,0 segundo, correspondentes a concentração de clotrimazol entre $2,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ à $7,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ são mostrados na Figura 3.7.

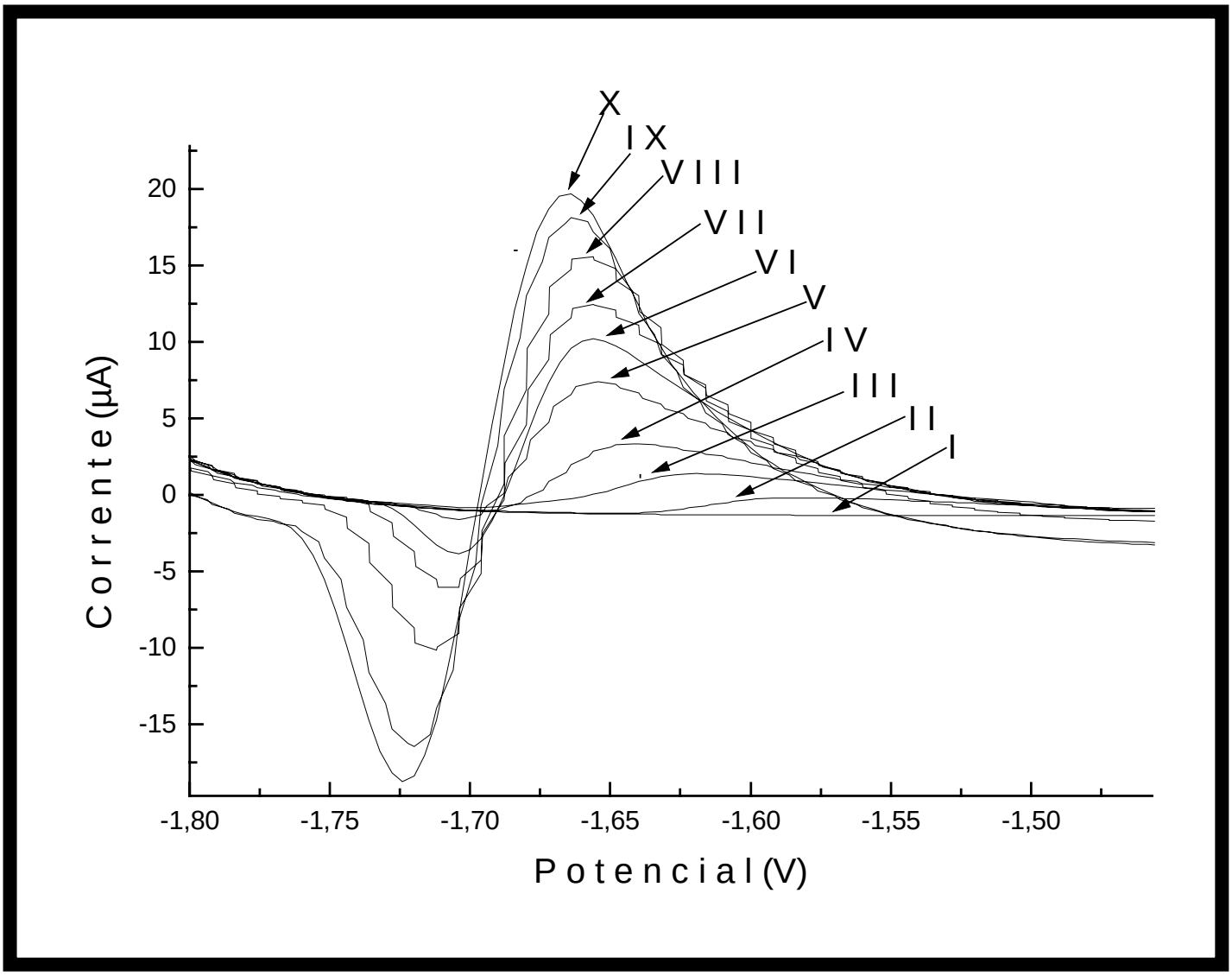


Figura 3.7: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9/metanol (3:2) Curva I= eletrólito suporte; curva II= 2,5;curva III= 3,5;curva IV= 4,0;curva V= 4,5;curva VI= 5,0;curvaVII= 5,5;curva VIII= 6,0;curva IX= 7,0 e curva X= 7,5 ($x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol).

Um exame desta figura mostra um acentuado deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos de potencial de redução em todo o intervalo de concentração investigado seguido de deformação na linha base em concentrações superiores a $4,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. Este comportamento é típico de processo eletródico acoplado a forte fenômeno de adsorção ou auto-inibição que deforma a linha base (Galus, 1976; Laviron, 1975).

Curvas representativas da variação da concentração de clotrimazol sobre a corrente de pico polarográfica são mostradas na Figura 3.8. A forma da curva obtida no intervalo de $2x10^{-4}$ a $7,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ caracteriza-se por uma relação linear que não passa pela origem, mostrando um comportamento anômalo ao previsto pela equação de Ilkovic (Ewing, 1972).

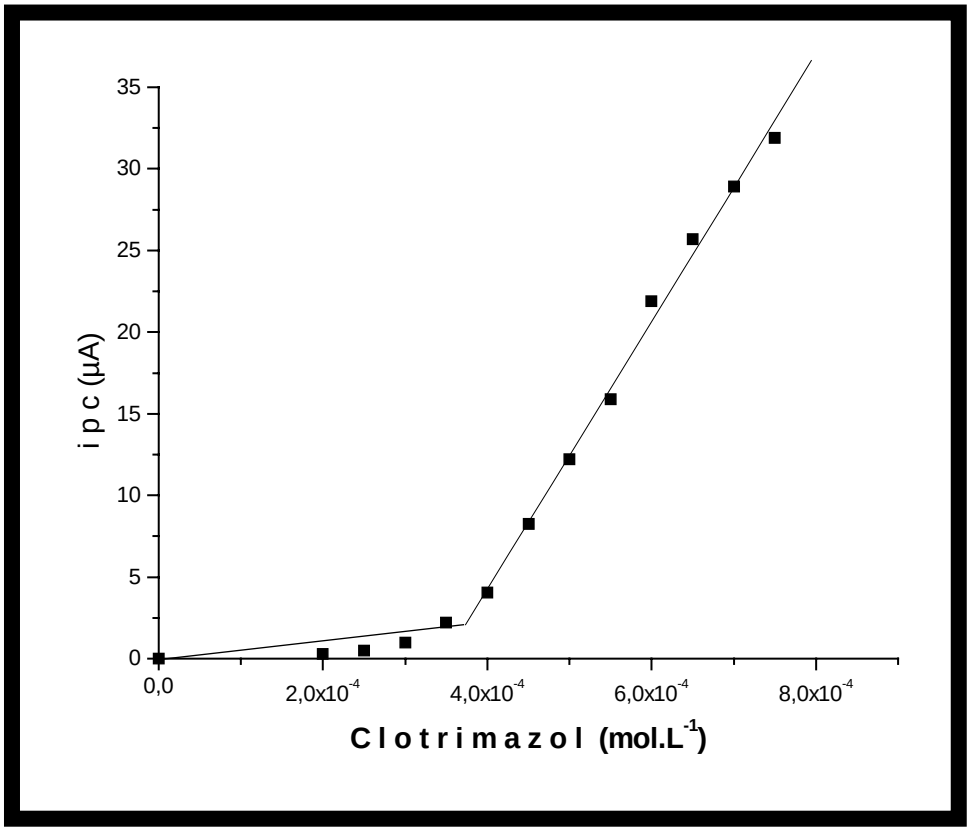


Figura 3.8: Efeito da concentração sobre a corrente de pico catódico para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

Segundo a literatura (Vececk, 1963), a correlação prevista entre a corrente e concentração da espécie eletroativa é uma relação linear para correntes difusional e cinética (reações de primeira ordem). Por outro lado, quando a corrente aumenta com o aumento da concentração da espécie eletroativa até um limite onde a onda permanece constante para adições posteriores da concentração do substrato é indicativo de que a corrente é controlada por adsorção ou o processo eletródico está obstruído pelo

produto, ou ainda, a onda polarográfica tem natureza catalítica.

Deste modo, o comportamento anômalo obtido para clotrimazol pode ser indicativo de que, em altas concentrações a espécie adsorvida estaria sendo preferencialmente reduzida ou um processo catalítico estaria tomando parte. Estudos realizados em tempos de gotejamento de 0,6 segundos apresentam o mesmo comportamento sugerindo que, mesmo em tempos mais rápido, o processo eletródico estaria sendo complicado por um forte fenômeno de adsorção.

Uma vez caracterizada a forte adsorção ou auto-inibição do fármaco sobre a superfície da gota de mercúrio e considerando o freqüente uso de substâncias que possuem propriedades tensoativas capazes de minimizar este problema em estudo eletroquímicos (Zuman & German, 1983), investigou-se a seguir, o efeito da adição de triton-X100 sobre as ondas polaragráficas visando otimizar o sinal monitorado. A Figura 3.9, mostra polarogramas de pulso diferencial obtidos do clotrimazol em concentração fixa de $2x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 6,9 na presença de diferentes concentrações de triton X-100.

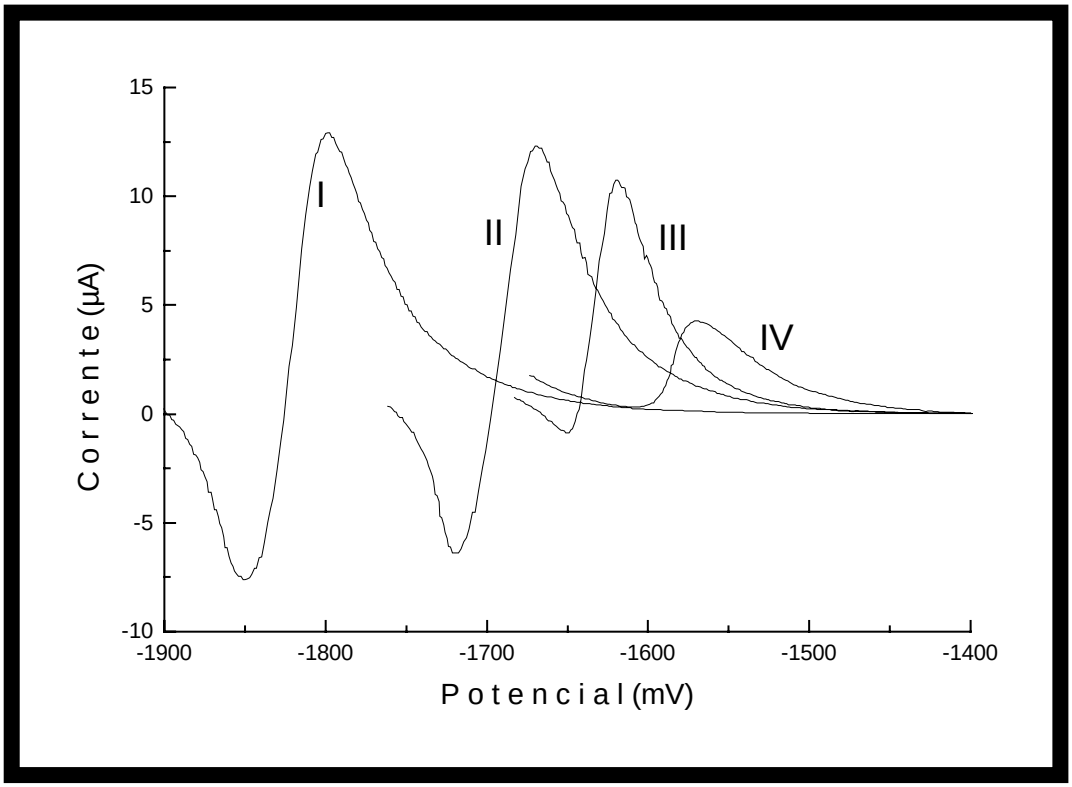


Figura 3.9: Efeito da adição de TRITON X-100 sobre as ondas polarográficas de pulso diferencial de $2x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9. Concentração de Triton X- 100: Curva I= 0,0; curva II= $7,5x10^{-4}$ %; curva III= $1x10^{-3}$ % e curva IV= $2x10^{-3}$%.

A análise desta figura mostra que a deformação da linha base da onda polarográfica no lado mais negativo é minimizada pela adição do surfactante. Entretanto, em concentrações superiores a $1x10^{-3}$% de triton X-100 a corrente de pico é visivelmente atenuada por adições sucessivas do agente tensoativo. Além disso, observar-se que a adição de triton X-100 provoca deslocamento do potencial de pico para valores menos negativos de potencial, uma vez

que a ação do surfactante é promover a formação de uma película sobre a

gota de mercúrio que minimiza a forte afinidade que o fármaco oferece à espécie metálica no eletrodo capilar. Deste modo, conclui-se que a melhor concentração do surfactante para medidas analíticas de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 seria $1x10^{-3}$% , o qual poderia minimizar o fenômeno de adsorção sem inibição significativa da onda polarográfica.

Considerando que o triton X-100 pode atuar efetivamente na atenuação do fenômeno de adsorção que distorce a onda polarográfica, investigou-se a seguir, a possibilidade de construir uma curva de calibração adequada para clotrimazol na presença do surfactante. Curva de calibração para clotrimazol no intervalo de concentração entre $5x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ a $2,8x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 6,9 na presença de $1x10^{-3}$% de triton X-100 pode ser observada na Figura 3.10.

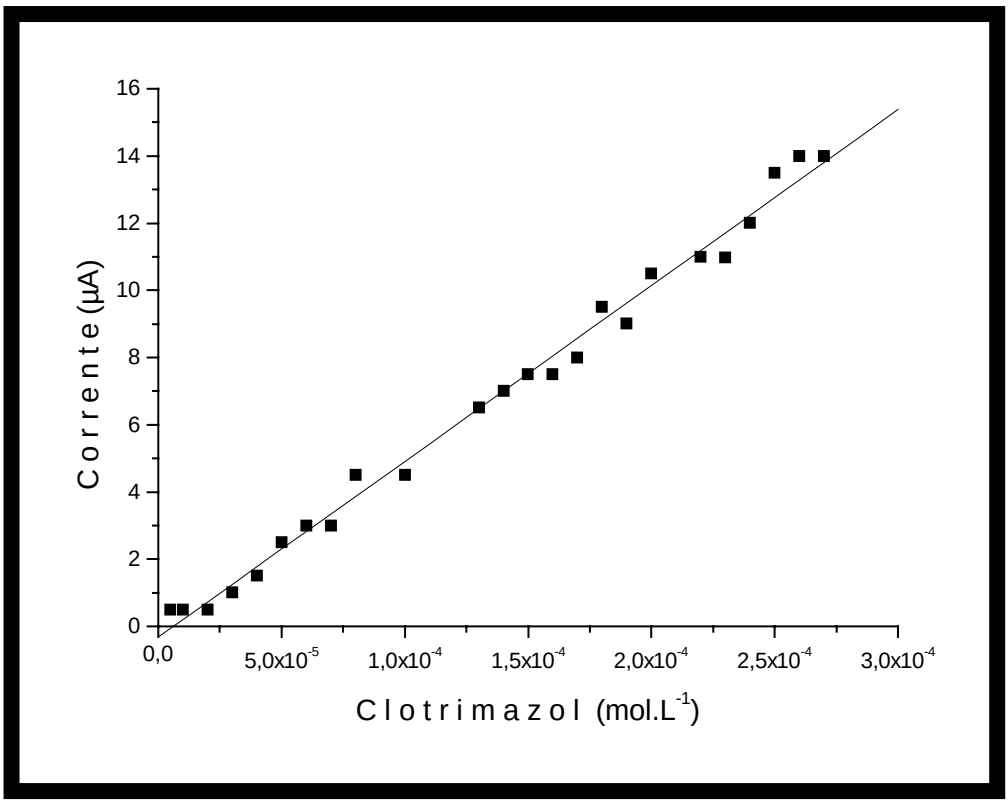


Figura 3.10: Efeito da concentração sobre a corrente de pico catódico para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 contendo $1x10^{-3}$% de triton X-100.

A análise da Figura 3.10 mostra que uma relação linear é obtido em todo o intervalo de concentração investigado, mostrando que o método é viável analiticamente. Adicionalmente, nestas condições experimentais, verifica-se que o potencial de pico de redução é mantido constante em todo o intervalo de concentração estudado, confirmando o diagnóstico anterior de que o deslocamento de potencial de pico observado previamente ocorre devido à adsorção ou auto-inibição.

3.2 - COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO.

3.2.1 - ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE CLOTRIMAZOL.

O comportamento voltamétrico de clotrimazol foi investigado em dois valores representativos de pH 6,9 em solução tampão fosfato (40% de metanol absoluto) e em pH 12,0 em solução tampão B-R sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio. A Figura 3.11 mostra um voltamograma cíclico obtido para $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 utilizando-se velocidade de varredura de 60 $mV.s^{-1}$. O respectivo voltamograma cíclico para $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em meio alcalino pH 12 é mostrado na Figura 3.12. A análise da Figura 3.11, mostra que em meio neutro o fármaco é reduzido em eletrodo de gota estacionária de mercúrio em potencial de -1,5 V (pico IC) e um pico de oxidação é observado na varredura reversa de potencial em Epa= -1,45 V (pico IA), mostrando que o produto gerado na primeira etapa de redução é regenerado na varredura reversa de potencial. Do mesmo modo, em pH 12,0, o fármaco é reduzido em potencial de -1,39V e o voltamograma apresenta pico na varredura reversa de potencial de -1,35V, (Figura 3.12). A ocorrência do pico de oxidação na varredura reversa de potencial sugere que o processo é reversível, entretanto, uma análise mais criteriosa envolvendo outros parâmetros é necessária.

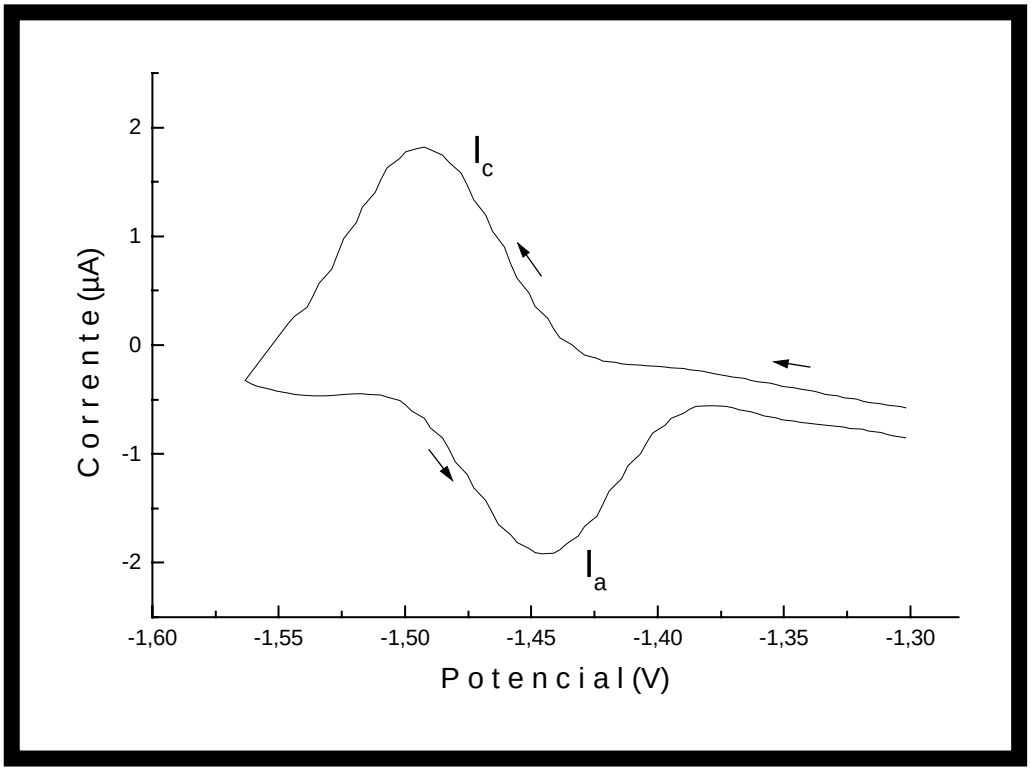


Figura 3.11: Voltamograma cíclico de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, υ = 60 $mV.s^{-1}$.

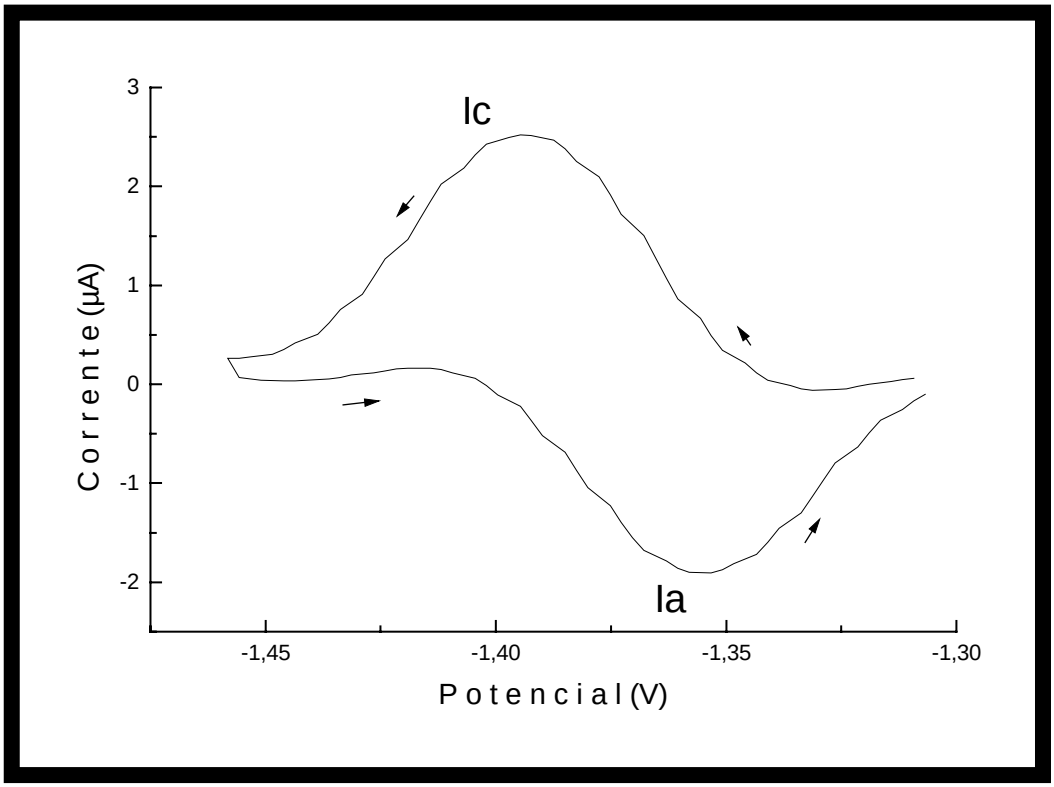


Figura 3.12: Voltamogram a cíclico de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0, υ = 60 $mV.s^{-1}$.

3.2.2 - INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA.

A influência da velocidade de varredura (**υ**) sobre os potenciais de pico de redução e oxidação nos voltamogramas obtidos para $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol foi investigado em intervalos de υ entre 10 a 2.000 $mV.s^{-1}$, em meio neutro (tampão fosfato pH 6,9) e em meio alcalino (tampão B-R pH 12,0).

3.2.3. - COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO EM MEIO NEUTRO.

O efeito da mudança na velocidade de varredura sobre os parâmetros de potencial de pico e corrente de pico é mostrado na Tabela 3.3. A análise desta tabela mostra que o potencial de pico de redução (Epc) mantém-se constante em velocidade de varredura $\leq$ 100 $mV.s^{-1}$, seguido de ligeiro deslocamento para valores mais negativos de potencial de pico de redução em valores superiores de velocidade de varredura. Por outro lado, o potencial de pico de oxidação desloca-se nitidamente para valores menos negativos de potencial com o aumento da velocidade de varredura.

Tabela 3.3: Parâmetros voltamétricos do sistema $1x10^{-4}$ mol. L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

Vel. de varredura	onda de redução		onda de oxidação	
($mV.s^{-1}$)	-Ep (V)	ip (µA)	-Ep (V)	Ip (µA)
20	1,52	1,0	1,48	0,3
30	1,51	1,2	1,48	0,6
40	1,51	1,6	1,47	0,8
50	1,51	1,8	1,47	1,2
60	1,49	1,8	1,44	1,4
70	1,50	2,1	1,45	1,7
80	1,49	3,7	1,45	3,1
90	1,52	2,7	1,45	2,3
100	1,51	3,2	1,44	2,5
200	1,52	5,1	1,43	4,7
400	1,55	8,0	1,40	8,3
500	1,57	9,0	1,41	9,7
1.000	1,55	17,3	1,40	19,3
1.500	1,59	20,0	1,37	22,2
2.000	1,60	25,5	1,36	28,9

Para um processo eletródico reversível, o potencial de pico independe da velocidade de varredura de potencial. Por outro lado, um deslocamento para valores mais negativo de potencial é típico de processo de transferência eletrônica irreversível ou com reação química subsequente à transferência de carga (EC), enquanto que reações químicas precedentes à transferência eletrônica (CE), provocam um deslocamento para valores menos negativo de potencial (Brown & Large, 1971).

Deste modo, a análise do comportamento do potencial de pico de redução sob diferentes velocidades de varreduras, pode ser indicativo de que o processo se comporta reversivelmente, na região de pequena contribuição de queda ôhmica $\upsilon < 100$ mV.s^{-1}.

O efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente do pico catódico e anódico é mostrado na forma de gráfico na Figura 3.13.

De acordo com a literatura (Bond, 1980), processos eletródicos envolvendo corrente de pico proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura (υ) são controlados por difusão. Entretanto, processo controlado por fenômeno de adsorção apresentam relações de ip diretamente proporcional à velocidade de varredura.

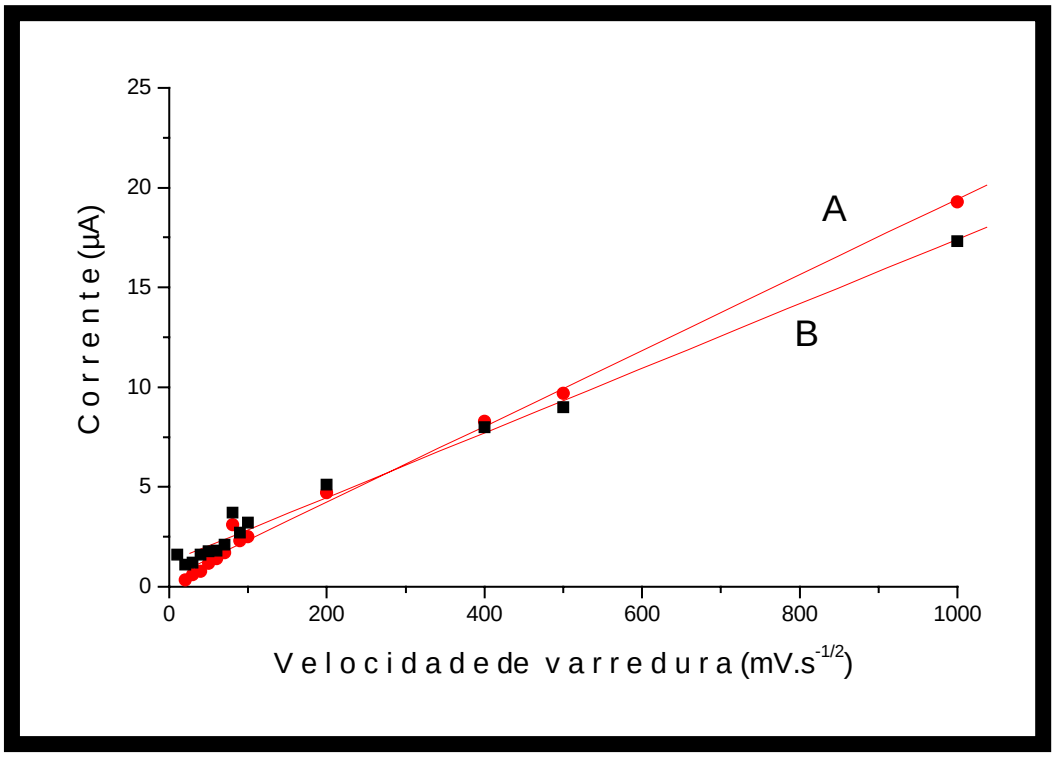


Figura 3.13: Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico (B) e pico anódico (A) no sistema $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

Deste modo, relação linear entre ip *vs* υ sugere que a redução de clotrimazol em gota estacionária de mercúrio é controlada por um processo de adsorção tanto do reagente quanto do produto.

Contudo, uma caracterização criteriosa do processo eletródico requer outros critérios de diagnóstico, tais como, análise da função corrente (ipc / $\upsilon^{1/2}$) e relação entre corrente

anódica e catódica (ipa/ipc) em função da velocidade de varredura.

Assim, os valores calculados para a função corrente correspondente ao pico de redução (IC) para clotrimazol em pH 6,9 foram calculados e os valores colocados em gráfico na Figura 3.14. Os valores da função corrente ipc/$\upsilon^{1/2}$ aumentam significativamente e atingem um patamar em altas velocidades de varredura.

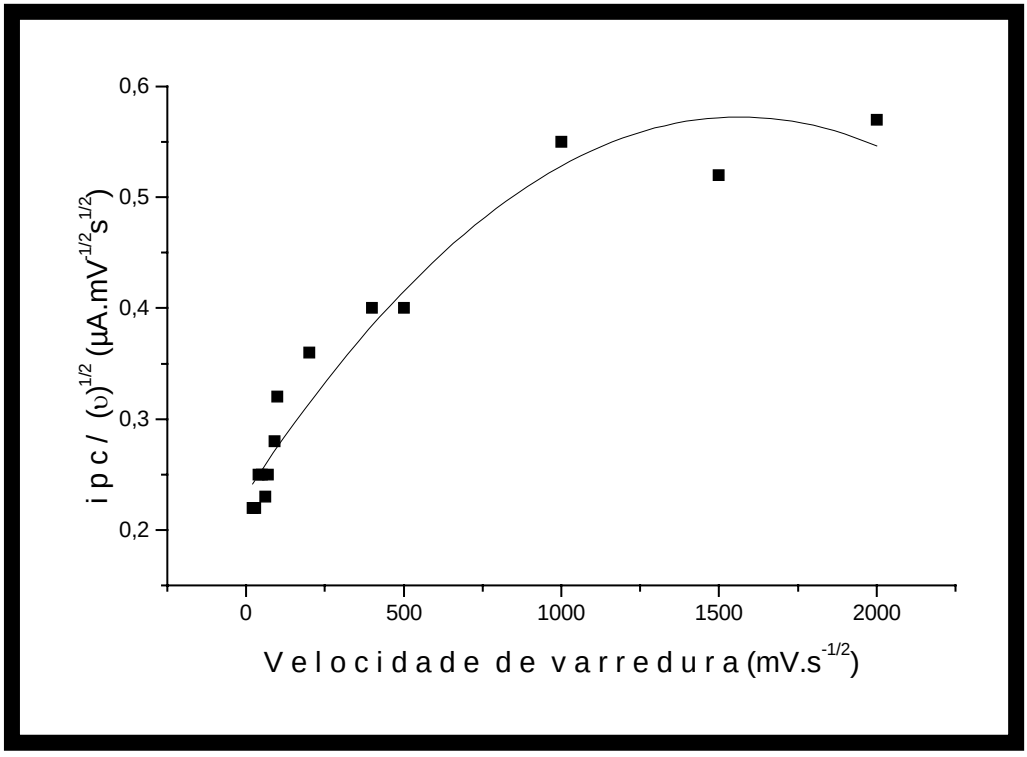


Figura 3.14: Efeito da velocidade de varredura sobre a função corrente do sistema $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

De acordo com a literatura (Brown & Large, 1971; Nicholson & Shain, 1964), a função corrente é

independente da velocidade de varredura tanto para processos reversíveis como irreversíveis. Caso a irreversibilidade seja provocada por reações químicas acopladas à transferência eletrônica, pode se observar uma diminuição ou mesmo uma independência de ipc / $\upsilon^{1/2}$ com a velocidade de varredura dependendo da natureza da reação química. Entretanto, um aumento de ipc/$\upsilon^{1/2}$ com o aumento da velocidade de varredura pode ser indicativo de processos catalíticos ou processo envolvendo fenômeno de adsorção.

Deste modo, a forma do gráfico obtido na Figura 3.14 para redução de clotrimazol em pH 6,9 mostra que o processo provavelmente envolve adsorção do reagente (Bard, 1980).

Um outro critério utilizado na análise dos parâmetros voltamétricos envolve a relação entre pico anódico e pico catódico (ipa/ipc) em função da variação da velocidade de varredura.

Segundo a literatura (Bond, 1980; Brown & Large, 1971) processos eletródicos reversíveis exibem uma razão de ipa / ipc sempre igual à unidade e independem da velocidade de varredura. Para mecanismo com reações químicas precedentes à transferência de carga os valores de ipa / ipc aumentam com a velocidade de varredura e são sempre maior ou igual à unidade. Processos com reação química subseqüente à transferência de carga apresentam como características valores de ipc > ipa em baixas velocidades de varredura (ipa / ipc <1) e a relação ipa / ipc tendendo à unidade em altas velocidades de varreduras. Processo envolvendo adsorção do produto, pode algumas vezes também apresentar valores de ipa maiores que ipc (Bard, 1980).

Os resultados obtidos para a relação de ipa / ipc obtido dos voltamogramas cíclicos correspondentes à redução de clotrimazol são apresentados na Figura 3.15. A análise destes dados mostra que o sistema se comporta como processo eletródico governado por um mecanismo de transferência de carga com reação química subseqüente. Entretanto, o ligeiro aumento de ipa em relação a ipc (ipa / ipc>1) em altas velocidade de varredura indica também a contribuição da adsorção do produto reduzido na superfície do eletrodo.

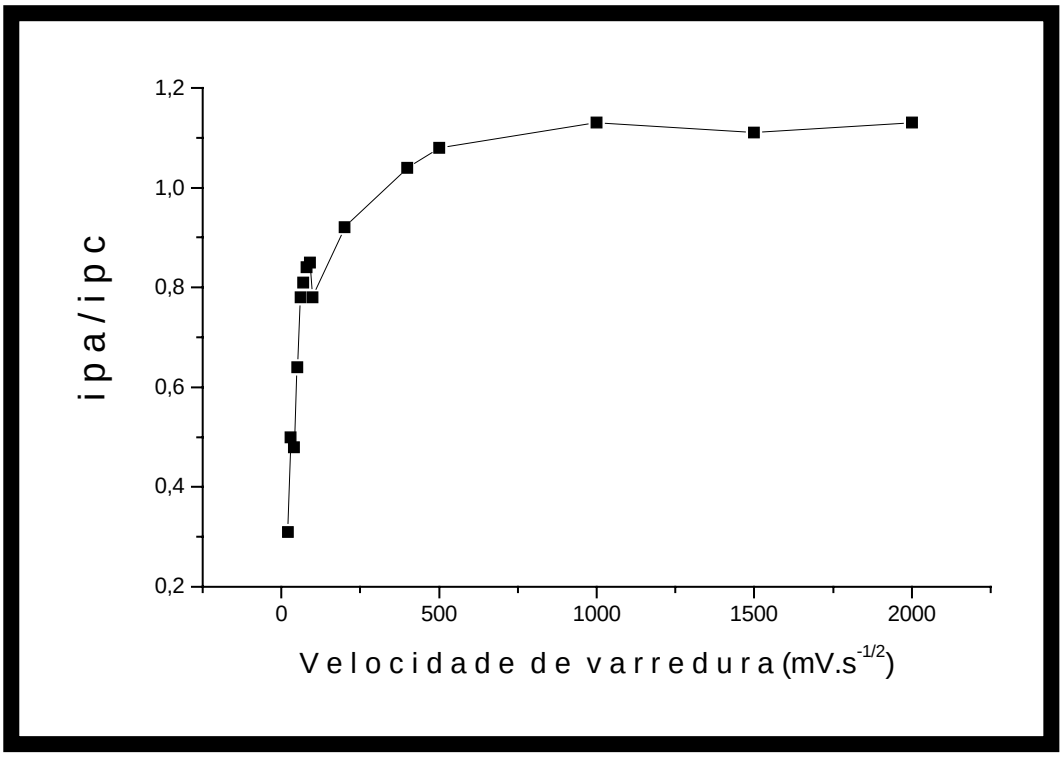


Figura 3.15: Efeito da velocidade de varredura sobre a razão corrente de pico anódico e corrente de pico catódico do sistema $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9.

Segundo a literatura (Fry, 1972), o número de elétrons envolvidos em um processo eletroquímico pode ser obtido pela expressão:

$$Epa - Epc = Epc/2 - Epa/2 = 56/n \quad (mV)$$

Deste modo, a análise dos potenciais de pico de oxidação e redução correspondentes à redução de clotrimazol traduzidos por Epc/2 - Epa/2 mostram valores aproximadamente iguais a 50 mV em $\upsilon \leq 100$ mV.s^{-1}.

Considerando que variações entre Epc/2 - Epa/2 = 56 mV seriam previstos para redução envolvendo 1 elétron é possível sugerir que clotrimazol estaria sendo reduzido através da transferência de 1 elétron.

Estudos envolvendo varreduras sucessivas de potencial sobre a gota de mercúrio sem renovação podem fornecer informações mecanísticas importantes sobre o processo eletródico, tais como, evidência de intermediários eletroativos ou formação de filmes superficiais.

A Figura 3.16 apresenta voltamogramas cíclicos registrados continuamente em valor de pH 6,9 para 1x10^{-3} mol.L^{-1} de clotrimazol. O exame da referida figura mostra que tanto o pico de redução quanto o pico de oxidação não sofrem mudança de intensidade de corrente nas varreduras sucessivas de potencial, sugerindo que tanto a forma original como a forma reduzida estão sendo reduzidas na superfície do eletrodo no estado adsorvido. Estes resultados confirmam o diagnóstico precedente de que provavelmente a redução de clotrimazol ocorre reversivelmente envolvendo tanto adsorção do reagente quanto do produto, cujo filme formado estaria estabilizando o produto formado.

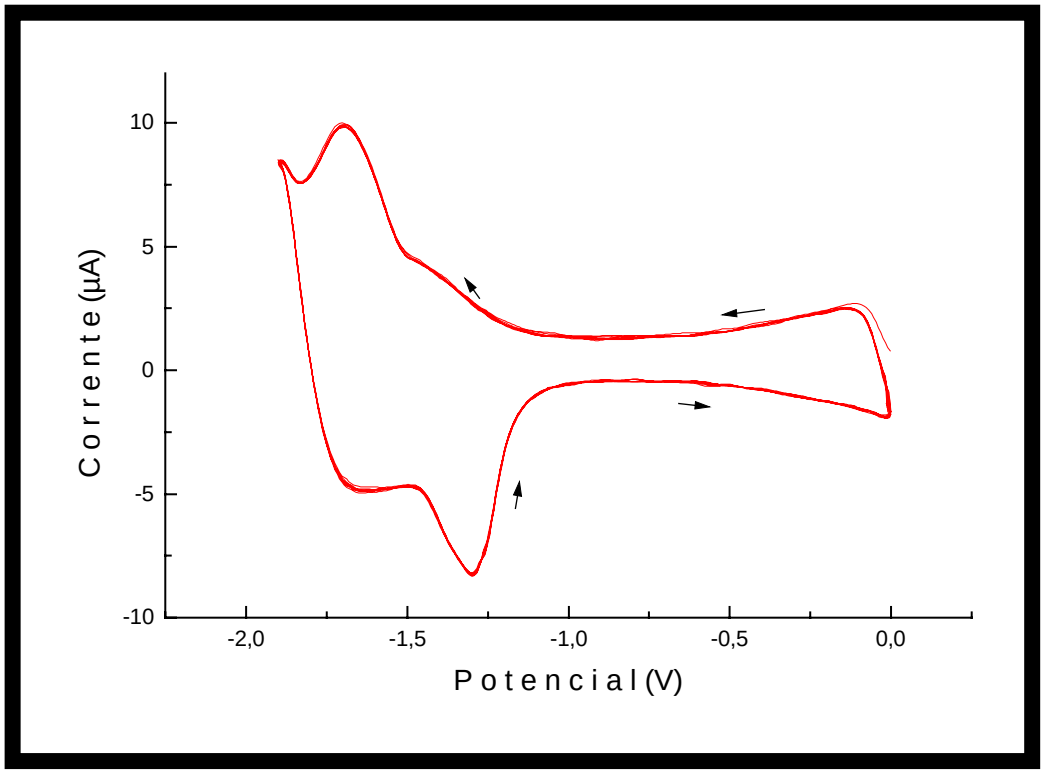


Figura 3.16: Efeito da varredura sucessiva de potencial sobre a forma do voltamograma cíclico obtido para $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão pH 6,9.

3.2.4 - COMPORTAMENTO EM MEIO ALCALINO.

O comportamento voltamétrico de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em meio alcalino (solução tampão B-R pH 12,0) apresenta um voltamograma cíclico semelhante àquele obtido em meio neutro. O fármaco é reduzido sobre eletrodo de gota estacionária de mercúrio em potencial de -1,39V e o produto eletroquímico gerado na etapa de redução é regenerado em potencial de -1,34V.

Parâmetros voltamétricos obtidos em meio alcalino são mostrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Parâmetros voltamétricos obtidos do sistema $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0.

υ ($mV.s^{-1}$)	Onda de redução		Onda de oxidação	
	-Ep (V)	ip (µA)	-Ep (V)	ip (µA)
30	1,39	1,2	1,35	1,0
40	1,38	1,6	1,35	1,0
50	1,39	1,9	1,35	1,7
60	1,39	2,4	1,35	1,8
70	1,39	3,1	1,35	2,5
80	1,39	3,7	1,35	3,2
90	1,39	4,1	1,36	3,2
100	1,40	5,2	1,36	4,0
200	1,40	9,5	1,34	7,5
400	1,41	19,5	1,34	14,2
500	1,43	23,0	1,34	17,0
1.000	1,45	33,3	1,31	24,2
2.000	1,49	58,6	1,29	40,0

O efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico é mostrado na forma de gráfico na Figura 3.17. A análise da figura mostra que ip é diretamente proporcional à υ, sugerindo que, tanto o processo de redução quanto o processo de reoxidação do produto gerado é controlado por adsorção.

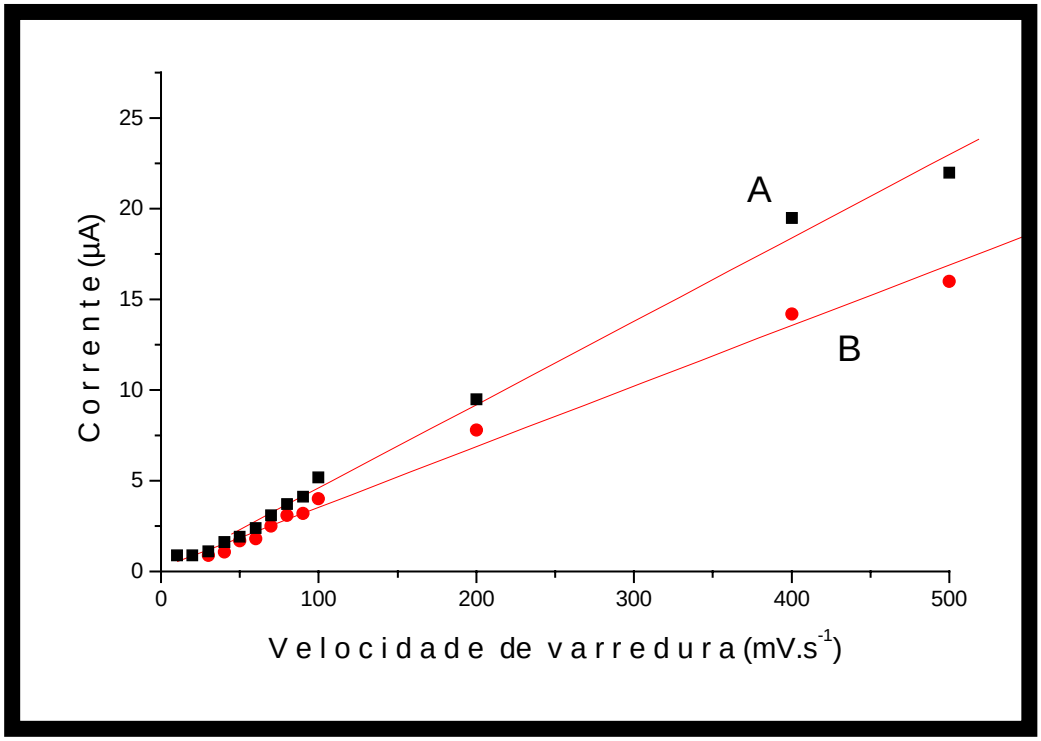


Figura 3.17: Efeito da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente de pico catódico (A) e pico anódico (B) correspondente à redução e reoxidação de $1x10^{-4}$ mol.L de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0.

O efeito da velocidade de varredura sobre a função corrente em solução tampão B-R pH 12,0 confirma o diagnóstico precedente de adsorção do reagente, cuja curva mostra aumento da relação de ipc/$\upsilon^{1/2}$ em função do aumento da velocidade de varredura (Figura 3.18).

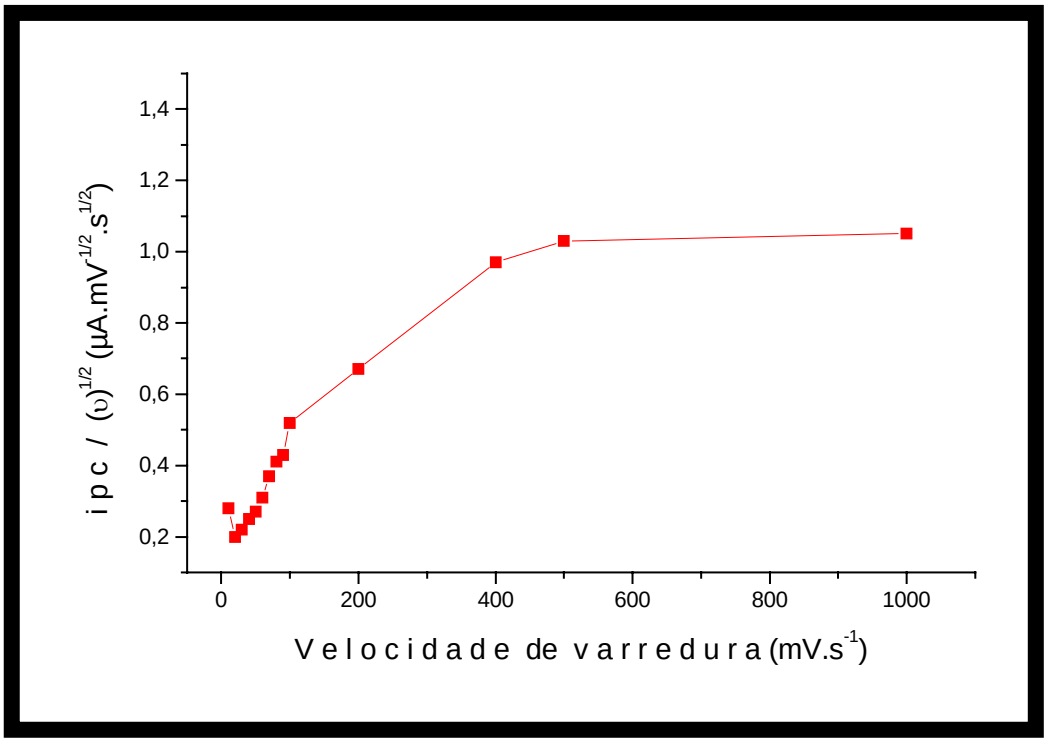


Figura 3.18: Efeito da velocidade de varredura sobre a função corrente (pico catódico) correspondente à redução de $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0.

A influência da mudança na velocidade de varredura sobre a razão corrente de pico anódica e corrente de pico catódica (ipa / ipc) mostra valores ao redor de 0,8, sugerindo que o processo não é totalmente reversível.

A Figura 3.19 apresenta voltamogramas cíclicos de 1x 10^{-3} mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0, com varreduras sucessivas de potencial. A referida figura mostra que o fármaco é fortemente adsorvido sobre a gota estacionária de mercúrio, uma vez que, não se nota queda nas leituras de corrente entre o registro de um ciclo para outro. Isto é indicativo de forte fenômeno de adsorção promovido pelo fármaco sobre a gota pendente de mercúrio no eletrodo capilar, conforme verificado nos estudos em valor de pH 6,9.

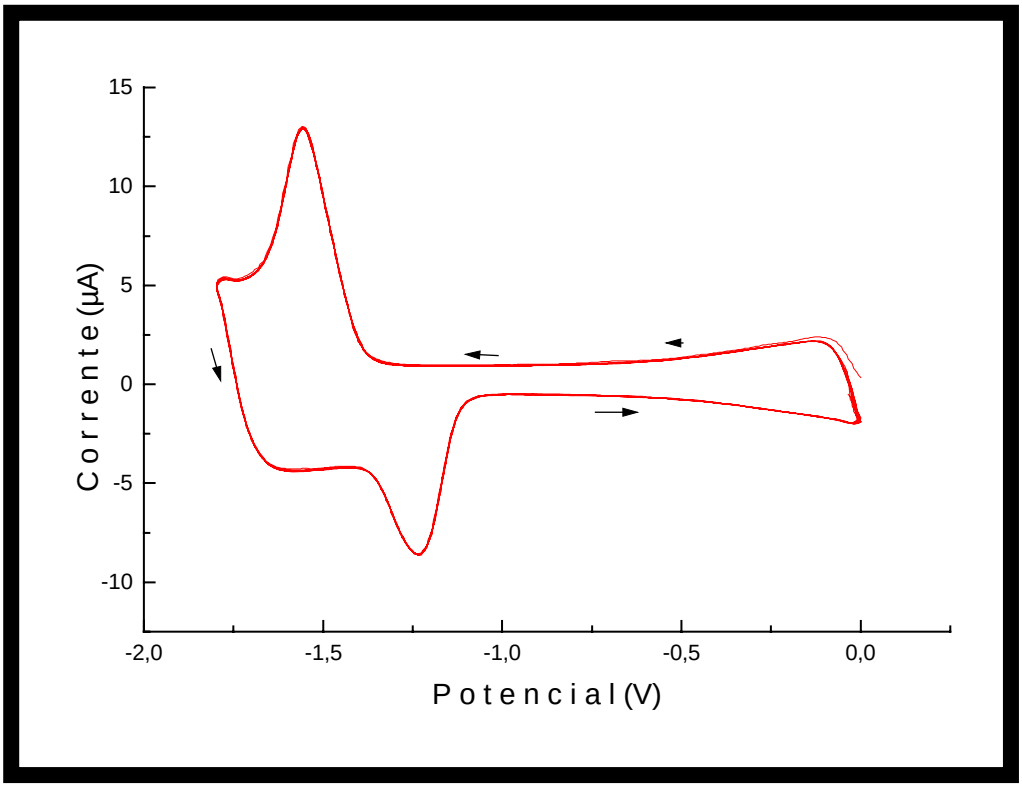
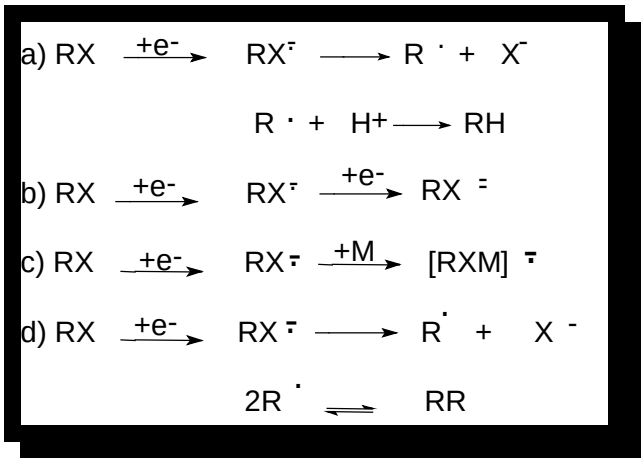


Figura 3.19: Efeito da varredura sucessiva sobre a corrente de pico no sistema 1x10^{-3} mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R pH 12,0.

3. 3 - REDUÇÃO DE CLOTRIMAZOL.

Classes de compostos contendo grupo imidazólico são conhecidos na literatura como compostos inativos eletroquimicamente (Bard & Lund, 1973). Estes resultados foram confirmados através de testes polarográficos realizados com o composto imidazol, que não apresenta nenhuma onda de redução.

Por outro lado, a redução eletroquímica de compostos halogenados é bem conhecida na literatura (Baizer & Lund, 1983). De um modo geral, compostos RX são reduzidos em 2 etapas de redução envolvendo 1 elétron em cada etapa, ou em uma etapa de redução em condições experimentais que desestabiliza o radical ânion formado, conforme mostra o esquema 3.1.



Esquema 3.1: Esquema de redução para compostos halogenados, (onde X= F^-, Cl^-, Br^-, e I^-) resumindo as principais rotas e produtos previstos (Baizer & Lund, 1983):

.

Os autores sugerem que a redução destes compostos ocorre segundo mecanismo de redução com diversas possibilidades, onde a etapa determinante de velocidade na redução envolve a transferência de 1 elétron ao substrato, gerando um radical ânion.

O tempo de vida do intermediário $RX^{\cdot -}$ gerado após transferência de 1 elétron depende de diversos fatores, levando em consideração desde a natureza do haleto quanto o material eletródico. Alguns autores têm demonstrado que após a transferência do primeiro elétron a rota seguinte, envolvendo o radical ânion pode envolver diversos caminhos:

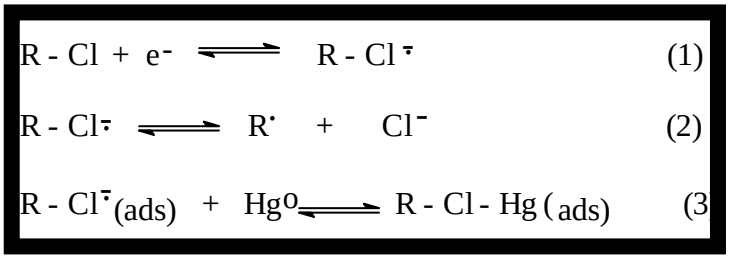
a) O radical ânion, pode ser dissociado na superfície do eletrodo para $R^{\cdot}$ e X^{-}, e o radical $R^{\cdot}$ poderia ser protonado em reação química subsequente.

b) O radical ânion pode ser reduzido normalmente a diânion;

c) Ou ser adsorvido pelo mercúrio que pode funcionar como um bom aprisionador de radical;

d) Formação de compostos diméricos envolvendo dois radicais.

A análise dos resultados obtidos para redução de clotrimazol mostra que provavelmente o mecanismo de redução pode ser explicado pela rota (C), de acordo com o seguinte esquema 3.2.



Esquema 3.2: Esquema de redução de clotrimazol.

A onda de redução em meio neutro e alcalino provavelmente envolve a transferência de 1 elétron ao orbital σ antiligante da ligação C-Cl do fármaco, gerando um radical ânion que poderia sofrer clivagem da ligação C-Cl, conforme mostra a equação (2), ou ser estabilizado pela forte adsorção com o mercúrio, equação (3). Estes resultados são coincidentes com os valores de 1 elétron obtidos da relação de Epc-Epa, dos resultados voltamétricos. A reversibilidade do pico quando ipa / ipc =1 observado nos experimentos voltamétricos em alta velocidade de varredura mostra que a clivagem do radical ânion, equação (2) não é preponderante no processo, pois o mercúrio funcionaria como agente estabilizador do radical formado, equação (3). Este comportamento é confirmado pelos estudos de voltametria cíclica com varredura sucessiva de potencial que mostram a formação de um filme superficial sobre o eletrodo de mercúrio e relação de ipa / ipc <1 em baixa velocidade de varredura indicando a ocorrência de uma reação química competitiva com o processo de adsorção.

A forte adsorção do produto da redução sobre o eletrodo de mercúrio explica os resultados polarográficos, marcados por anomalias e distorções em toda a sua extensão. A adição de surfactante provavelmente protege a gota de mercúrio e minimiza os efeitos comuns de processos eletródicos complicados por forte adsorção.

3.4 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE CLOTRIMAZOL DERIVATIZADO COM CORANTE REATIVO.

Tendo em vista que os estudos polarográficos de pulso diferencial para determinação direta de clotrimazol mostraram que o processo eletródico é complicado por forte efeito de adsorção, investigou-se a seguir a possibilidade de si determinar clotrimazol indiretamente através de reação de complexação ou formação de par iônico com outras substâncias eletroativas.

Como discutido previamente, a redução polarográfica de clotrimazol em meio ácido ocorre apenas em potencial altamente negativo e a onda é mal definida pela proximidade da descarga do eletrólito suporte, tornando-a inviável analiticamente (Figura 3.1) e sua determinação direta em meio neutro somente seria viável na presença de triton X-100, que por sua vez, deve ser muito bem calculado devido a possibilidade de supressão de corrente (Fig. 3.9).

No entanto, a possibilidade de formação de par iônico entre clotrimazol e alaranjado de metila (AM) ou azul de bromotimol (AB) em meio ácido são métodos espectrofotométricos conhecidos na literatura (Osama & Pakinaz, 1993; Chainani, *et al*., 1981). O complexo formado é usualmente extraído com clorofórmio e determinado espectrofotometricamente em 422 nm (AM) e 410 nm (AB).

Dentro deste contexto, investigou-se a possibilidade de se acompanhar a interação entre clotrimazol e alguns corantes, através da técnica polarográfica de pulso

diferencial. No entanto, os corantes utilizados no modo espectrofotométrico mostraram visível precipitação do clotrimazol, inviabilizando as medidas polarográficas em meio aquoso.

Considerando que o corante reactive red 120 (RR120), cuja estrutura é mostrada na Figura 3.20, também é um corante diazo, com alta solubilidade em água promovida pelos grupamentos sulfônicos existentes na molécula, investigou-se a seguir a provável interação do clotrimazol com o corante reactive red 120, visando desenvolver metodologia eletroanalítica para monitoramento indireto do fármaco derivatizado através da técnica polarográfica de pulso diferencial.

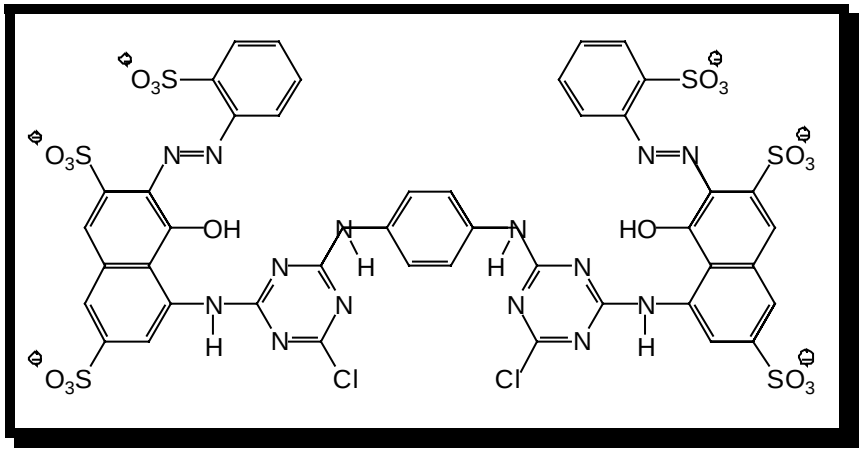


Figura 3.20 : Estrutura Molecular do Corante REACTIVE RED 120.

3.4.1 - INVESTIGAÇÃO POLAROGRÁFICA DA INTERAÇÃO RR 120 VS CLOTRIMAZOL.

O corante RR 120 $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ é reduzido polarograficamente em eletrodo de mercúrio, em solução tampão B-R pH 3,0 em três etapas bem definidas como mostra a Figura 3.21. A primeira etapa de redução, pico "A", é atribuída à redução simultânea das duas funções azo, em potencial em torno de -0,2 V e a segunda e terceira etapas, picos "B" e "C", são atribuídas à redução dos dois grupamentos monoclorotriazinícos, em potenciais ao redor de - 1,0 V (Guaratini, *et al*., 1997).

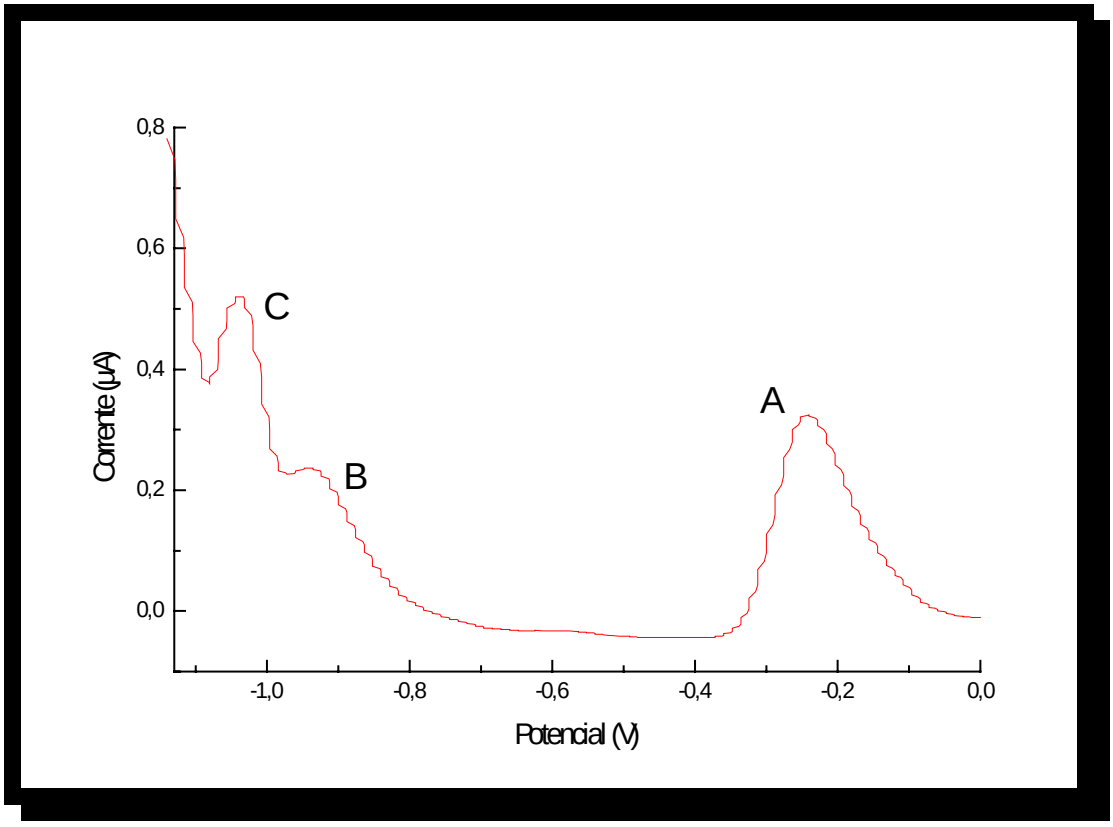


Figura 3.21: Polarograma de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 3,0.

Nas mesmas condições experimentais, após adição de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol, observa-se a ocorrência de um novo pico de redução em potencial em torno de -0,4 V (pico D) além da redução do grupo azo do corante, (pico A) e picos B e C dos grupos triazínicos, como mostra a Figura 3.22.

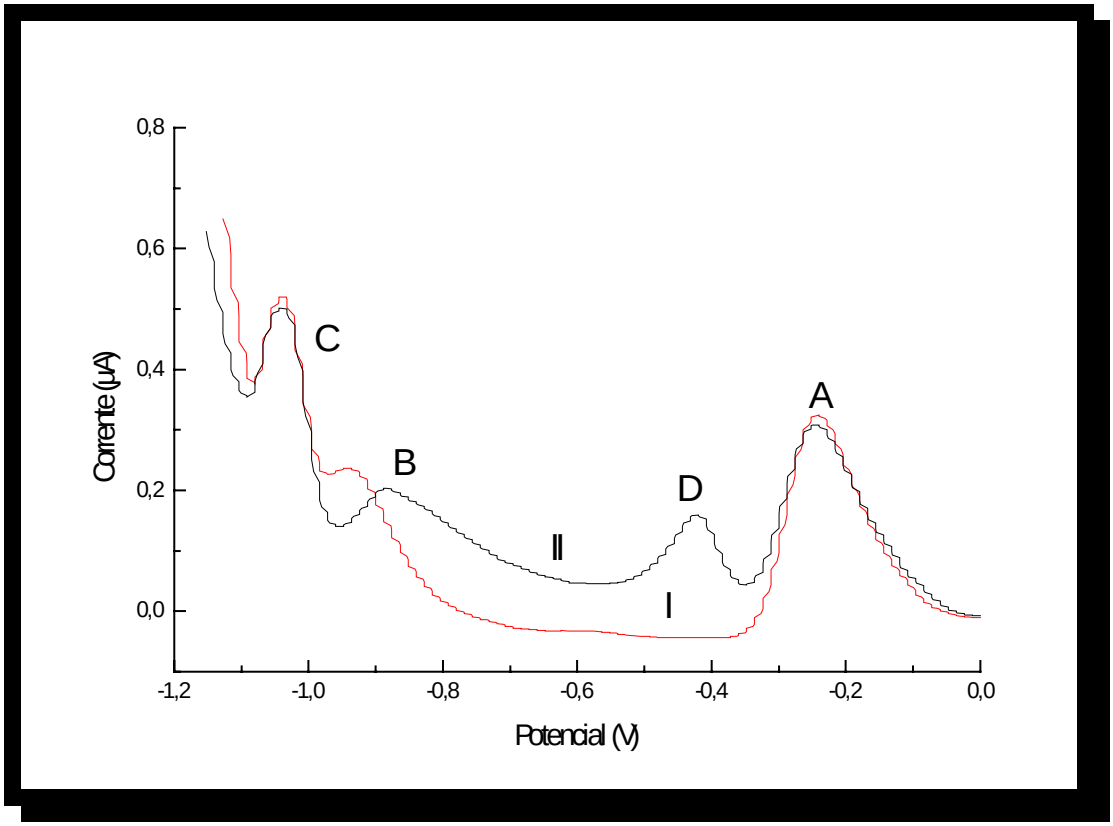


Figura 3.22: Polarogramas de pulso diferencial para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR120 na ausencia (curva I) e presença de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol (curvaII) em solução tampão B-R pH 3,0.

Este resultado mostra que a ocorrência da onda polarográfica “D”, em potencial mais negativo do que a redução do grupo azo do corante reativo pode ser atribuído à redução do fármaco derivatizado, pois sua intensidade de corrente aumenta sucessivamente com o aumento da

concentração da droga. Conseqüentemente, a ocorrência do pico extra dependente da concentração de clotrimazol poderia ser utilizada analiticamente para monitoramento da droga.

Deste modo, investigou-se a seguir, as melhores condições experimentais para derivatização do clotrimazol com o corante RR120 e subseqüente monitoramento através da técnica polarográfica de pulso diferencial.

3.4.2 INFLUÊNCIA DO pH E COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE.

O comportamento polarográfico de clotrimazol na presença do corante RR 120 foi investigado no intervalo de pH 2 a 12, porém, as ondas do composto derivatizado ocorrem apenas em meio ácido pH< 4,5. Adicionalmente, investigou-se o efeito da composição das soluções tampão na redução das curvas polarográficas comparando-se solução tampão B-R e solução de HCl/KCl.

O efeito da variação de pH sobre os parâmetros polarográficos obtidos de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR 120 na presença de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol são mostrados na Tabela 3.5. A análise da referida tabela evidencia que a corrente de pico do novo composto apresenta maior intensidade em valor de pH 1,0 (HCl/KCl), assim como, maior discriminação da onda de redução do corante original e do composto derivatizado. Entretanto, é conhecido na literatura que a estabilidade do próprio corante ou do clotrimazol poderia estar comprometido por reações de hidrólise ácida, conforme relatam (Hoogerheide, *et al*., 1981; Zollinger, 1991).

A comparação entre intensidade de corrente de pico para redução do composto derivatizado (onda D) em solução tampão B-R, mostra que a onda polarográfica de clotrimazol apresenta boa potencialidade analítica em valores de pH 2,0, como mostra a Figura 3.23.

Tabela 3.5: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial obtidos do sistema $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de RED120 e $1x10^{-4}$ mol. L^{-1} de clotrimazol em solução tampão B-R.

pH	onda A (corante)		onda D (clotrimazol derivatizado)	
	-Epc	ipc	-Epc	ipc
	(mV)	(μA)	(mV)	(μA)
1,0*	20,7	0,408	351,8	0,275
1,5*	96,5	0,490	383,2	0,218
2,0	85,0	0,357	379,0	0,214
2,5	160,0	0,260	408,0	0,170
3,0	244,0	0,263	421,0	0,177
3,5	282,0	0,233	442,0	0,113
4,0	348,0	0,273	474,0	0,017
4,5	388,0	0,247	-	-

* = sistema HCl/KCl

Deste modo, escolheu-se a solução tampão B-R como a melhor composição do eletrólito suporte em valor de pH 2,0 para estudar o sistema RR 120 X clotrimazol.

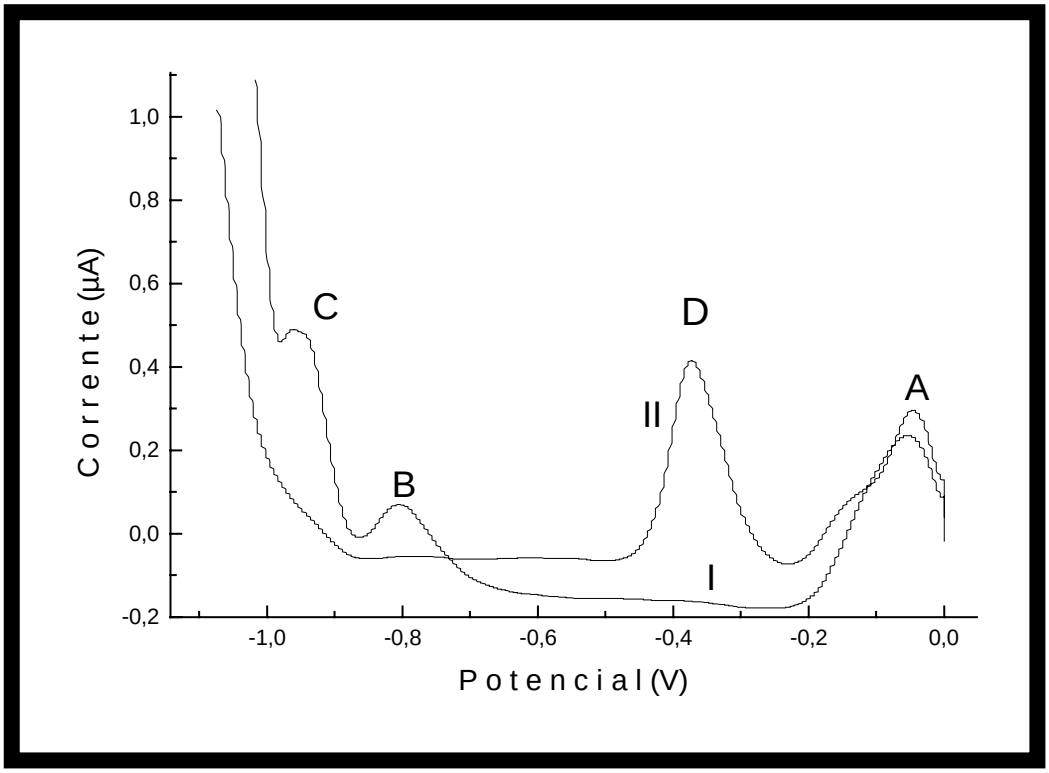


Figura 3.23: Polarogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I= $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de RR 120; curva II= adição de $2,5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de clotrimazol.

3.4.3 - CARACTERÍSTICAS DA INTERAÇÃO ENTRE CLOTRIMAZOL E O CORANTE RR 120.

Com o objetivo de caracterizar o tipo de interação entre o corante reativo RR 120 e clotrimazol em solução aquosa, promoveu-se uma investigação espectrofotométrica na região UV-visível do corante em concentração fixa de $1x10^{-5}$ mol.L^{-1} e adições do fármaco em concentrações entre $5x10^{-6}$ mol.L^{-1} a $5x10^{-5}$ mol.L^{-1}.

Estudos espectrofotométricos do corante RR 120 foram realizados por (Guaratini, *et al*., 1997), cuja publicação relata 4 picos de máxima absorção em comprimento de onda de $\lambda_{max.}$= 538 nm, $\lambda_{max.}$=512 nm e $\lambda_{max.}$=293 nm atribuídos à absorção dos grupamentos azo existentes na estrutura do cromofóro e $\lambda_{max.}$= 237 nm atribuído à absorção das funções monoclorotriazina.

Parâmetros espectrofotométricos (comprimento de onda de máxima absorção e absorbância) obtidos no estudo são mostrados na Tabela 3.6, assim como, os espectros de absorção são apresentados na Figura 3.24. A análise dos espectros mostra que na presença de clotrimazol nenhuma mudança significativa nas bandas de absorção do grupo azo pode ser distinguida. Entretanto, embora o desaparecimento do ombro em 237nm no espectro, poderia ser indicativo da interação clotrimazol / corante RR 120, esta análise não permite um diagnóstico seguro, pois nesta região poderia estar sendo sobreposto a absorção característica da droga livre (λ= 237nm).

A reação entre grupos reativos clorotriazínicos com grupos aminas é conhecida na literatura (Gulrajani, 1993). Usualmente, a reação ocorre através de reação de substituição do cloreto gerando aminas quaternárias. Deste modo, os resultados obtidos mostram que provavelmente a função clorotriazina, quando substituída pelo grupo imidazólico protonado do fármaco [pKa= 4,7 (Hoogerheide & Wika, 1982) para clotrimazol], promove a formação de um centro mais facilmente reduzido na molécula, conseqüentemente, diminui-se a onda correspondente à função triazina e o novo composto é reduzido em potencial

bem menos negativo, aumentando sua potencialidade analítica.

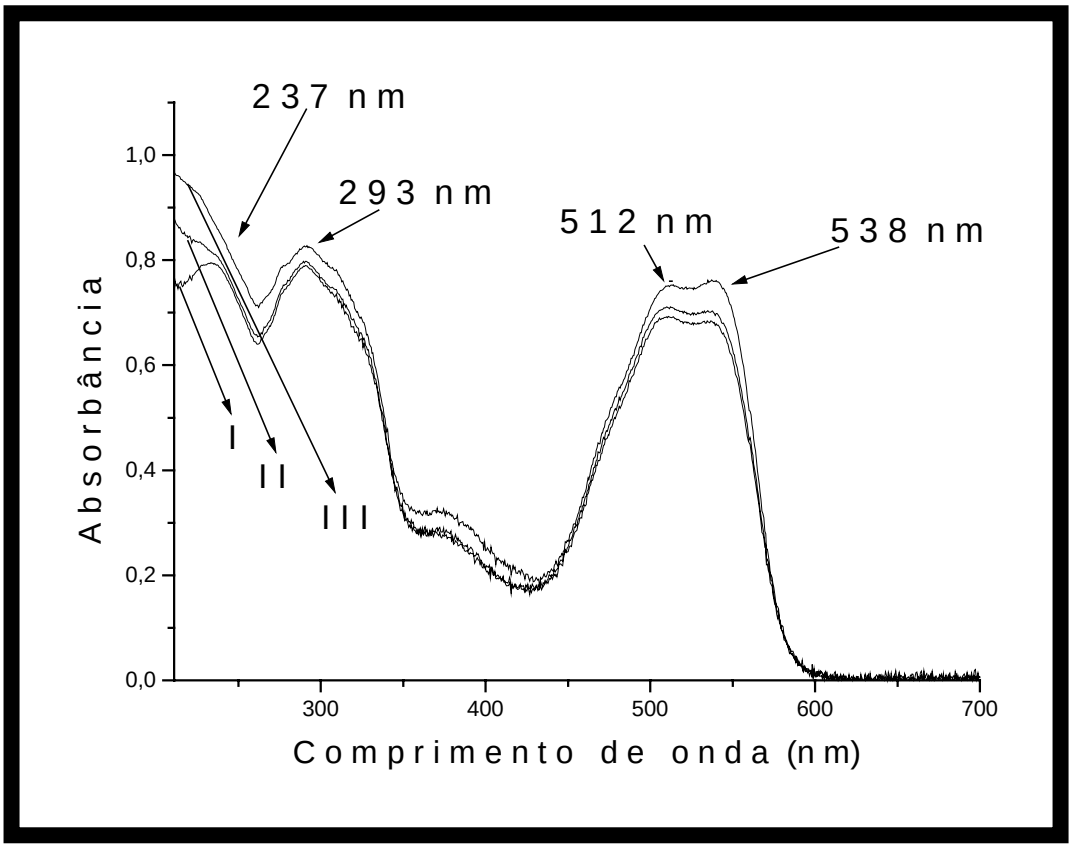


Figura 3.24: Espectros de absorção UV-Vis para $1x10^{-5}$ mol. L^{-1}; do corante RR 120 (curva I) na presença de $5x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol (curva II) e após adição de $8x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol (curva III) em solução tampão B-R pH 2,0.

Tabela 3.6: Parâmetros espectrofotométricos obtidos dos espectros correspondentes ao sistema corante RR 120 e clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0.

Substrato	pico(538nm)		pico(512nm)		pico(293nm)		pico(237nm)	
$mol.L^{-1}$	(λnm)	(A)	(λnm)	(A)	(λnm)	(A)	(λnm)	(A)
$1x10^{-5}$ *	538,0	0,75	512,0	0,74	293,0	0,80	237,0	0,80
$5x10^{-6}$ **	538,5	0,70	512,8	0,70	293,5	0,78	238,4	0,83
$6x10^{-6}$ **	538,2	0,70	511,4	0,70	293,5	0,78	237,1	0,90
$7x10^{-6}$ **	538,5	0,71	511,8	0,70	293,9	0,79	-	-
$8x10^{-6}$ **	538,0	0,68	511,8	0,66	291,9	0,75	-	-
$9x10^{-6}$ **	536,5	0,67	510,8	0,66	291,9	0,75	-	-
$1x10^{-5}$ **	537,4	0,67	508,8	0,65	292,5	0,74	-	-
$2x10^{-5}$ **	536,0	0,67	508,8	0,66	293,9	0,74	-	-
$3x10^{-5}$ **	537,4	0,67	511,6	0,66	295,2	0,73	-	-
$4x10^{-5}$ **	537,8	0,66	510,8	0,65	290,5	0,75	-	-
$5x10^{-5}$ **	537,8	0,67	513,5	0,66	289,2	0,75	-	-

* = concentração do corante RR 120.

** = concentração de clotrimazol adicionado à solução contendo $1x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ do corante RR 120.

Estudos polarográficos de pulso diferencial foram realizados com o objetivo de contribuir com o estudo espectrofotométrico. A Figura 3.25 mostra polarogramas de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante reactive red 120 em solução tampão B-R pH 2,0, obtidos na presença de clotrimazol em diferentes concentrações.

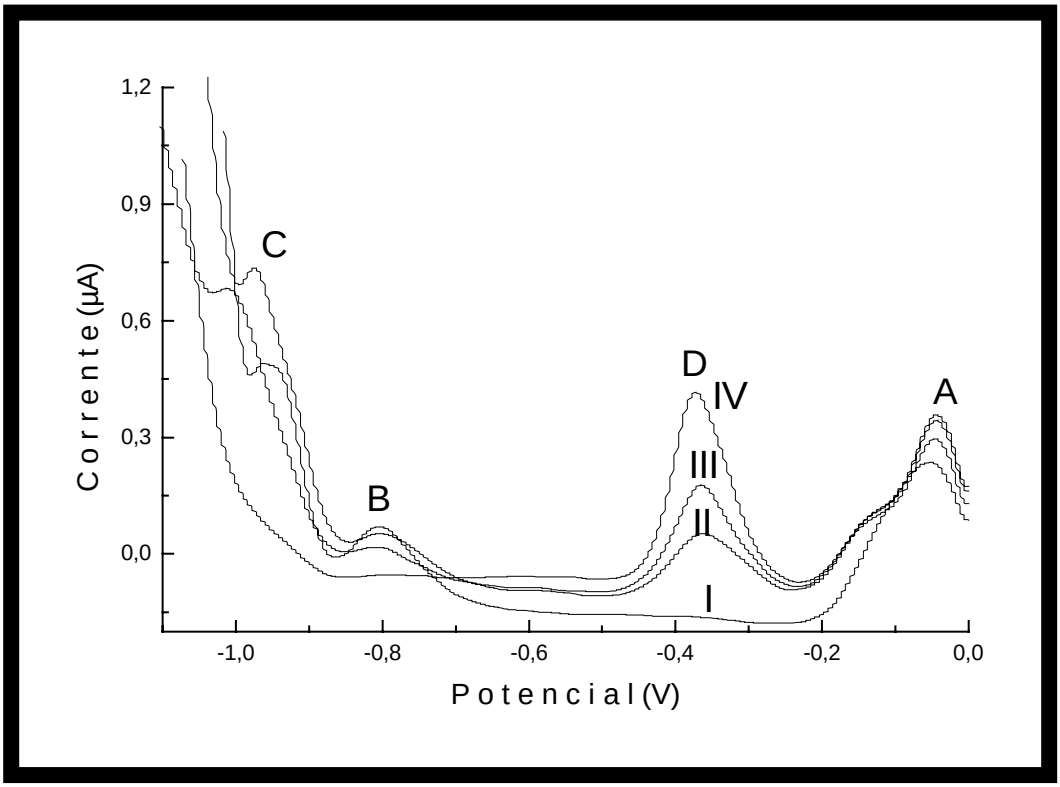
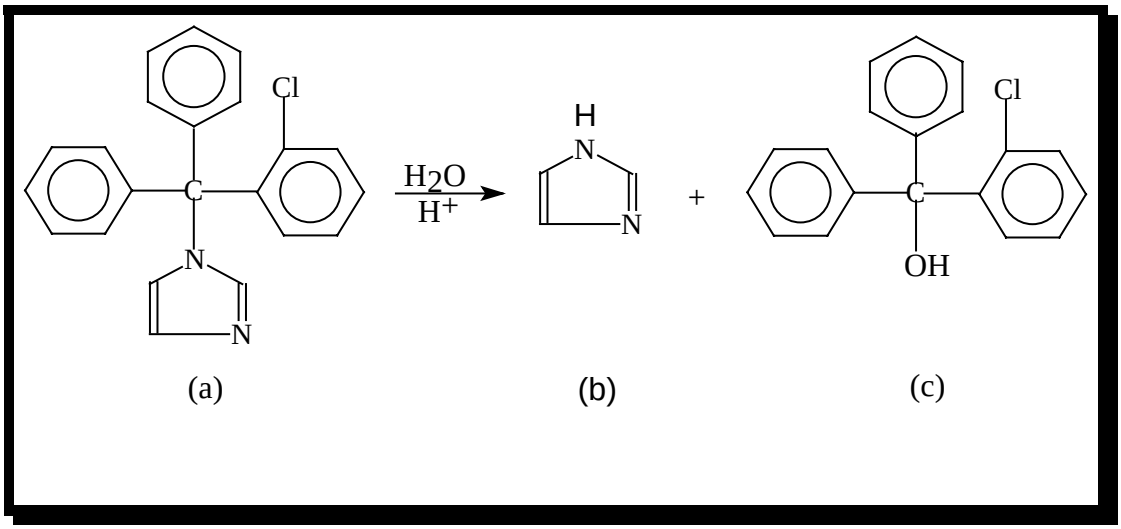


Figura 3.25: Polarogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I= $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR 120; curva II= adição sucessiva de $7,5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol; curva III= $9,5x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ e curva IV $2,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$.

O exame da referida figura indica que os picos de redução, em potenciais ao redor de -0,8V (pico B) e -0,95V (pico C), atribuídos a redução dos dois grupos monoclorotriazina, do corante original (curva I) são diminuídos em função da adição sucessiva do fármaco (curvas II a IV), concomitante ao aumento da onda de redução do clotrimazol derivatizado (pico D). Em concentração $\geq$ $2,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de

clotrimazol, observa-se total supressão dos picos atribuídos ao centro quimicamente reativo do corante (clorotriazina), seguido de ligeira distorção na redução do grupo azo.

Segundo a literatura (Hoogerheide & Wika, 1982), clotrimazol é estável em meio neutro e alcalino. Entretanto, em meio ácido pode sofrer hidrólise, produzindo imidazol e o álcool (o-clorofenil) difenil- metanol, segundo o esquema 3.3.



Esquema 3.3: Esquema de hidrólise ácida do clotrimazol. a) clotrimazol; b) imidazol; c) (o- clorofenil) difenil - metanol (Hoogerheide & Wika, 1982),

Dentro deste contexto, investigou-se a seguir, o comportamento polarográfico do corante RR 120 na presença do imidazol e do álcool trifenil metanol a fim de diagnosticar se o centro triazina do corante estaria reagindo com o clotrimazol na forma pura ou com produtos provenientes da sua forma hidrolisada.

Embora seja conhecido na literatura (Bard & Lund, 1973), que imidazol não sofre redução polarográfica em meio aquoso, foram realizados alguns experimentos para confirmar sua influência nos polarogramas obtidos na presença de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. Variação de imidazol na faixa de concentração entre $5x10^{-4}$ a $1x10^{-3}$ mol.L^{-1} não apresenta interferência nos picos de redução do cromóforo, o que extingue a hipótese de sua participação.

A seguir investigou-se a influência do álcool trifenil metanol em solução tampão B-R pH 2,0 nas curvas polarográficas de pulso diferencial do corante RR 120. Adições do álcool no intervalo de concentração entre $1x10^{-4}$ a $7,5x10^{-4}$ mol.L^{-1} também não apresentaram nenhuma mudança nos picos de redução do cromóforo. Estes resultados mostram que os principais produtos de uma hidrólise ácida de clotrimazol não seriam responsável pelo pico extra na redução do corante.

Considerando que a ocorrência dos grupos triazinas presentes no corante poderiam ser passíveis de reações específicas com o álcool utilizado para dissolução da fármaco, investigou-se a seguir o efeito da adição de metanol entre 200 a 1.000 µL sobre a redução do corante em concentração fixa em $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} em solução tampão B-R pH 2,0. Os resultados obtidos não indicaram a ocorrência de nenhum pico na região de potencial do composto derivatizado, indicando que o álcool não seria responsável pela ocorrência do pico extra diagnosticado previamente.

Diante dos dados acima apresentados, pode-se concluir que clotrimazol interage com o corante reativo red 120 através da interação do grupamento imidazólico da droga com o grupo triazínico do cromóforo pela substituição do cloro (R-Cl) e conseqüente eliminação do cloreto, segundo reações rotineiras do corante conhecidas na literatura para moléculas protonadas de grupos aminas e grupos hidroxilas (Gulrajani, 1993).

3.4.4 - ESTEQUIOMETRIA DO COMPOSTO DERIVATIZADO.

O efeito da variação da concentração do corante RR 120 na formação do composto foi investigado visando estabelecer a estequiometria do novo composto obtido pela reação entre clotrimazol e RR 120 em meio ácido.

Os valores de corrente de pico catódico obtido nos polarogramas correspondentes ao sistema, onde manteve-se constante a concentração do corante em $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ e variou-se a concentração de clotrimazol entre $2,9x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ a $1,5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ em solução tampão B-R pH 2,0 são mostrados na Figura 3.26. Para melhor visualização, o gráfico mostra os valores de corrente de pico da onda “A” e “D” em função dos valores da razão molar entre as concentrações da droga e corante.

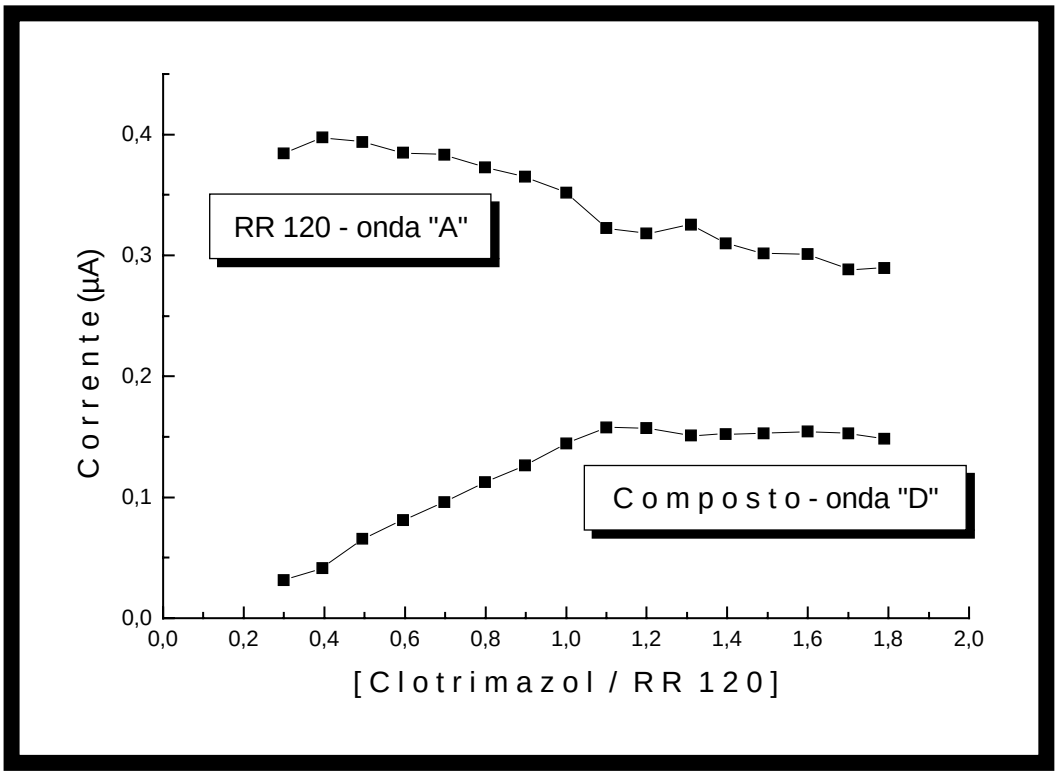


Figura 3.26: Efeito da razão molar sobre a corrente de pico das ondas polarográficas obtidas para o sistema clotrimazol /RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0.

A análise desta figura mostra que aumentando-se a concentração de clotrimazol entre $3x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ a $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ observa-se um aumento linear de corrente de pico da droga derivatizada (pico D) entre valores da razão molar de 0,3 a 1,0, aproximadamente, seguido de valores aproximadamente constantes em regiões superiores. Simultaneamente, observa-se apenas uma ligeira diminuição na corrente do pico “A” (redução da função azo presente tanto no corante original quanto no composto derivatizado)

atribuídos a efeitos de diluição. Estes resultados sugerem que o novo composto formado segue uma relação 1:1.

Em concentração fixa do corante em $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} e adições de clotrimazol entre $2x10^{-5}$ mol.L^{-1} a $1x10^{-4}$ mol. L^{-1} observa-se um deslocamento do potencial de pico para valores menos negativos em função do aumento na concentração do fármaco entre $2x10^{-5}$ mol.L^{-1} a $4x10^{-5}$ mol.L^{-1} mantendo-se constante em valores superiores de concentração. Esta relação pode ser melhor visualizada na Figura 3.27 quando valores de Epc vs log [clotrimazol] mostram uma relação linear de 159 mV.

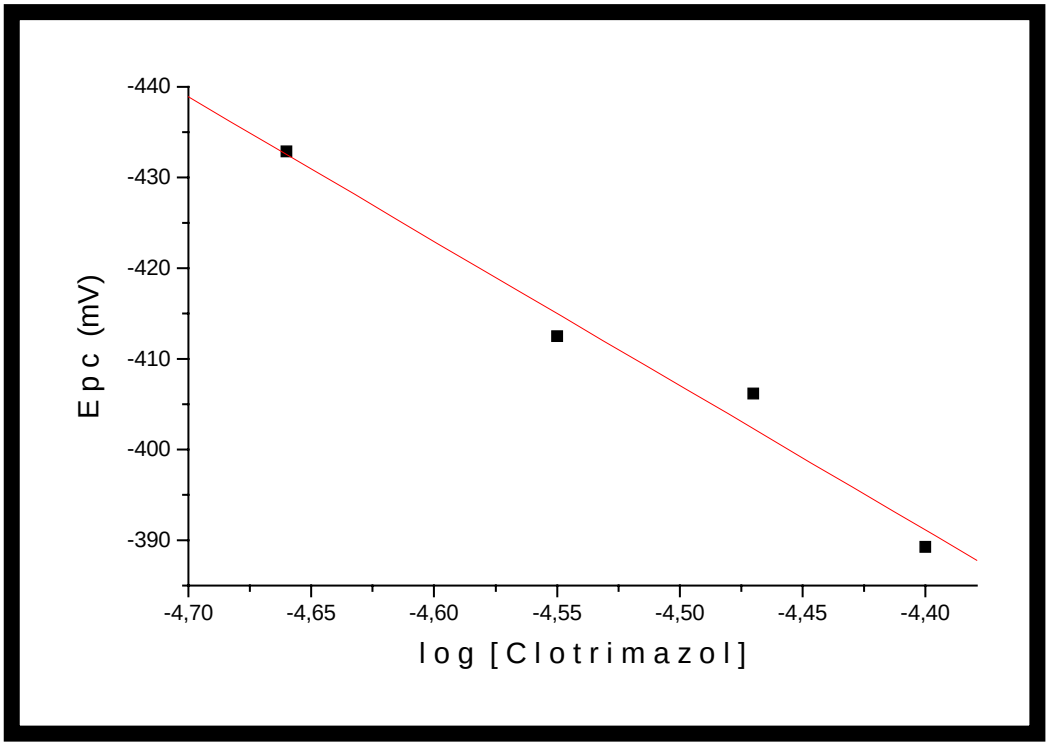


Figura 3.27: Relação entre potencial de pico e logarítmo da concentração de clotrimazol no intervalo de $2x10^{-5}$ mol.L^{-1} a $4x10^{-5}$ mol.L^{-1} e concentração do corante RR 120 fixo em $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} em solução tampão B-R pH 2,0.

Os valores de ($W_{1/2}$) obtidos dos polarogramas de redução do composto derivatizado utilizando-se $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol na presença de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de RR 120, apresentam valores médios igual a 89,1 mV. Segundo a literatura (Bard, 1980), a largura da onda é função da seguinte expressão: $W_{1/2} = \Delta E/\alpha n$, onde ΔE= amplitude de pulso e αn= coeficiente de transferência eletrônica do processo. Deste modo, considerando os valores de $W_{1/2}$ obtidos da onda do composto derivatizado obtidos de polarogramas registrados a uma amplitude de pulso de 50 mV estima-se um valor de αn= 0,56 para o processo de redução do composto.

De acordo com a literatura (Meloan & Kiser, 1973) processo eletródico envolvendo reações químicas precedentes à transferência eletrônica apresentam deslocamento nos valores de potencial de meia onda ($E_{1/2}$) em função da concentração do substrato. Em reações envolvendo a formação de complexo, esta relação é dada por: $\Delta(E_{1/2})/\Delta \log[x] = 59,15/\alpha n.P$, onde P é o número de ligantes e x= concentração do substrato. Deste modo, de acordo com a referida relação e substituindo os valores de $E_{1/2}$ por Epc (potencial de pico catódico), obteve-se valor de P=0,7 para o complexo. Este resultado poderia ser indicativo de que provavelmente um composto na proporção de 1:1 deve estar se formando confirmando os diagnósticos polarográficos prévios.

3.4.5 - ESTABILIDADE DO COMPOSTO.

A influência da temperatura na estabilidade do composto derivatizado foi investigada utilizando-se concentrações fixas do corante em $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ e clotrimazol em $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$, utilizando-se aquecimento de 30 minutos e variando-se a temperatura de 10 em 10^{o}C. As curvas polarográficas foram obtidas após resfriamento das amostras em condições ambientais. Os valores de corrente de pico em função da temperatura de aquecimento mostram que o composto formado apresenta valores de corrente praticamente constante até 70^{o}C, porém nítida diminuição de corrente é observada em valores de temperatura superiores, sugerindo degradação do composto. Deste modo, escolheu-se a temperatura ambiente para análise de clotrimazol.

A estabilidade do composto formado entre RR 120 e clotrimazol em função do tempo foi investigado utilizando-se concentração de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante e $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R pH 2,0. Os polarogramas de pulso diferencial foram registrados em intervalos de 5 minutos durante 250 minutos sob agitação e posterior leitura. A curva correspondente obtida para o pico “A” (redução do grupo azo) e pico “D” (redução de clotrimazol derivatizado) mostra que o sinal polarográfico do composto não apresenta mudança significativa no intervalo de tempo monitorado indicando grande estabilidade do composto.

3.4.6 - CURVA ANALÍTICA.

O efeito da concentração de clotrimazol sobre a corrente de pico do composto derivatizado com o corante RR 120 foi investigado em solução B-R pH 2,0.

Utilizando-se uma concentração fixa do corante em $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$, obtém-se uma relação linear entre corrente de pico e concentração do fármaco no intervalo de 10,00 a 34,14 $\mu g.mL^{-1}$, segundo a equação ipc(μA)= 0,0116 + 0,00485C, onde C= concentração em $\mu g.mL^{-1}$, conforme pode ser observado na Figura 3.28. Um desvio da linearidade é observada em valores de concentração superiores do fármaco, como previsto para uma interação 1:1. Deste modo, utilizando-se concentrações superiores do corante para $2x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ ou $4x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ é possível ampliar o intervalo linear entre ip *vs* concentração do fármaco para 10 $\mu g.mL^{-1}$ a 69 $\mu g.mL^{-1}$, cujas relações são dadas pelas seguintes equações: ipc(μA)= -0,1476 + 0,01435C e ipc (μA)= -0,1883 + 0,01805C, onde C= concentração ($\mu g.mL^{-1}$), respectivamente.

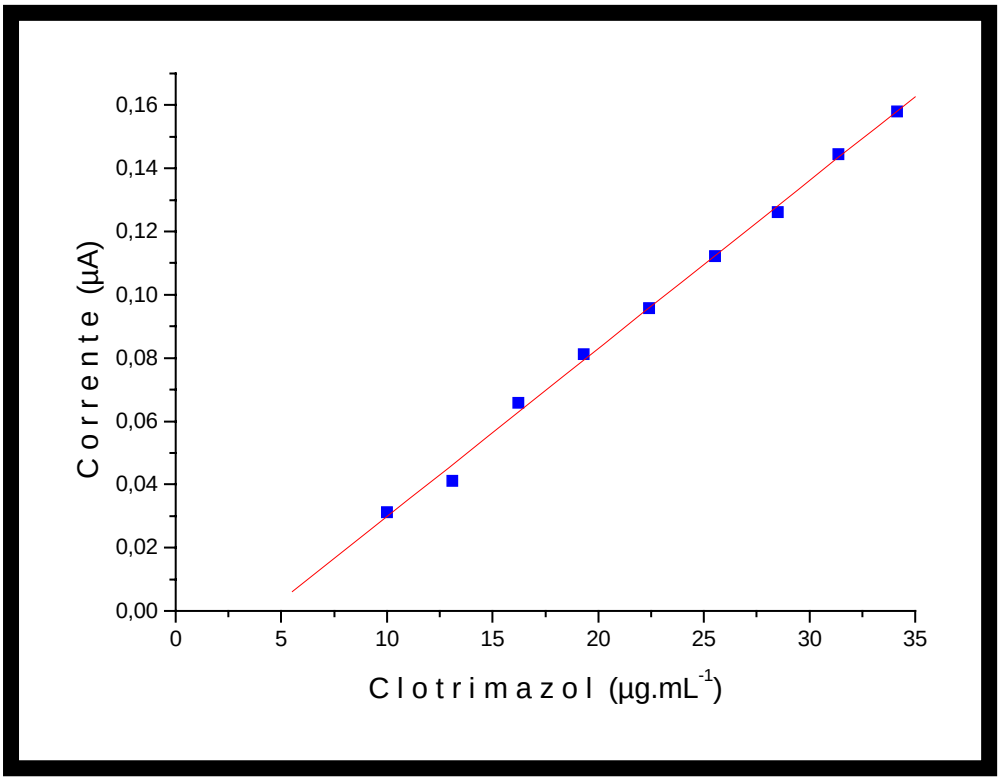


Figura 3.28: Curva de calibração para clotrimazol na presença de $1x10^{-4}$ mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução B-R pH 2,0.

A repetibilidade do sinal polarográfico foi investigado através de registros de polarogramas de 68µg.mL^{-1} de clotrimazol na presença de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0 (14 repetições). A média dos valores de i_{pc} = 0,33µA mostrou um desvio padrão de 0,01µA e coeficiente de variação calculado estatisticamente de 4,11%. Esses resultados mostram que o método apresenta satisfatória repetibilidade. O limite de detecção obtido estatisticamente foi estimado em 6,55 µg.mL^{-1} (Baccan, *et al*., 1979).

3.4.7 - APLICAÇÃO DO MÉTODO A OUTROS ANTIFÚNGICOS DA MESMA CLASSE DE FÁRMACOS.

Levando-se em consideração que o clotrimazol é um agente antifúngico imidazólico comercialmente disponível na forma pura ou combinada, testou-se a seguir a metodologia descrita para outros agentes da mesma família, com estrutura química semelhante, tais como, miconazol e tinidazol.

3.4.7. 1 - MICONAZOL.

A interação entre o antifúngico miconazol, 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-((2,4-diclorofenil) metoxi)etil)] -1H imidazol, cuja estrutura é mostrada na Figura 1.2, e o corante RR 120 foi investigada nas mesmas condições experimentais descritas para clotrimazol.

Polarogramas de pulso diferencial registrados para o corante RR 120 ($5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$) em solução tampão B-R pH 2,0 na ausência e presença de miconazol em concentração de $1x10^{-4}$ são mostrados na Figura 3.29.

A análise das curvas polarográficas mostra que também no caso do miconazol, a curva polarográfica do corante RR 120, quando na presença do fármaco, apresenta como característica um pico extra em potencial de -0,35V. Entretanto, a ocorrência de um deslocamento do pico do corante original também se faz presente (picos “A” e “C”). este fenômeno impede uma boa discriminação das ondas atribuídas à redução do grupo azo e da redução do grupo triazina substituido e inviabiliza sua utilização como método analítico para miconazol.

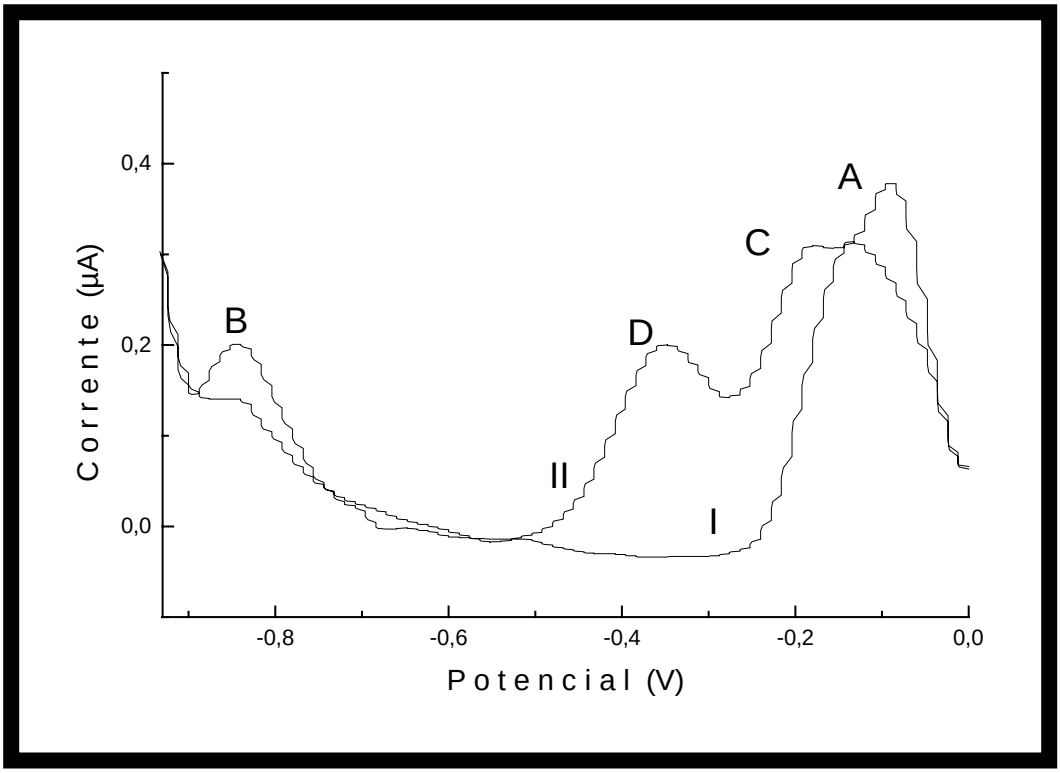


Figura 3.29: Polarogramas de pulso diferencial de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ miconazol na presença de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0 (Curva II); e curva I= redução do corante.

3.4.7.2 - TINIDAZOL.

O tinidazol, 1-[2-(etilsulfonil)etil] -2-metil-5-nitro-1H-imidazol, cuja estrutura é mostrada na Figura 3.30 é um agente vermicida da família dos imidazóis, dotado de um grupamente nitro diretamente ligado ao anel imidazólico.

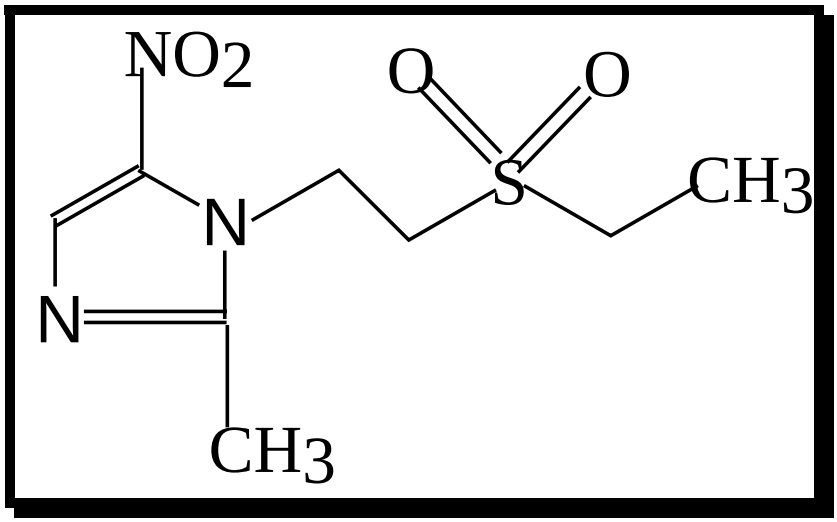


Figura 3.30: Fórmula estrutural do tinidazol.

Os polarogramas de pulso diferencial registrados na presença de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0 e concentração do tinidazol na faixa entre $1,5x10^{-4}$ a $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ são mostrados na Figura 3.31.

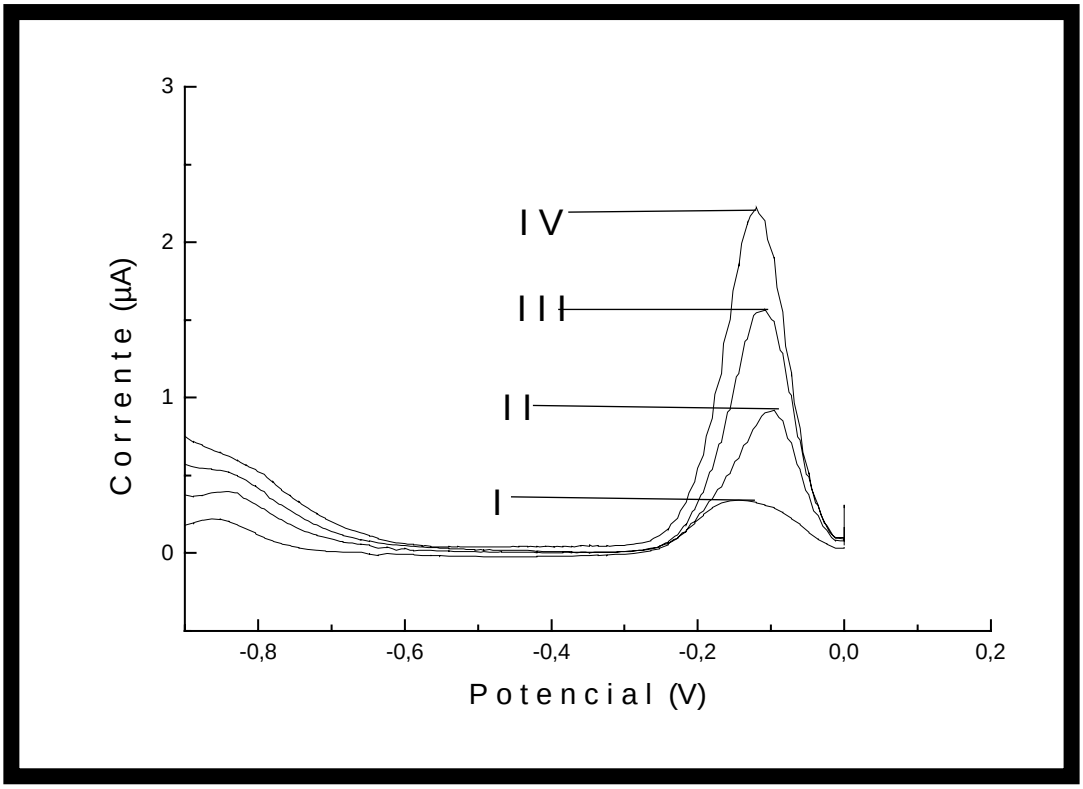


Figura 3.31: Polarogramas de pulso diferencial para tinidazol na presença de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. Curva I=RR 120, curva II= $1,5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de tinidazol, curva III= $3x10^{-4}$ mol.L^{-1} de tinidazol e curva IV=$5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de tinidazol.

A análise da referida figura não mostra evidências de novo pico atribuído ao produto de corante / clotrimazol, porém, o pico de redução atribuído à função azo do cromóforo aumenta com o aumento na concentração do fármaco, sugerindo que provavelmente o grupo nitro do composto seja reduzido no mesmo potencial do corante. Deste modo, o corante RR 120 não apresenta potencialidades analítica para análise de tinidazol.

3.4.8 - APLICAÇÃO ANALÍTICA.

Considerando que o método desenvolvido permite a determinação rápida e simples de clotrimazol em meio aquoso, nesta etapa do presente trabalho investigou-se a possibilidade de determinação do referido fármaco em formulações farmacêuticas denominadas por Canesten, solução spray a 1% produzido pelo laboratório Bayer S.A e Dermobene, solução tópica a 1% fabricado pelo laboratório Legrand.

As curvas polarográficas foram registradas diretamente pela adição de alíquotas de solução estoque de Canesten previamente preparada como descrito na parte experimental.

A Figura 3.32 mostra polarogramas de pulso diferencial obtidos após transferência de alíquotas de Canesten para uma solução tampão B-R pH 2,0 na presença de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante reactive red 120.

Uma curva linear entre corrente de pico e concentração de clotrimazol na amostra de Canesten, mostra que o excipiente contido na formulação farmacêutica não interfere significativamente no método.

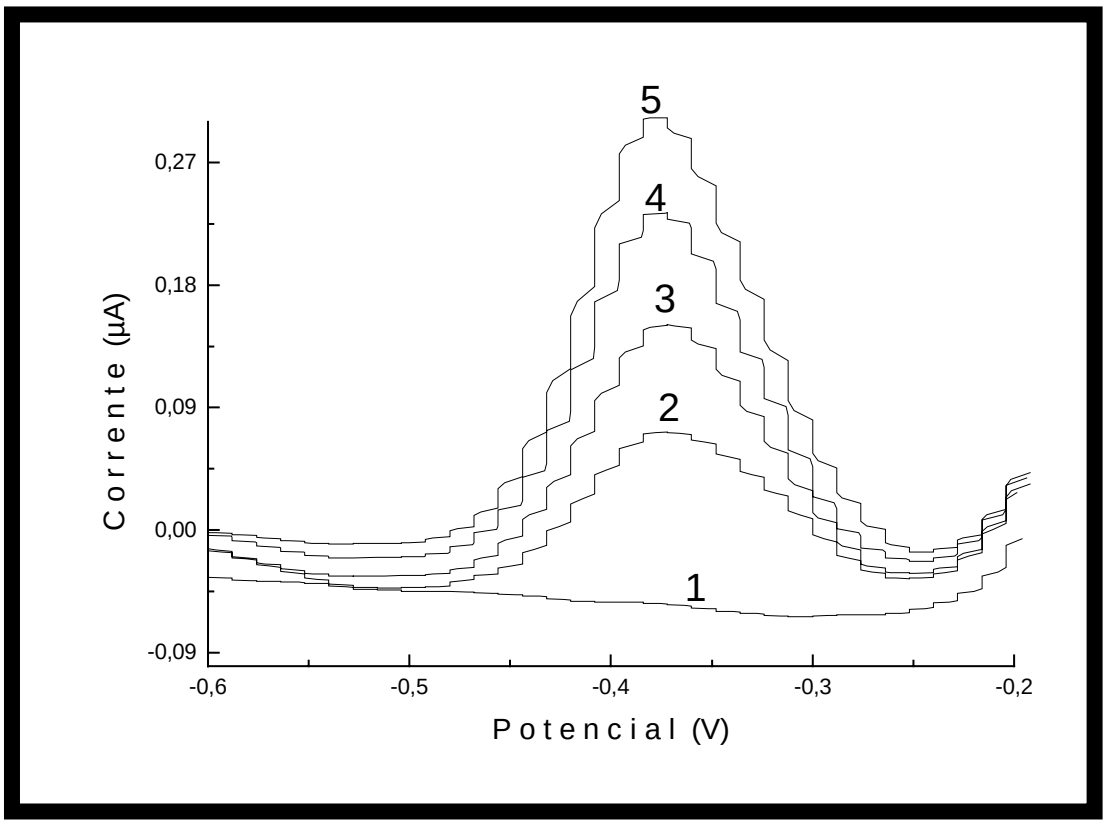


Figura 3.32: Polarogramas de pulso diferencial para Canesten na presença de RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0. Curva 1= sem Canesten; curva 2= 29,28 µg.mL^{-1}; curva 3=36,21 µg.mL^{-1}; curva 4= 46,55 µg.mL^{-1} e curva 5= 60,34 µg.mL^{-1}.

Os valores de correlação entre o valor informado pelo fabricante e os encontrados pelo método descrito para quantificação de clotrimazol no spray Canesten, foram obtidos pela interpolação das leituras de corrente nas curvas correspondentes da amostra na curva de calibração de clotrimazol em meio aquoso na presença de 5x10^{-4} mol.L^{-1} do corante RR 120, dada pela equação i_{pc} (µA)= 0,00564 + 0,02203 C, onde C= concentração em µg.mL^{-1} e r= 0,99705, mostraram valor médio de 99,4%, conforme é mostrado na Tabela 3.7.

A referida curva analítica foi escolhida para análise das formulações farmacêuticas por apresentar uma região linear entre corrente *vs* concentração no intervalo de 30 a 69 µg. mL^{-1} e maior sensibilidade em relação àquelas obtidas com concentrações inferiores a $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do cromóforo.

Tabela 3.7: Determinação de clotrimazol no spray Canesten através do método polarográfico.

Alíquota	Con. Nominal *	Con. Encontrada **	Correlação
(µL)	($\mu g.mL^{-1}$)	($\mu g.mL^{-1}$)	(%) ± DP
230	39,65	40,00	101 ± 0,003
250	43,10	42,76	99 ± 0,003
270	46,55	46,55	100 ± 0,001
290	50,00	50,69	101 ± 0,007
310	53,45	54,14	101 ± 0,007
330	56,89	54,83	97 ± 0,002
350	60,34	58,28	97 ± 0,002

*= concentração especificada pelo fabricante.

** = concentração encontrada utilizando o método descrito após diluição da alíquota na célula voltamétrica.

Coeficiente de variação = 1,82% (Baccan, *et al*., 1979).

DP= desvio padrão.

Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico baseado na formação de par-iônico de cor

amarela, entre clotrimazol e o corante alaranjado de metila em
meio ácido e posterior extração com clorofórmio (Osama & Pakinaz, 1993). O produto da extração é medido quantitativamente em comprimento de onda de máxima absorção a $\lambda_{max.}$= 422 nm. A análise da regressão da curva de Beer mostra boa correlação na faixa de concentração entre 2-14 $\mu g.mL^{-1}$. A reprodução do método acima descrito, possibilitou a construção de uma curva analítica para análise de clotrimazol, cuja equação da reta é dada por: A=0,00457 + 0,05143C, r=0,9888;onde C= concentração em ($\mu g.mL^{-1}$), conforme mostra a Figura 3.33. Os resultados obtidos utilizando-se o método espectrofotométrico descrito na literatura para quantificação de clotrimazol em formulação farmacêutica são mostrados na Tabela 3.8.

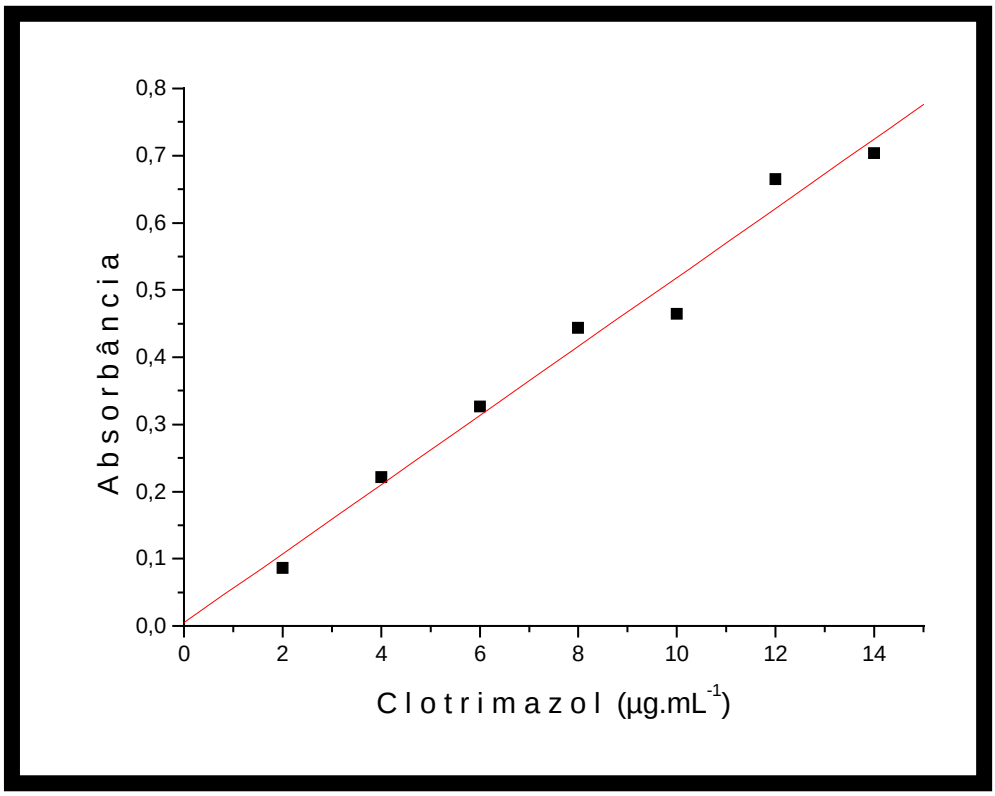


Figura 3.33: Curva analítica para determinação de clotrimazol pelo método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz, 1993).

Tabela 3.8: Determinação de clotrimazol no spray Canesten segundo o método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz, 1993)

Canesten	C*	C**	Correlação***
(spray)	(µg.ml^{-1})	(µg.mL^{-1})	(%) ± DP
	8,00	7,96	99,5 ± 0,001

* = concentração decrita pelo fabricante (Bayer S.A)

** = concentração encontrada.

***= média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

A análise da Tabela 3.8 mostra que nenhuma diferença significativa entre a correlação obtida pelos dois métodos utilizando a mesma amostra foi observada, embora o método espectrofotométrico apresente baixa estabilidade do complexo de par iônico e acrescenta uma longa etapa de extração.

Deste modo, é possível concluir que o método polarográfico envolvendo a derivatização de clotrimazol é simples preciso e reprodutível para determinação de clotrimazol em soluções tópicas comerciais.

O método proposto foi ainda aplicado, na análise de clotrimazol na formulação farmacêutica denominada por Dermobene, produzido pelo laboratório Legrand, como solução tópica a 1%. A amostra foi previamente tratada como descrito na parte experimental.

A Figura 3.34 mostra polarogramas de pulso diferencial obtidos do corante RR 120 em solução tampão B-R pH 2,0 na presença de 41,38µg.mL^{-1} de Dermobene. A análise da referida figura indica que o composto farmacêutico é reduzido na superfície da gota de mercúrio no eletrodo capilar no mesmo potencial em que se observa a redução do clotrimazol, comprovando a ocorrência do princípio ativo .

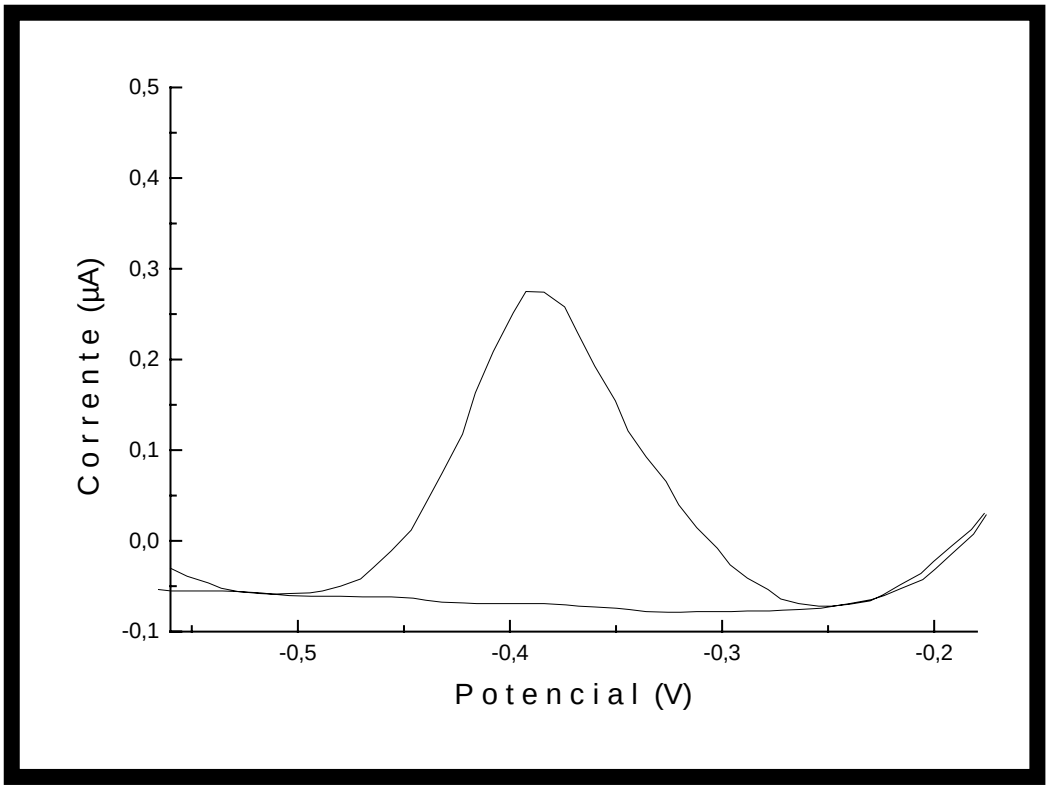


Figura 3.34: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para amostra de 41,38µg.mL^{-1} de Dermobene em solução tampão B-R pH 2,0 (curva II). Curva I= 5x10^{-4} mol.L^{-1} de RR 120.

Os resultados obtidos para Dermobene utilizando-se a metodologia previamente descrita estão exibidos na Tabela 3.9. A análise destes resultados mostram uma correlação média de 148% mostrando que a concentração de clotrimazol encontra-se bastante superior ao designado pelo fabricante.

Tabela 3.9: Determinação do teor de clotrimazol na solução tópica comercializada como Dermobene.
Método proposto.

Alíquota	C* nominal	C** encontrada	Correlação***
(µL)	($\mu g.mL^{-1}$)	($\mu g.mL^{-1}$)	(%) ± DP
240	41,4	62,0	149 ± 0,006
260	44,8	66,2	147 ± 0,003
280	48,3	71,8	148 ± 0,005
300	51,7	76,2	147 ± 0,004

* = concentração especificada pelo fabricante.
** = concentração encontrada.
***= média para 3 determinações.
Coeficiente de variação= 0,46% (Baccan *et al*., 1979)
DP= desvio padrão.

Os dados comparativos obtidos utilizando-se o método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz, 1993), na quantificação de clotrimazol na formulação farmacêutica denominada por Dermobene, são mostrados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Determinação de clotrimazol na solução tópica de Dermobene.
Método espectrofotométrico (Osama & Pakinaz, 1993).

Dermobene	C*	C**	Correlação***
(solução)	($\mu g.mL^{-1}$)	($\mu g.mL^{-1}$)	(%) ± DP
	4,00	5,08	127 ± 0,001

*= concentração descrita pelo fabricante.

**= concentração encontrada.

***= média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

Também o método espectrofotométrico mostra que o teor do principio ativo (clotrimazol) na formulação farmacêutica denominada por Dermobene produzido pelo laboratório Legrand, está muito acima do valor especificado pelo fabricante. A ligeira discrepância entre as correlações envolvendo o método proposto e o espectrofotométrico poderia ser atribuída à baixíssima estabilidade do complexo de par iônico formado entre clotrimazol e o corante alaranjado de metila ou ainda ao grande número de excipientes contidos na referida formulação farmacêutica.

3.5. - ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA DE CLOTRIMAZOL.

3.5.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.

Os estudos preliminares sobre a investigação do comportamento eletroquímico do clotrimazol em meio aquoso mostra que a redução do fármaco sobre eletrodo de mercúrio é acoplada a forte efeito de adsorção que promove algumas anomalias na forma das ondas polarográficas. Considerando que a adsorção do analíto sobre a superfície da gota de mercúrio no eletrodo capilar é o princípio básico da técnica voltamétrica de redissolução catódica, investigou-se a seguir, o comportamento voltamétrico de redissolução catódica do clotrimazol visando estabeler um método eletroanalítico para monitoramento da droga em níveis de traços.

3.5.2 - COMPORTAMENTO ADSORTIVO DE CLOTRIMAZOL.

O efeito da pré-concentração sobre os voltamogramas de redissolução catódica de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol obtidos sob potencial de acúmulo de -0,2 V e velocidade de varredura de 100 $mV.s^{-1}$ pode ser observado na Figura 3.35. Um aumento crescente da corrente de pico em função do aumento do tempo de acúmulo (Tac), sugere que o fármaco é espontaneamente acumulado na superfície do eletrodo de mercúrio.

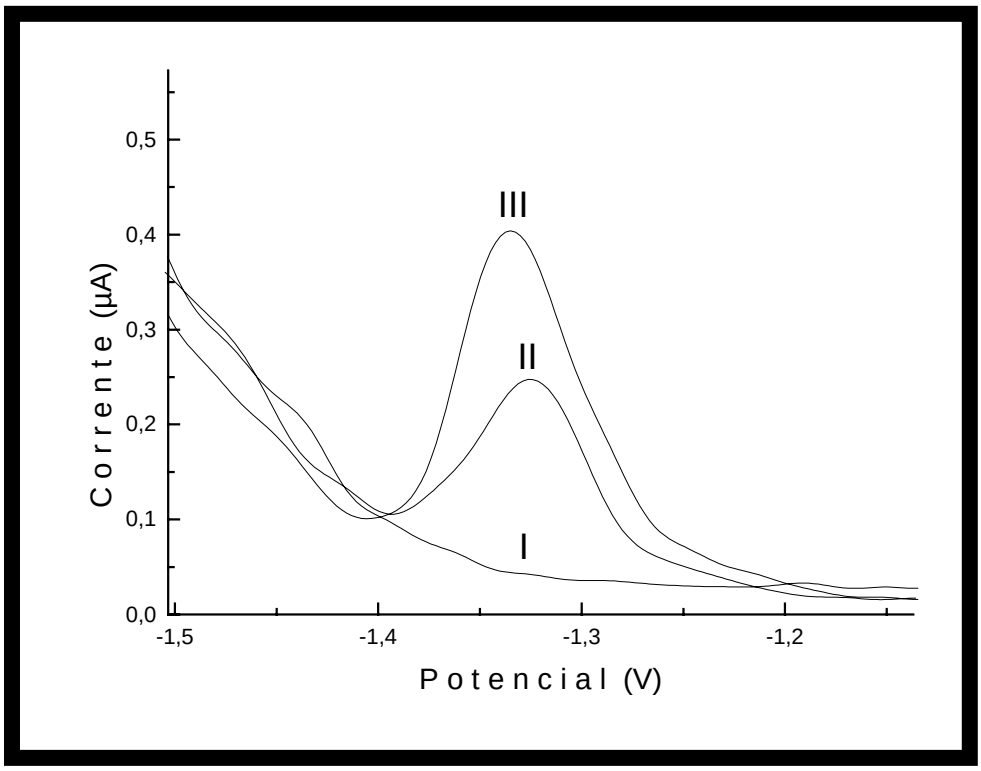


Figura 3.35: Voltamogramas de redissolução catódica obtidos com varredura linear para $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V e υ= 100 mV.s^{-1}. Curva II= Tac de 30s; curva III= Tac de 90 s e curva I= eletrólito suporte em Tac= 30 s.

3.5.3 - INFLUÊNCIA DO pH E COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE.

A influência do pH sobre o potencial de pico e corrente de pico catódico foi investigado em solução tampão B-R em ampla faixa de 2,0 ≤ pH ≤ 12,0, utilizando-se concentração de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol, tempo de acúmulo de 120 s, velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} e potencial de acúmulo de 0 V.

Clotrimazol é reduzido sobre eletrodo de gota pendente de mercúrio, somente na faixa de 6,0 ≤ pH ≤ 10,0

A influência do pH sobre o potencial de pico de redução neste intervalo mostra que os valores de Ep mantêm-se constantes no intervalo de pH de 6,0 a 9,0 e apresentam ligeiro deslocamento para valores menos negativos de potencial em valores de pH superior, conforme observado nos experimentos de polarografia de pulso diferencial.

A influência do pH sobre a corrente de pico catódico obtido para clotrimazol é mostrado na Figura 3.36. A corrente de pico é diminuida na faixa de 6,0 ≤ pH ≤ 8,0 e mantém-se aproximadamente constante em valores de pH superiores a 8,0; mostrando que melhores intensidade de corrente são obtidos na região de pH neutro.

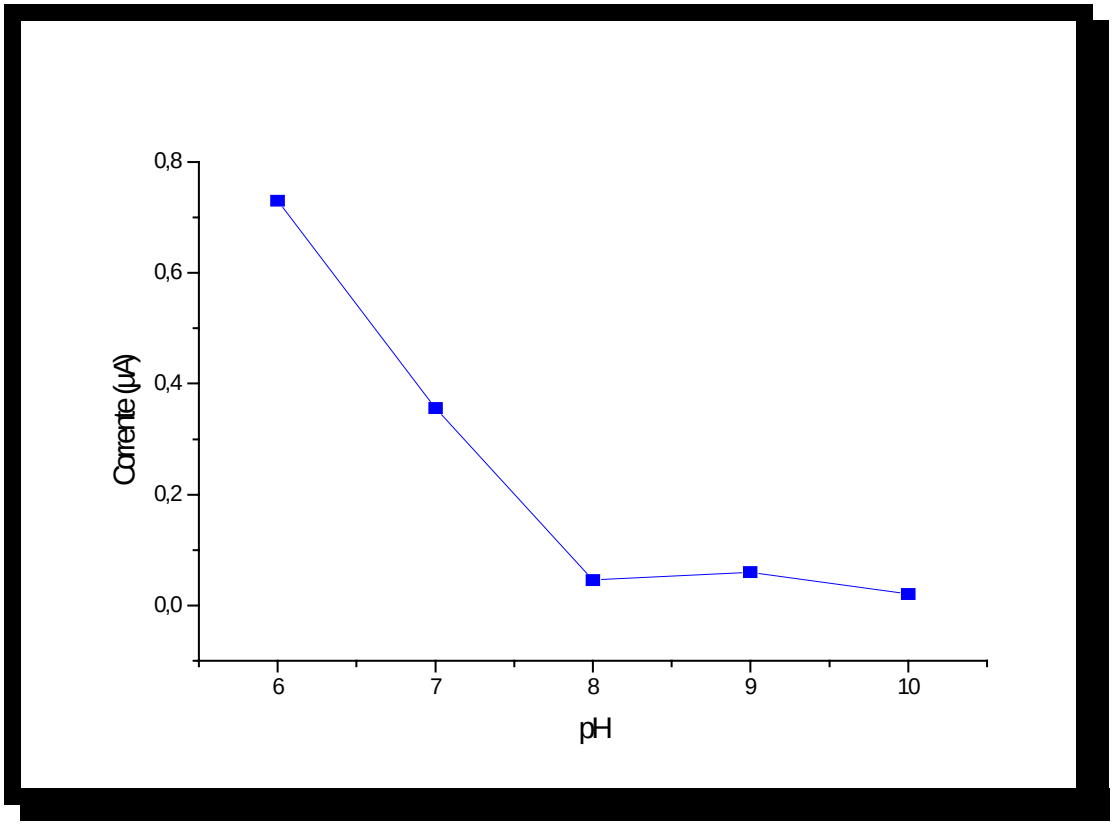


Figura 3.36: Influência da variação do pH sobre a corrente de pico obtido para $1x10^{-6}mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão B-R após pré-acúmulo de120s;Eac= 0,0V,υ=100mV.s^{-1}.

O efeito da composição da solução tampão sobre a forma e a intensidade de corrente das ondas foi investigado comparando-se os valores de corrente obtidos em solução tampão B-R e fosfato.

A intensidade das ondas registradas para clotrimazol em solução tampão fosfato mostra valores praticamente constantes entre 6,3 ≤ pH ≤ 6,9 e nítida diminuição em valores de pH superiores. Embora melhores leituras de corrente tenham sido obtidas no sistema B-R, escolheu-se o

meio tampão fosfato, pH 6,9 para investigação do fármaco

por apresentar melhor definição da onda voltamétrica em relação à proximidade da descarga do eletrólito suporte, como mostra a Figura 3.37.

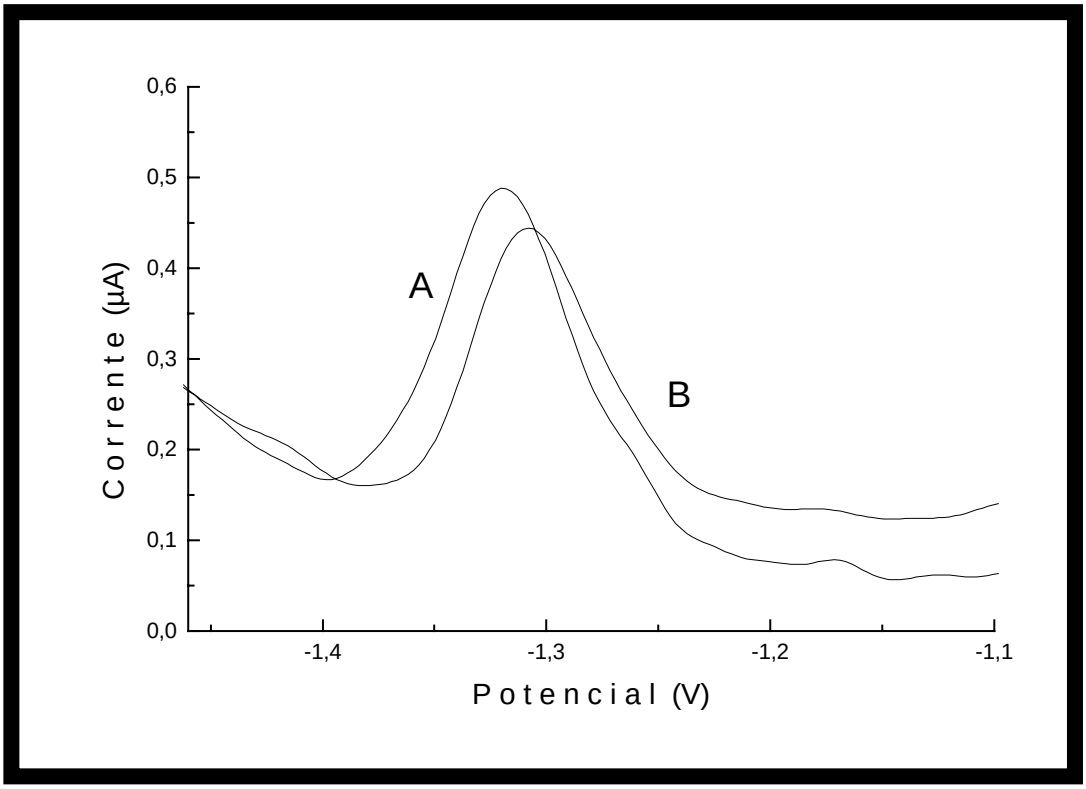


Figura 3.37: Voltamogramas de redissolução adsortiva para $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em soluções tampão B-R pH 7,0 (curva A) e tampão fosfato pH 7,0 (curva B);Tac= 120s; Eac=0V; υ= 100mV.s^{-1}.

3.5.4 - INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DA VARREDURA.

A influência da velocidade de varredura sobre o sinal voltamétrico de redissolução adsortiva do sistema $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 foi investigado utilizando-se tempo de pré-concentração de 120 s e potencial de acúmulo de 0V, em velocidades de varredura entre $10mV.s^{-1}$ a $1.000mV.s^{-1}$.

A Figura 3.38 mostra uma relação linear entre corrente vs raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo entre 5 à $500mV.s^{-1}$, porém não intercepta a origem dos eixos cartesianos indicando que o processo não é controlado por difusão. Velocidade de varredura de 100 $mV.s^{-1}$ foi escolhido como melhor condição experimental para análise voltamétrica do fármaco.

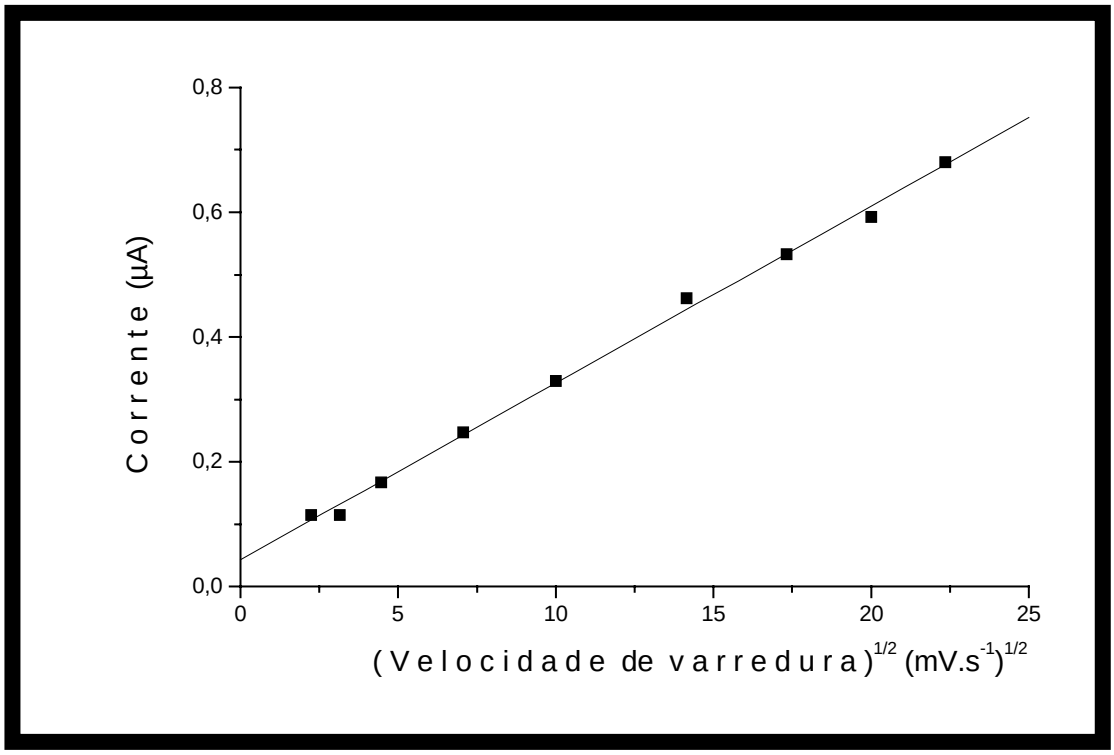


Figura 3.38: Influência da Velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica de voltamogramas obtidos de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, Tac= 120s; Eac= 0,0V.

3.5.5 - INFLUÊNCIA DO POTENCIAL DE ACÚMULO.

A influência do potencial de acúmulo sobre a corrente de pico correspondente à redução de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, obtido após pré-concentração de 120 s é mostrada na Figura 3.39.

O sistema apresenta nítida ascensão do sinal monitorado até um potencial de acúmulo de -0,2 V mostrando patamar praticamente estável entre -0,2 V e -0,7V

com decréscimo de corrente em valores mais negativo de potencial de acúmulo. Este comportamento sugere dessorção parcial da droga sobre a gota pendente de mercúrio em potenciais próximos da redução do fármaco. Desta forma, escolheu-se -0,2V como melhor potencial de acúmulo para pré-concentrar clotrimazol.

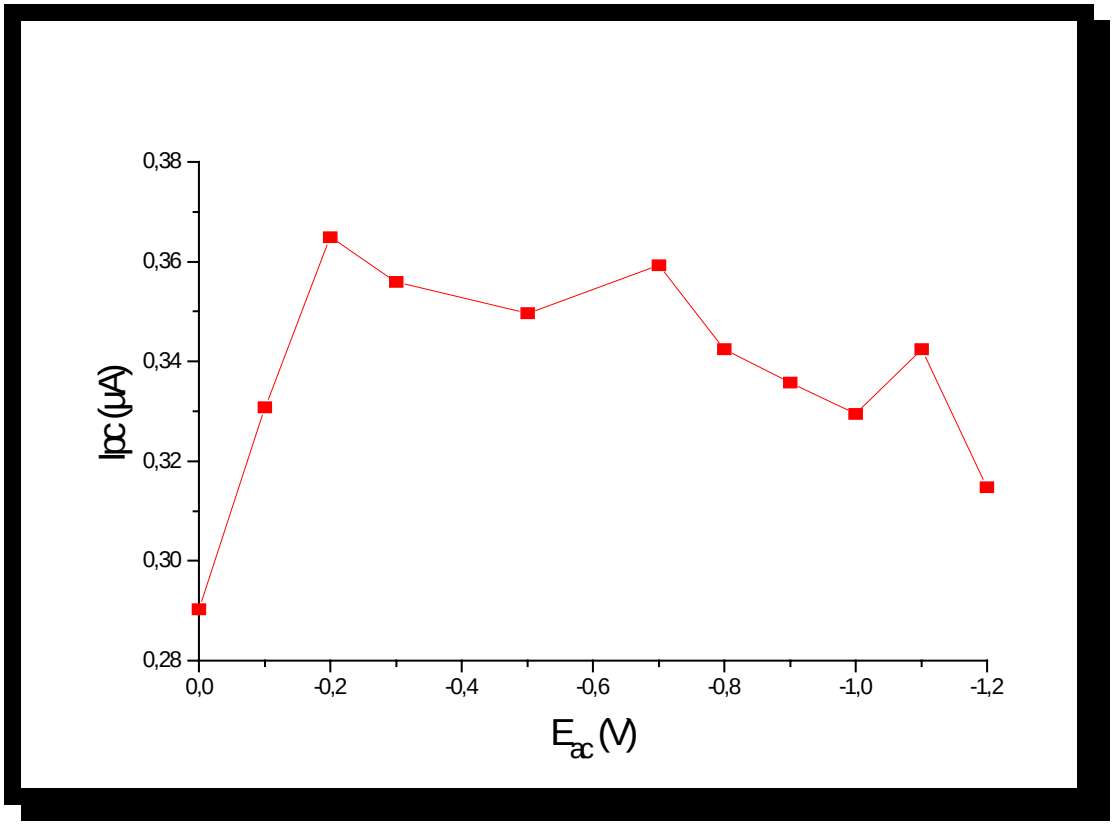


Figura 3.39: Influência do Eac sobre a corrente de pico catódico de voltamogramas obtidos de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9; υ= 100mV.s^{-1}, Tac= 120 s.

3.5.6 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ACÚMULO.

O efeito do tempo de acúmulo sobre a altura do pico de redução de clotrimazol foi investigado em dois valores de concentração do fármaco: $5x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ e $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 6,9, como mostra a Figura 3.40 A análise da curva (a), obtida para concentração de $5x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ do fármaco mostra que a corrente de pico aumenta linearmente entre zero a 240s. Entretanto, a mesma relação linear foi observada apenas entre zero à 90s para $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ do fungicida como mostra a curva (b) da Figura 3.40. Ambas as curvas são seguidas de um patamar em tempos de acúmulo maiores indicando a saturação do sistema em longos tempos de pré-concentração. Estes resultados mostram que, para concentrações mais baixas, o uso de tempos de acúmulo maiores pode aumentar a sensibilidade do sistema, porém, tempos de acúmulo menores podem propiciar maiores intervalos lineares na curva de calibração.

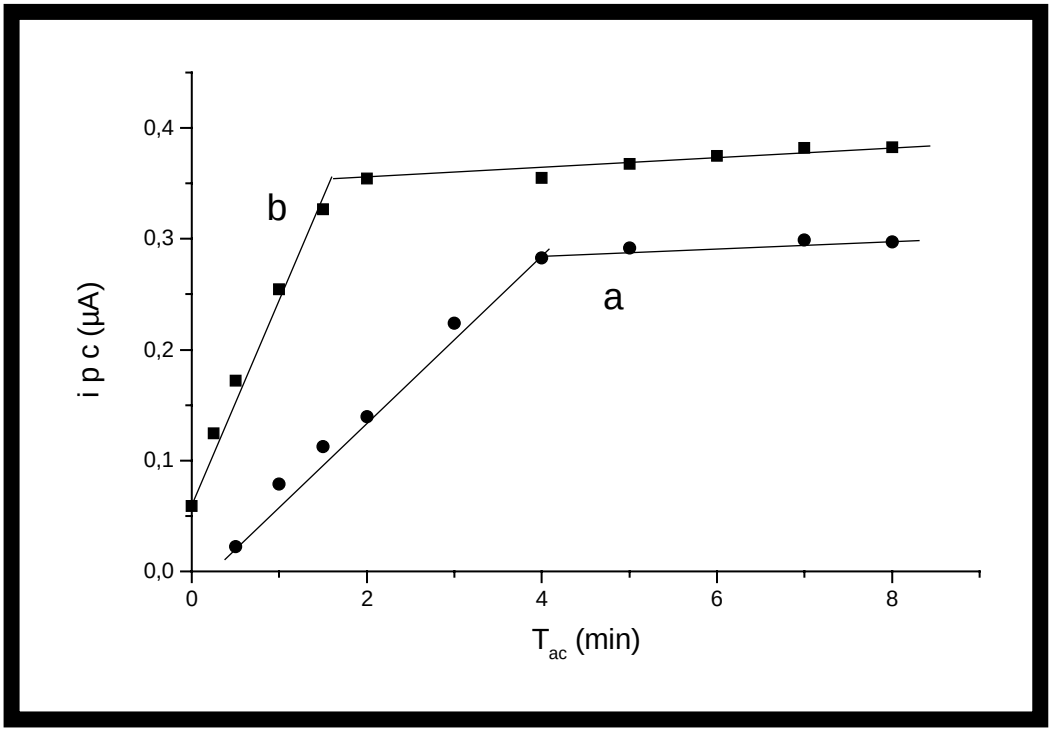


Figura 3.40: Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico catódico obtido de voltamogramas de $5x10^{-7}$ mol.L^{-1} (curva a) e $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de clotrimazol, (curva b), em solução tampão fosfato pH 6,9; υ= 100mV.s^{-1} e Eac= -0,2V.

3.5.7 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Utilizando-se as melhores condições experimentais anteriormente estabelecidas construiram-se curvas de calibração para clotrimazol em dois tempos de acúmulo: 180s e 60s em solução tampão fosfato pH 6,9, potencial de acúmulo de -0,2V e υ= 100mV.s^{-1}. Estas curvas são mostradas nas Figuras 3.41 e 3.42, respectivamente. Utilizando-se tempo de acúmulo de 180 s, (Figura 3.41), observa-se um

aumento linear entre corrente de pico *vs* concentração da droga, apenas no intervalo de 48,3 a 172,0 ng.mL^{-1}, exibindo rápida saturação do eletrodo em concentrações superiores. Entretanto, utilizando-se de tempo de pré-concentração de 60s, (Figura 3.42), obtém-se uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de clotrimazol em todo o intervalo de 103 ng.mL^{-1} a 345 ng.mL^{-1}. Estes resultados mostram que a técnica voltamétrica de redissolução catódica apresenta grandes potencialidades analíticas para monitoramento de clotrimazol em meio aquoso.

A repetibilidade do método foi obtida utilizando-se nove medidas das curvas voltamétricas obtidas para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9, Tac= 60s e Eac= -0,2V, cujos valores de corrente apresentaram coeficiente de variação de 4,62%. O limite de detecção calculado estatisticamente apresenta valor de 5 ng.mL^{-1} (Baccan*, et al*., 1979).

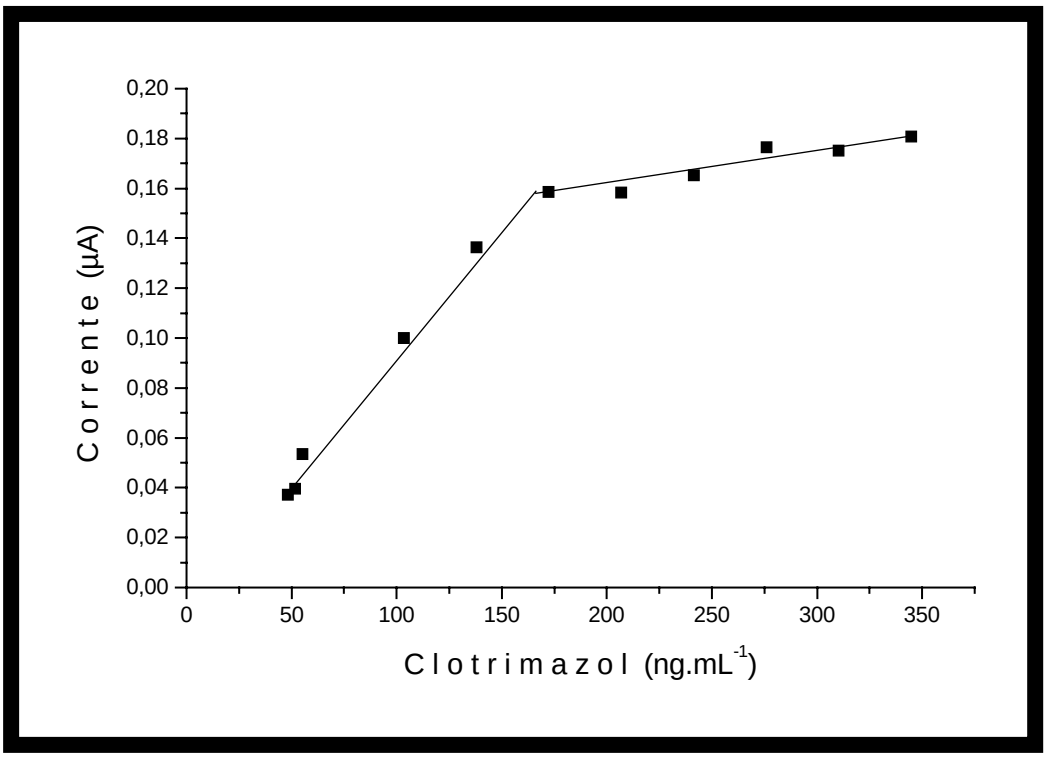


Figura 3.41: Curva de calibração obtida do sistema em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V; υ=100mV.s^{-1}, Tac de 3 minutos.

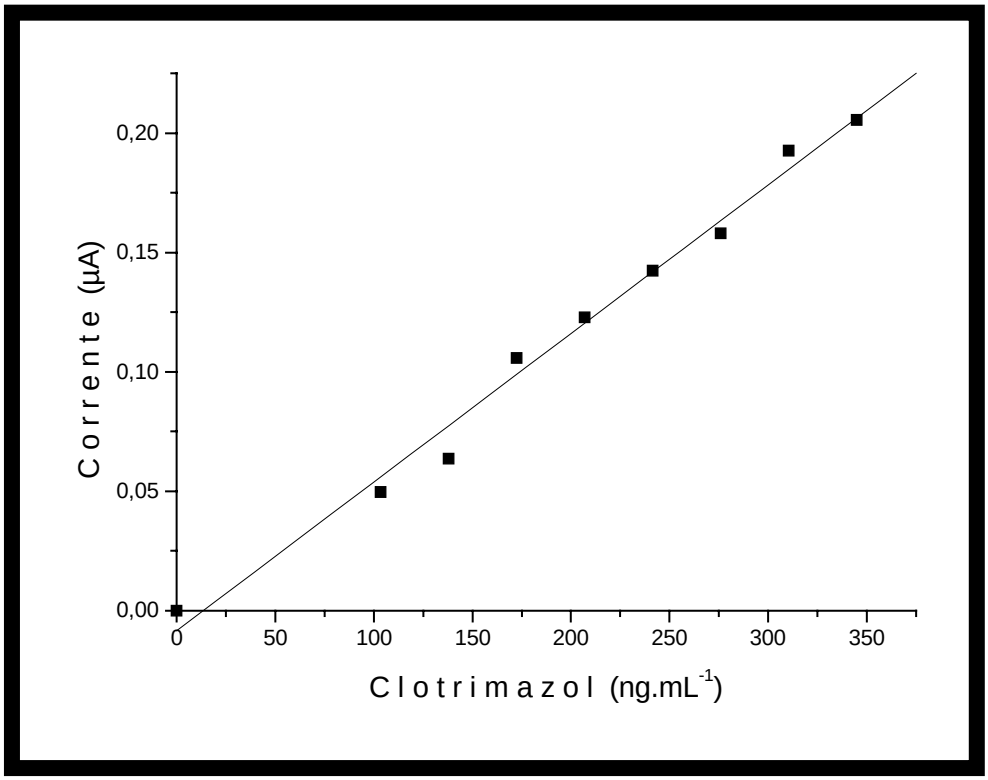


Figura 3.42: Curva de calibração obtida do sistema em solução tampão fosfato pH 6,9; Eac= -0,2V; υ=100mV.s^{-1},Tac de 1minuto.

3.5.8 - APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.

A seguir testou-se o método desenvolvido para análise de clotrimazol na formulação farmacêutica denominada por Canesten, disponível comercialmente na forma de spray produzido pelo laboratório Bayer S.A

Utilizando-se as melhores condições experimentais anteriormente descritas: Eac= -0,2V; Tac= 60s, υ= 100mV.s^{-1} e eletrólito suporte solução tampão fosfato pH 6,9.

Alíquotas da respectiva amostra, preparadas conforme descrito na parte experimental foram diretamente removidas da solução estoque e adicionadas ao eletrólito suporte.

Os respectivos valores correspondentes ao especificado pelo fabricante e aquele obtido através da técnica voltamétrica são mostrados na Tabela 3.11. Os dados apresentados foram obtidos por interpolação das leituras de corrente registradas nas amostras de Canesten na curva de calibração mostrada na Figura 3.42, cuja equação da reta é: ipc (μA)= -0,02511 + 0,00069C, onde C= concentração ($ng.mL^{-1}$) e R= 0,99375.

Tabela 3.11: Resultados obtidos na determinação de clotrimazol em amostras comerciais de Canesten (spray) através do método voltamétrico de redissolução.

alíquota	C *	C **	Correlação***
(μL)	($ng.mL^{-1}$)	($ng.mL^{-1}$)	(%) ± DP
160	276	261	95 ± 0,010
200	345	352	102 ± 0,020

* = concentração especificada pelo fabricante.

** = concentração encontrada.

***= média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

Os resultados obtidos através do método voltamétrico foram comparados com o método espectrofotométrico proposto por (Osama & Pakinaz, 1993), para a mesma amostra comercial de Canesten; estes resultados são mostrados na Tabela 3.8. A análise das referidas tabelas

mostram que os valores de correlação obtidos entre ambos os métodos apresentam valores próximos, mostrando que o método proposto pode ser viável para quantificação de clotrimazol em níveis de traços em formulações farmacêuticas, de modo muito mais rápido, simples e reprodutível do que o método espectrofotométrico.

3.6 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE MICONAZOL.

3.6.1 - COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO.

O antifúngico miconazol pertencente à mesma família do clotrimazol, apresenta em sua estrutura molecular um grupo imidazol e 2 grupos diclorofenila com características semelhantes ao clotrimazol.

A redução eletroquímica de miconazol foi investigada nas mesmas condições experimentais utilizadas para clotrimazol e o comportamento voltamétrico apresenta grandes similaridades.

A redução polarográfica de miconazol sobre eletrodo gotejador de mercúrio foi inicialmente investigada em solução tampão Britton-Robinson/metanol (1:1) 0,04 mol. L^{-1} na faixa de pH de 2,0 a 12,0. As ondas polarográficas de pulso diferencial obtidas para $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol são observadas apenas em meio alcalino pH $\geq$ 8,0. Um polarograma de pulso diferencial típico para miconazol em B-R pH 8,0 é mostrado na Figura 3.43.

O polarograma mostra um pico de redução em potencial altamente negativo e caracteriza-se pela falta de simetria. Os valores de metade da largura de pico a meia altura ($W_{1/4}$) = 37,0 mV obtido no lado do potencial mais negativo e ($W_{1/4}$) =51,8 mV no lado menos negativo totalizando 88,8 mV fornecem indícios de que o processo eletródico pode estar complicado por fenômeno de adsorção.

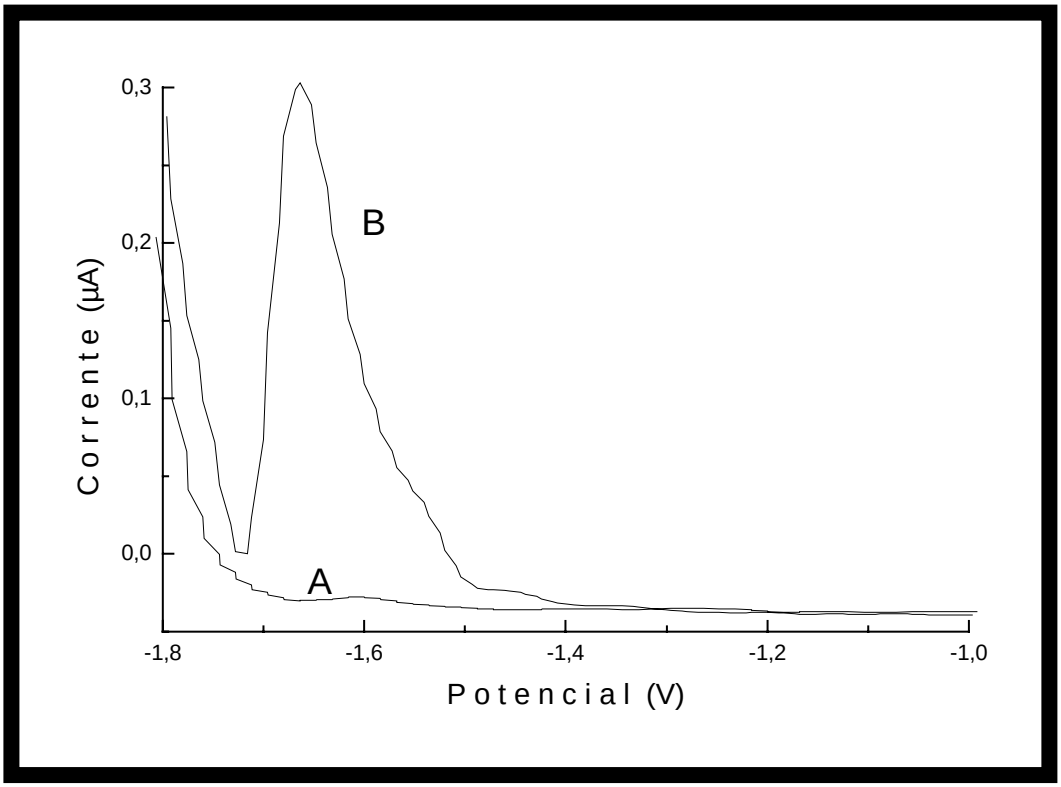


Figura 3.43: Polarogramas de pulso diferencial obtido para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 (curva B) e eletrólito suporte (curva A).

Em meio fortemente alcalino, pH 12,0 os polarogramas obtidos para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol (Figura 3.44) apresentam-se bem definidos em relação à descarga do eletrólito suporte, porém mostram uma corrente de pico nitidamente inferior ao observado em pH 8,0.

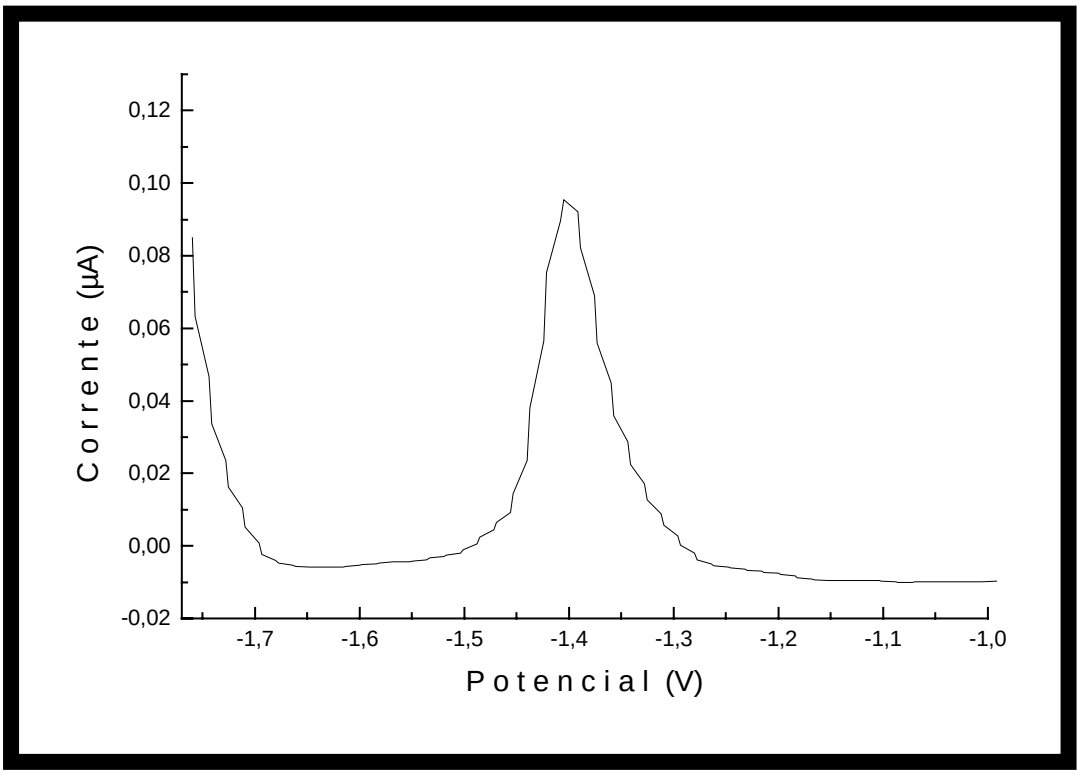


Figura 3.44: Polarograma de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ mol. L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 12,0.

3.6.2 - EFEITO DO pH E COMPOSIÇÃO DO ELETRÓLITO SUPORTE.

O efeito da variação do pH sobre o potencial de pico de redução de $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} do fármaco é mostrado na Tabela 3.12. O potencial de pico é visivelmente deslocado para valores menos negativo de potencial no intervalo $8,0 \leq pH \leq 10,0$ e se torna aproximadamente constante em valores de pH superior, como pode ser visualizado na Figura 3.45.

Tabela 3.12: Parâmetros polarográficos de pulso diferencial obtidos de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1).

pH	-Epc	Ipc
	(V)	(µA)
8,0	1,66	0,285
9,0	1,52	0,044
10,0	1,44	0,064
11,0	1,42	0,101
12,0	1,40	0,095

O deslocamento do potencial de pico catódico (Epc) em função do aumento nos valores de pH pode ser indicativo de que efeitos de adsorção ou formação de produtos insolúveis podem estar acoplados ao processo eletródico e é semelhante ao comportamento observado para clotrimazol o qual foi anteriormente discutido.

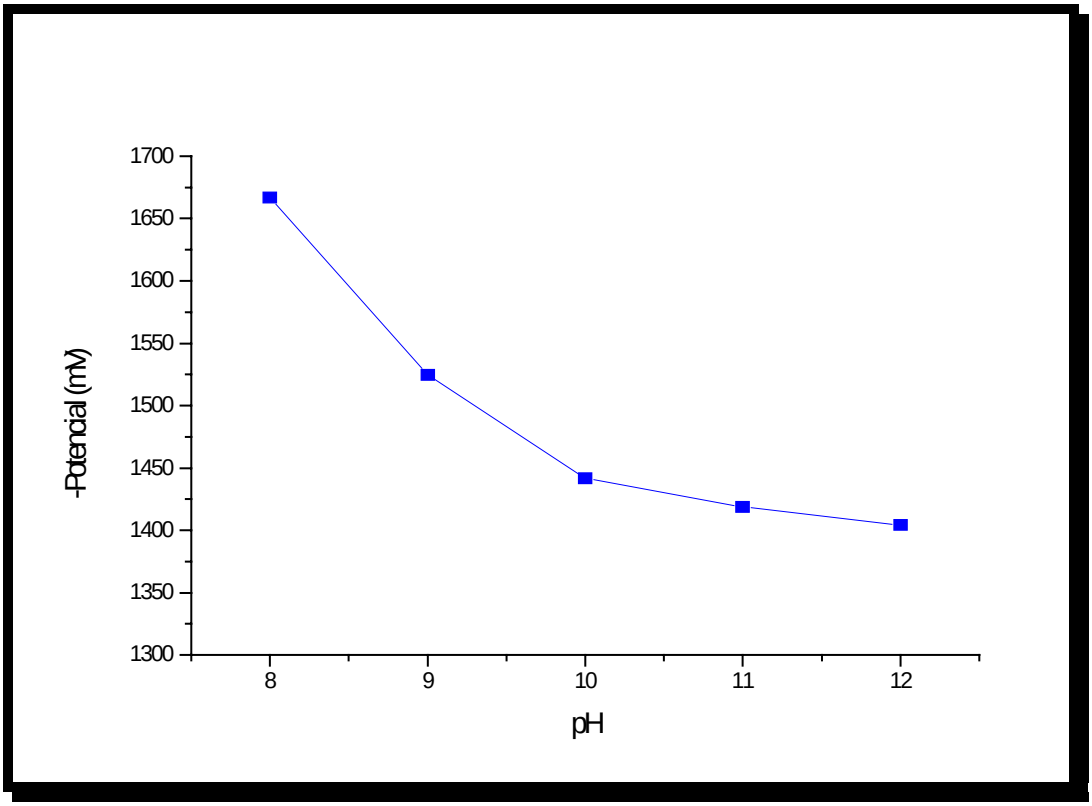


Figura 3.45: Influência do pH no potencial de pico catódico obtido de polarogramas de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R.

Visando estabelecer a melhor composição do eletrólito suporte para monitoramento do fungicida, comparou-se em seguida o comportamento polarográfico de pulso diferencial de $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R e fosfato pH 8,0. A Figura 3.46 mostra polarogramas de pulso diferencial do miconazol em solução tampão fosfato/metanol (1:1) (curva B). A análise desta figura mostra que a redução do fármaco em solução tampão fosfato é complicada pela ocorrência de pré-picos no lado menos negativo de potencial, indicando a maior contribuição do efeito da adsorção no

processo eletródico nestas condições experimentais. Desta forma, escolheu-se o sistema tamponante B-R pH 8,0 como melhor eletrólito suporte por apresentar as melhores potencialidades analíticas.

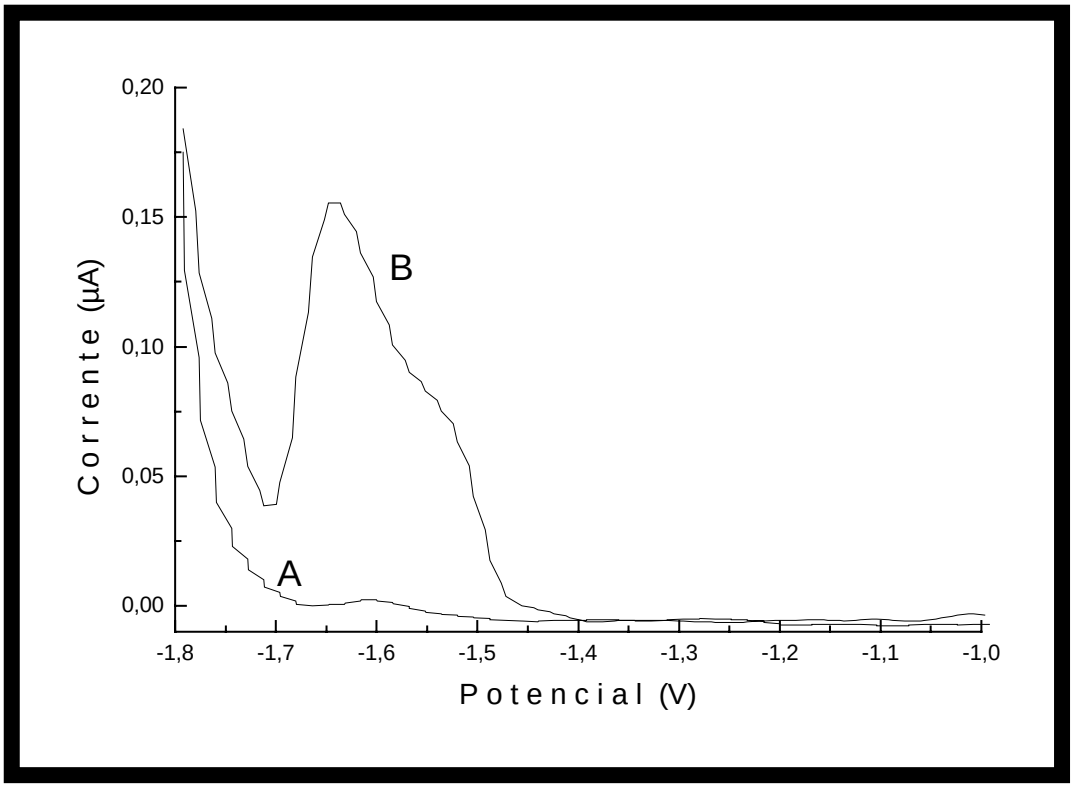


Figura 3.46: Polarogramas de pulso diferencial obtidos para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão fosfato pH 8,0/metanol (1:1) (curva B) e solução tampão fosfato pH 8,0/metanol (1:1) (curva A).

3.6.3 - ANÁLISE DA REVERSIBILIDADE.

A análise da largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) comumente pode fornecer subsídios importantes no diagnóstico do grau de reversibilidade de um processo eletródico, conforme discutido previamente. Os respectivos valores de ($W_{1/2}$) obtidos para $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em diferentes valores de pH em solução tampão B-R são mostrados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13: Valores da largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) do sistema $5x10^{-4}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1).

pH	$W_{1/2}$	$W_{1/4}$ (lado mais negativo de E)	$W_{1/4}$ (lado menos negativo de E)
	(mV)	(mV)	(mV)
8,0	88,8	37,0	51,8
9,0	78,1	36,4	41,7
10,0	78,4	43,2	35,2
11,0	66,7	30,3	36,4
12,0	79,0	35,3	43,7

O exame destes parâmetros mostra que o sistema não apresenta características de transferência eletrônica reversível simples. Todavia, em pH 8,0 os valores de $W_{1/2}$ são muito próximos àqueles esperado para uma redução envolvendo um elétron.

Entretanto, as ondas polarográficas apresentam-se com características assimétricas diagnosticadas pelos valores discordantes entre as medidas da metade da largura de pico a meia altura ($W_{1/4}$) no lado mais negativo e menos negativo de potencial. Este comportamento é típico de processo eletródico complicado por efeitos de adsorção que distorce a largura das ondas.

3.6.4 - CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO QUE CONTROLA A INTENSIDADE DE CORRENTE.

Um estudo sobre o comportamento da intensidade de corrente de pico em função do tempo de gotejamento e a variação na concentração do analíto pode fornecer informações importantes sobre o processo que governa a corrente de pico de um determinado sistema.

A influência do tempo de gotejamento sobre a corrente e o potencial de pico de redução para $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 foi investigado no intervalo de 0,4 a 2,0s. A corrente de pico obtida aumenta com o aumento do tempo de gotejamento utilizado até o tempo 1,4 segundos enquanto o potencial de pico mantém-se constante.

Os valores de log i *vs* log t obtidos nestas condições são mostrados na forma de gráfico na Figura 3.47. Uma relação linear foi obtida com inclinação de 1,44. Este valor está muito acima dos valores teóricos que caracterizam os processos difusional, cinético e adsorção, uma vez, que os valores da tangente de log i x log t são 0,16; 0,66 e 0,33, respectivamente (Bond, 1980). Este resultado mostra que

provavelmente o processo de transferência eletrônica sofre influência de outros processos envolvendo formação de filmes ou autoinibição.

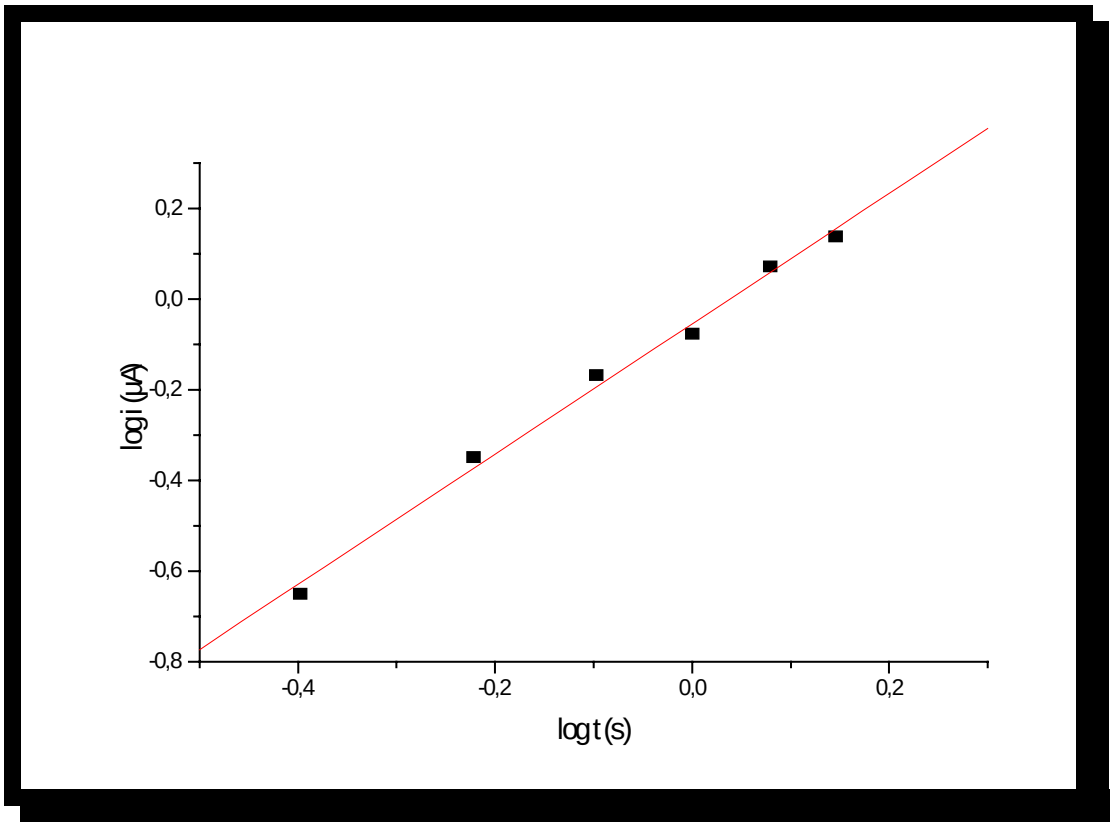


Figura 3.47: Gráfico logarítmico da influência do tempo de gotejamento sobre a intensidade de corrente do sistema $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0.

A influência da concentração do fungicida sobre a intensidade de corrente do sistema foi investigada em solução tampão B-R pH 8,0 em ampla faixa de concentração. Os polarogramas de pulso diferencial obtidos no intervalo de concentração entre $5x10^{-5}$ a $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ são marcados por

anomalias. As curvas apresentam acentuado deslocamento de potencial de pico de redução em função do aumento na concentração de miconazol semelhante ao observado para clotrimazol o qual foi previamente discutido.

Gráfico mostrando a relação entre corrente de pico e concentração de miconazol no intervalo entre $5x10^{-5}$ a $5x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ é mostrado na Figura 3.48.

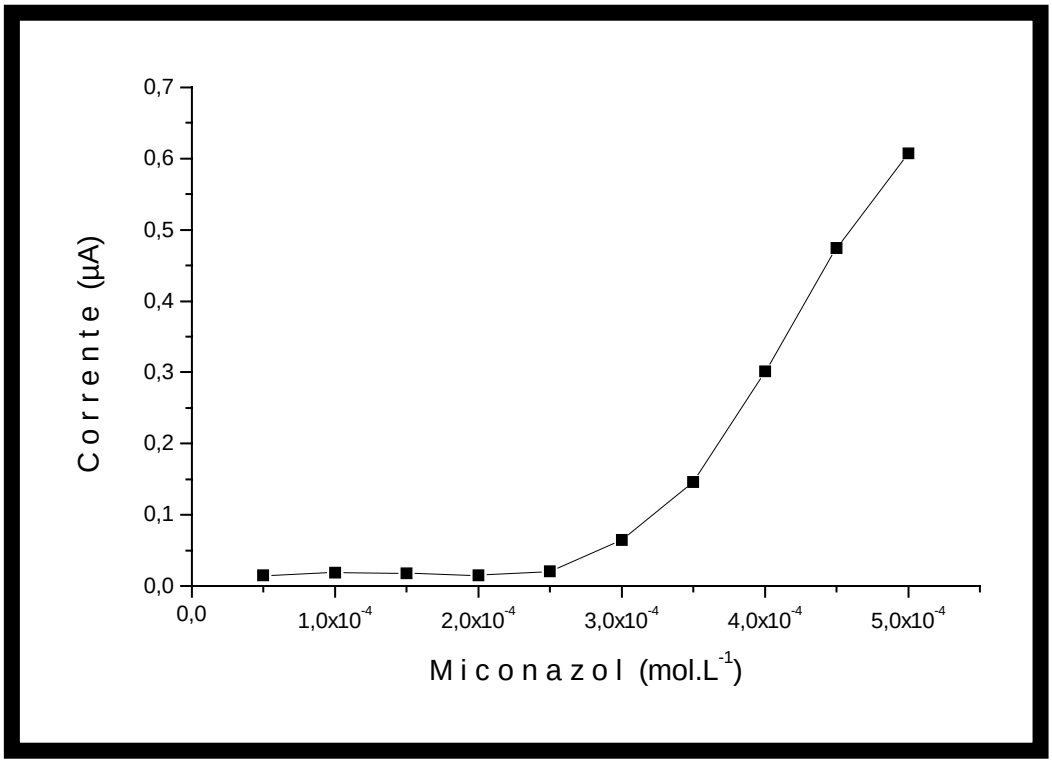


Figura 3.48: Comportamento da corrente de pico catódico vs concentração para miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 em tempo de gotejamento de 0,8 segundos.

Considerando que a influência da adsorção no processo eletródico foi minimizada na presença de triton X-100 para clotrimazol, investigou-se a seguir o efeito da adição do

surfactante sobre as curvas polarográficas para miconazol em
solução tampão B-R pH 8,0. Do mesmo modo, conclui-se que a adição do surfactante promove deslocamento de potencial de pico de redução para potenciais menos negativos, assim como, atenua as leituras de corrente, indicando leve minimização do efeito de adsorção do fármaco sobre a superfície da gota de mercúrio, mostrando que o efeito de adsorção de miconazol sobre o eletrodo de mercúrio ocorre de forma muito semelhante àquela observada para clotrimazol.

A repetibilidade do método foi investigada utilizando-se 10 medidas de $6x10^{-5}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0. O cálculo do coeficiente de variação nas medidas de corrente foi calculado estatisticamente o qual apontou um valor de 21% para n=10. Estes resultados mostram que o método polarográfico não apresenta repetibilidade suficiente para ser usado analiticamente, provavelmente devido à forte adsorção da droga sobre o eletrodo de mercúrio.

3.7. - ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE MICONAZOL.

A Figura 3.49 mostra um típico voltamograma cíclico para $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em B-R/metanol (1:1) pH 8,0 para velocidade de varredura de 30 $mV.s^{-1}$. A droga exibe um pico de redução em potencial próximo à descarga eletródica com Ep= -1,9V (pico IC). Um pico de oxidação (pico IA) pode ser observado na varredura reversa de potencial em torno de -1,9V, correspondente à regeneração da substância reduzida previamente. Os valores de (Epc – Epa) são praticamente nulos e não apresentam qualquer variação na sua morfologia se os voltamogramas são registrados sobre a mesma gota de mercúrio (Bard, 1980). Deste modo, a análise da forma do voltamograma mostra um comportamento característico de um processo envolvendo redução e oxidação de miconazol adsorvido irreversivelmente sobre o eletrodo de mercúrio.

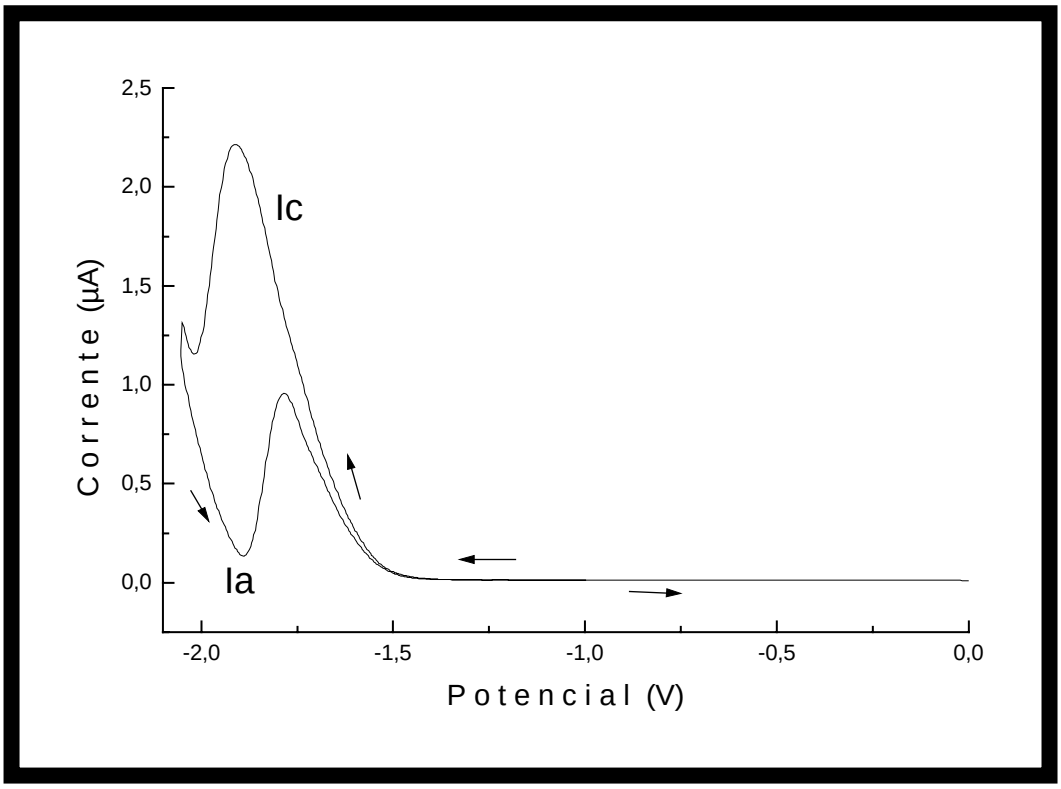


Figura 3.49: Voltamograma cíclico de $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0, υ=30 $mV.s^{-1}$

3.7.1 -INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA.

A influência da velocidade de varredura sobre os parâmetros de potenciais de pico de redução e oxidação são mostrados na Tabela 3.14. Em baixas velocidades de varredura a corrente de pico catódico (υ< 60$mV.s^{-1}$) apresenta um comportamento anômalo, pois não apresenta nenhum aumento significativo em função do aumento da velocidade de varredura, sugerindo que a espécie a ser reduzida encontra-se pré-adsorvida sobre o eletrodo. Este comportamento também é responsável pela forma anômala

do pico reverso, cuja corrente de pico diminui apenas em alta velocidade de varredura.

Tabela 3.14: Parâmetros voltamétricos do sitema $1x10^{-3}$ mol. L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R/metanol (1:1) pH 8,0.

Vel. de varredura	onda de redução		Onda de oxidação	
($mV.s^{-1}$)	Ep(V)	ip(µA)	Ep(V)	ip(µA)
10	1,98	0,99	1,96	0,76
20	1,94	1,07	1,92	0,75
30	1,91	1,12	1,89	0,79
40	1,93	1,13	1,89	0,74
50	1,99	1,26	1,92	0,76
60	2,04	1,87	1,96	0,71
70	1,95	2,44	1,81	0,74
80	1,96	2,76	1,81	0,74
100	1,96	2,62	1,77	0,73
200	2,03	2,63	1,79	0,53
300	2,05	3,42	1,83	0,21
400	2,07	3,56	1,86	0,24
500	2,06	4,62	1,77	0,28
700	2,18	4,87	1,74	0,10
1.000	2,18	6,82	1,71	0,13

A análise dos parâmetros a serem utilizados como diagnóstico do mecanismo, tais como, função corrente,relação de ipa / ipc e variação de potencial de pico em função da velocidade de varredura mostraram alguns valores anômalos, indicando que provavelmente a adsorção de miconazol sobre o eletrodo estacionário de mercúrio é efetivamente marcada pela formação de filmes insolúveis sobre o eletrodo, de modo mais pronunciado que aquele verificado para clotrimazol.

Deste modo, é possível concluir que o comportamento eletroquímico de miconazol em meio aquoso sobre eletrodo de mercúrio ocorre de forma semelhante àquela observada na redução de clotrimazol. Isto é, a redução da ligação C-Cl do analito sobre o eletrodo de mercúrio ocorre com formação de filmes sobre o eletrodo e torna a técnica polarográfica de pulso diferencial inviável como método analítico para determinação de miconazol.

3.8 - ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA DE MICONAZOL.

Tendo em vista que a técnica polarográfica de pulso diferencial não apresenta condições analítica favoráveis para determinação de miconazol em meio hidrometanólico devido ao forte processo de adsorção presente no sistema e considerando que a adsorção do substrato sobre a superfície da gota no eletrodo capilar é altamente vantajosa na técnica voltamétrica de redissolução catódica para pré-concentração do fármaco investigou-se a seguir o comportamento voltamétrico de redissolução catódica de miconazol em meio aquoso.

A Figura 3.50 apresenta ondas voltamétricas de redissolução catódica obtidas de solução de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtidas em diferentes tempos de acúmulo, sob potencial de acúmulo de 0 V e velocidade de varredura linear de 100 $mV.s^{-1}$.

A análise da referida figura mostra que a técnica voltamétrica de redissolução catódica pode ser empregada para monitoramento do fármaco, uma vez que a droga adsorve na superfície da gota estacionária de mercúrio no eletrodo capilar, observado pelo crescente aumento de corrente em função do aumento no tempo de acúmulo registrado nos voltamogramas de redissolução catódica.

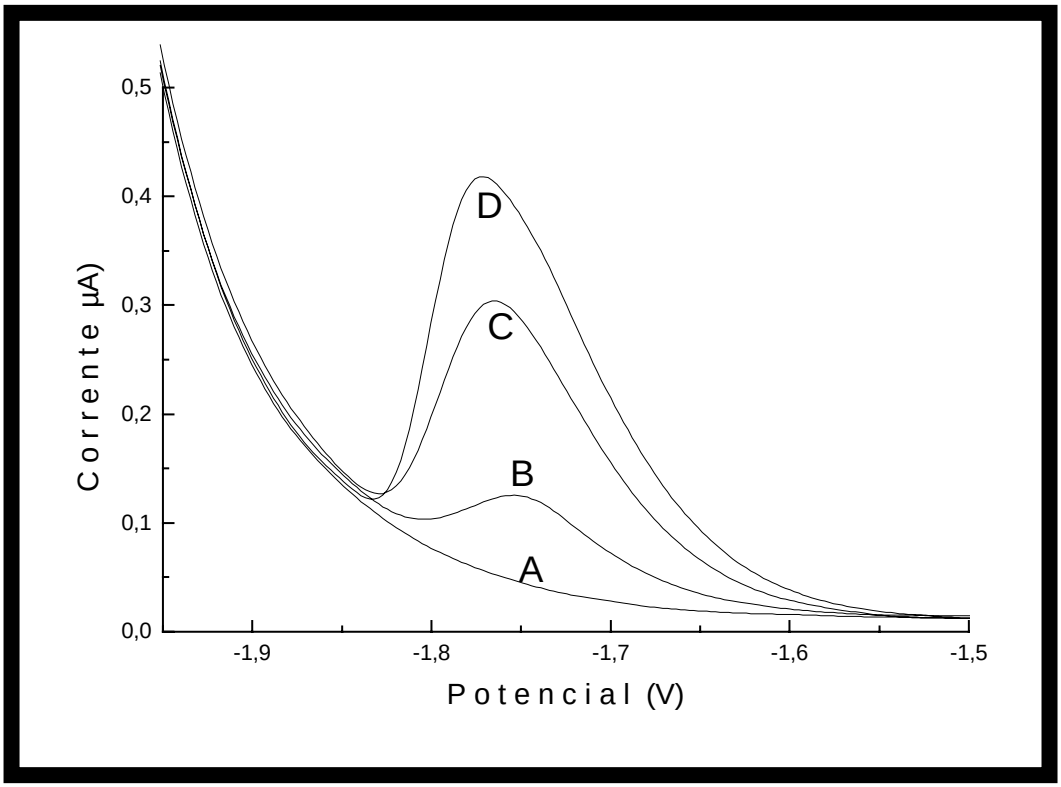


Figura 3.50: Voltamogramas de redissolução catódica obtidos de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 em Tac= 15 s (curva B); Tac=30 s (curva C); Tac=60 s (curva D) e curva A= eletrólito suporte em Tac= 60s. Eac= 0,0 V e υ = 100 mV.s^{-1}.

3.8.1 - INFLUÊNCIA DO pH.

A influência do pH no comportamento eletroquímico de soluções de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de miconazol foi investigado em ampla faixa de pH de 2 a 12, utilizando-se solução tampão B-R, tempo de acúmulo de 60 s, potencial de acúmulo de 0 V e velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1}.

Somente no intervalo de pH> 7,0 observam-se ondas voltamétricas bem definidas. Acima de valores de pH 8,0 o potencial de pico de redução desloca-se para valores menos negativo de potencial, confirmando o comportamento observado nos experimentos utilizando-se a técnica polarográfica de pulso diferencial.

O efeito da variação do pH sobre a corrente de pico catódica de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol, é mostrado na forma de gráfico na Figura 3.51. Os valores de corrente de pico apresentam valores máximos ao redor de pH 8,0. Deste modo, escolheu-se valor de pH 8,0 (B-R) como melhor condição experimental para análise do fármaco.

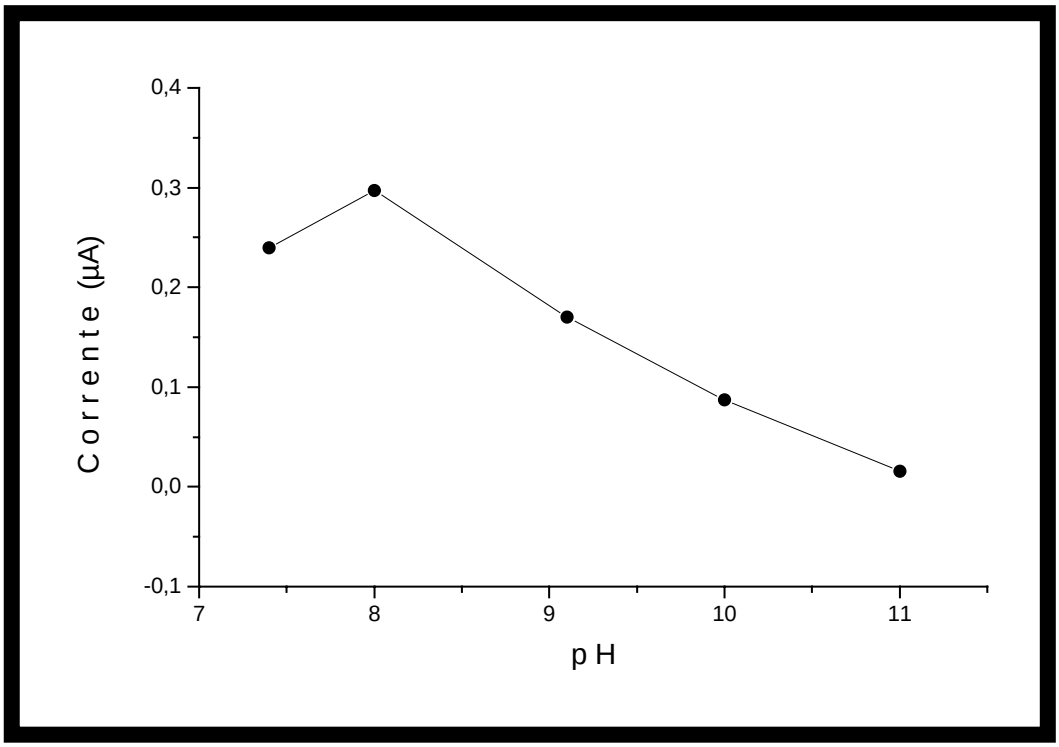


Figura 3.51: Influência do pH sobre a corrente de pico catódica no sistema $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R. Tac= 60 s, Eac= 0,0V; υ= 100 $mV.s^{-1}$.

3.8.2 - INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA.

Visando estabelecer a influência da velocidade de varredura (10 a 500$mV.s^{-1}$) sobre a sensibilidade do sinal voltamétrico de redissolução catódica do fungicida, investigou-se o comportamento de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 utilizando-se tempo de pré-concentração de 45s em potencial de acúmulo de 0 V. A Figura 3.52, mostra que a corrente é proporcional à raiz

quadrada da velocidade de varredura no intervalo entre 10 a 150 $mV.s^{-1}$, mostrando acentuada distorção em velocidade de varredura maiores e a curva obtida não intercepta a origem dos eixos cartesianos, mostrando comportamento típico de processo eletródico com pré-adsorção do analito. Para monitoramento do fármaco escolheu-se velocidade de varredura ≤ 100 $mV.s^{-1}$ que apresenta melhor resolução do pico e melhor sensibilidade de corrente.

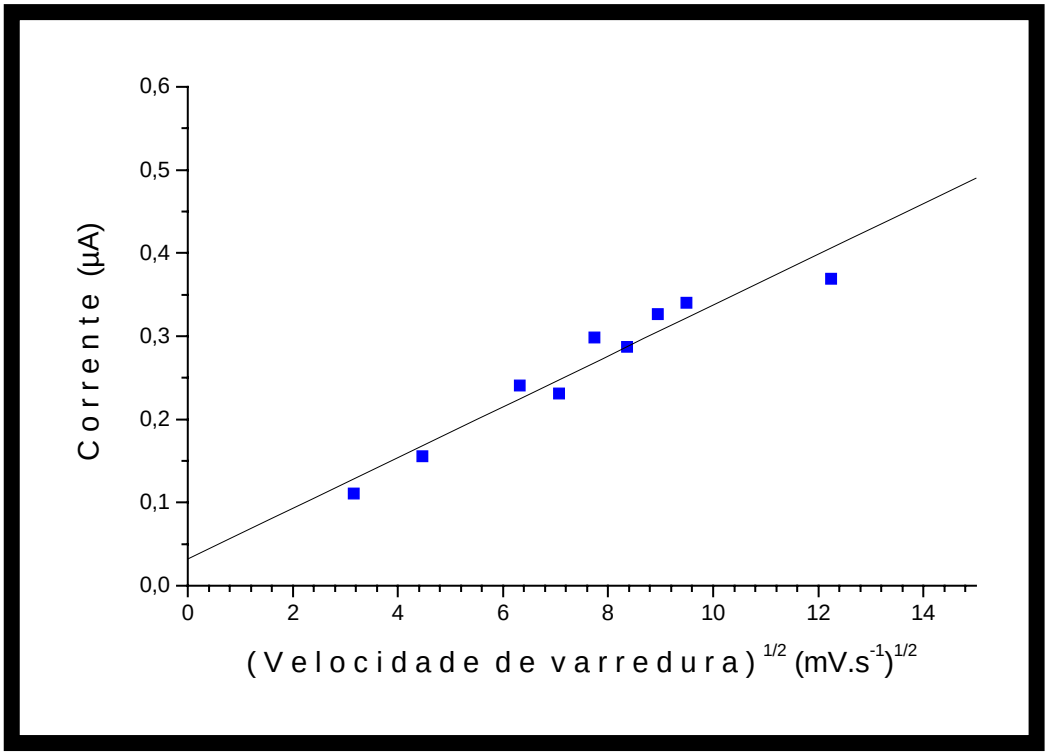


Figura 3.52: Efeito da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Tac= 45s e Eac= 0,0V.

3.8.3 - INFLUÊNCIA DO POTENCIAL E TEMPO DE ACÚMULO.

A influência do potencial de acúmulo (Eac) sobre a altura do pico foi investigado para $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8.0; utilizando-se tempo de acúmulo de 45s em intervalo de potencial de deposição entre 0 a -1,3V. Os resultados são mostrados na Figura 3.53.

A análise destes resultados mostra que na faixa de potencial entre -0,1 a -0,8V o sinal se mantém constante com ligeiro aumento em Eac= 0V. Desta forma, escolheu-se Eac= 0V como melhor potencial para acúmulo de miconazol.

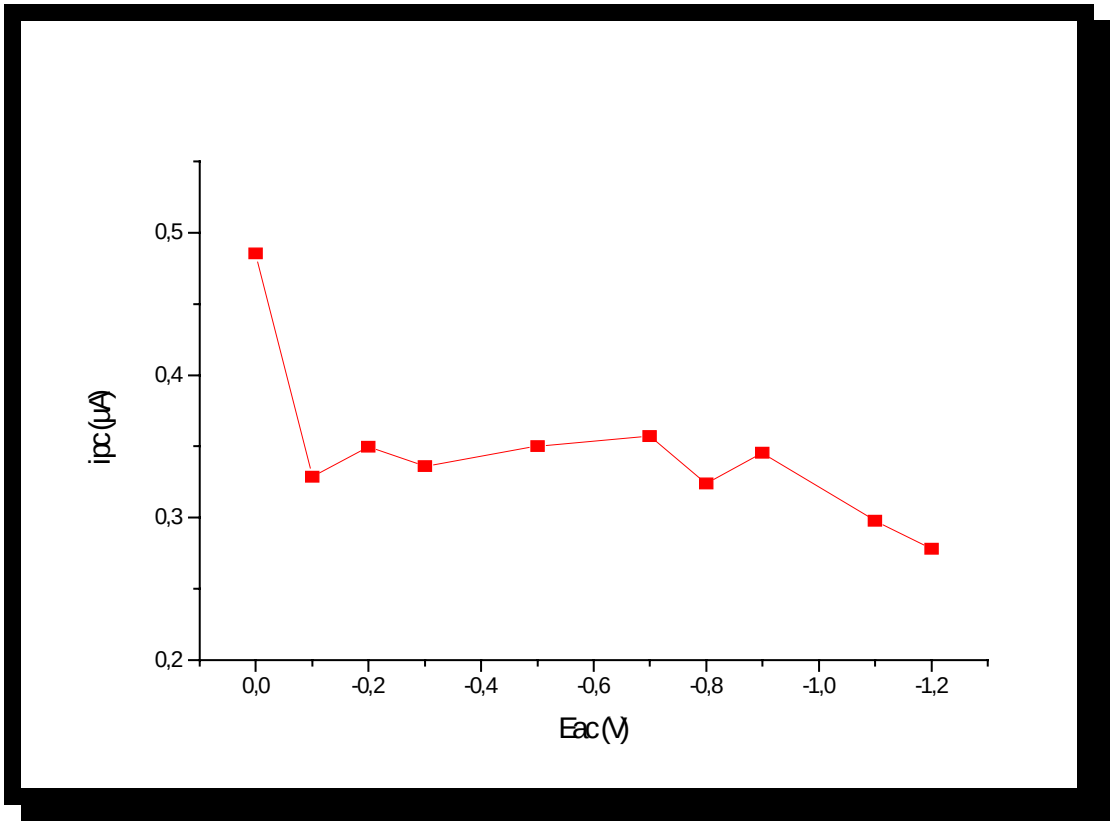


Figura 3.53: Influência do potencial de acúmulo sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Tac= 45s e υ= 100 $mV.s^{-1}$.

A influência do tempo de acúmulo (Tac) sobre a corrente de pico catódico foi investigada em concentração de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em B-R pH 8,0 utilizando-se potencial de acúmulo de 0 V em intervalo de tempo entre zero a 240s, cujos valores estão graficados na Figura 3.54. A curva mostra que a corrente aumenta em função do tempo de pré-concentração até 120 segundos, seguido de uma região constante que sugere a saturação da gota estacionária de mercúrio em tempos de acúmulo muito longos.

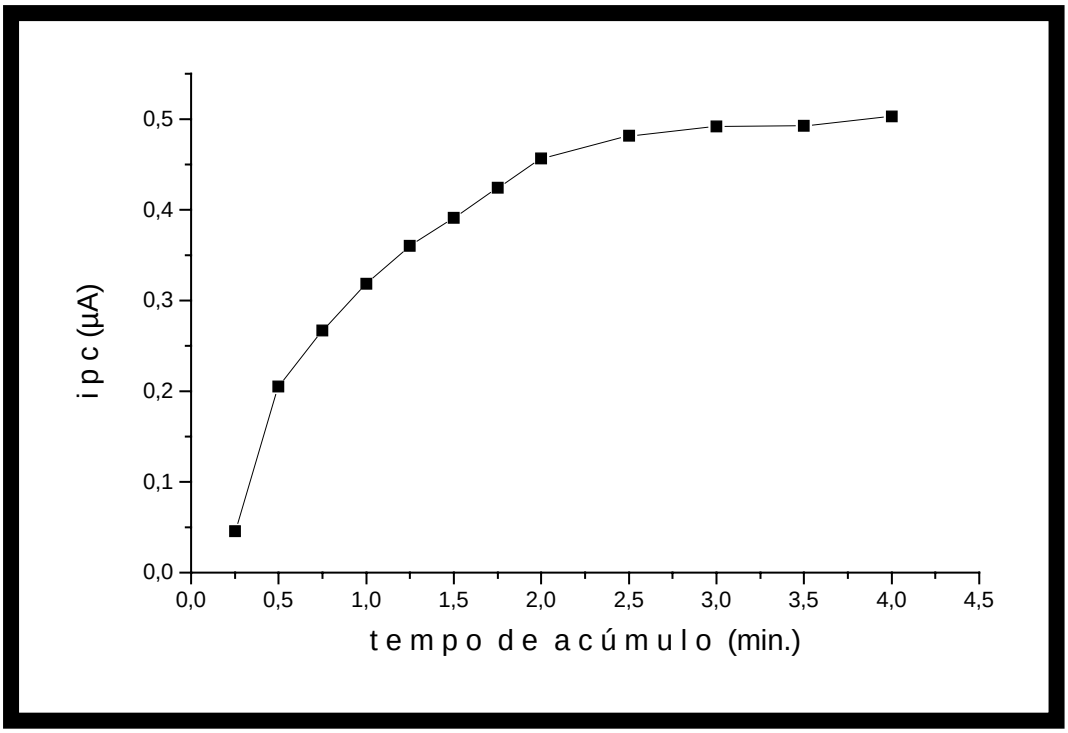


Figura 3.54: Influência do tempo de acúmulo sobre a corrente de pico catódico de $1x10^{-6}$ mol.L^{-1} de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 obtido a Eac= 0,0V e υ= 100 mV.s^{-1}.

3.8.4 - ESTABILIDADE.

A estabilidade do sinal voltamétrico foi investigada utilizando-se a análise da corrente de pico obtido para soluções de $1x10^{-6}$ $mol.L^{-1}$ de miconazol em tampão B-R pH 8,0; tempo de pré-concentração de 30s e potencial de acúmulo de 0 V. Os voltamogramas obtidos mostram valores de corrente de aproximadamente 0,40µA em todo o intervalo de tempo entre 0 a 3 horas, mostrando que o fármaco apresenta grande estabilidade em solução tampão B-R pH 8,0.

3.8.5 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Utilizando-se as melhores condições experimentais para monitoramento de miconazol através da técnica voltamétrica de redissolução catódica construiram-se curvas de calibração para miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 utilizando-se 2 tempos de pré-concentração distintos, conforme é mostrado na Figura 3.55. Utilizando-se tempo de acúmulo de 100s (curva I da Figura 3.55) obteve-se uma relação linear entre corrente de pico *vs* concentração no intervalo de 47,9 $ng.mL^{-1}$ a 239,5 $ng.mL^{-1}$ seguido de nítida saturação do eletrodo em concentração superior.

A curva de calibração obtida para miconazol sob tempo de pré-concentração de 30s é mostrada na curva II da Figura 3.55. A análise do gráfico obtido mostra valores inferiores de corrente, mas apresenta relação linear entre 192,0 $ng.mL^{-1}$ a 718,5 $ng.mL^{-1}$ de miconazol mostrando que o monitoramento do fármaco pode ser seguido em ampla faixa

de concentração. Coeficiente de variação calculado estatisticamente para (n= 9) nove medidas do fármaco em

concentração de 479 ng.mL^{-1} em solução tampão B-R pH 8.0 utilizando-se de tempo de deposição de 30s, potencial de acúmulo de 0 V mostrou valores iguais a 3,8% o qual mostra uma boa repetibilidade do método. O limite de detecção calculado estatisticamente utilizando as melhores condições experimentais acima de T_{ac}= 30s e E_{ac} 0V foi estimado em 8 ng.mL^{-1} (Baccan, *et al*., 1979).

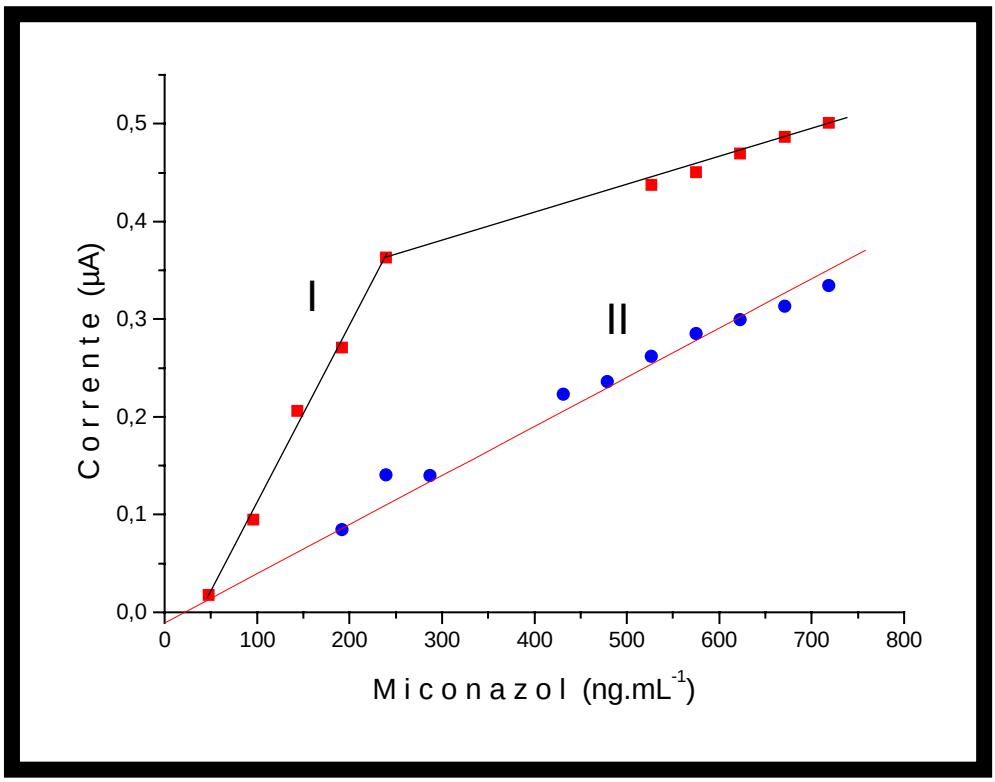


Figura 3.55: Curvas de calibração obtida para miconazol em solução tampão B-R pH 8,0 em Eac= 0,0V e υ= 100mV.s^{-1}. Curva I Tac= 100s e curva II Tac= 30s.

3.8.6 - APLICAÇÃO ANALíTICA.

O método desenvolvido foi testado em amostras comerciais disponíveis como Daktarin e Vodol, cujo princípio ativo é o nitrato de miconazol, disponível comercialmente na forma de pó e loção a 1%, respectivamente.

As Tabelas 3.15 e 3.16 mostram os resultados obtidos das formulações farmacêuticas do Daktarin, produzido pelo laboratório Janssen Farmacêutica Ltda a 1% e Vodol, produzido pelo laboratório Andrômaco, comercializado na forma de loção a 1%.

Tabela 3.15: Quantificação de miconazol na formulação farmacêutica denominada como Daktarin através da técnica voltamétrica de redissolução catódica.

alíquotas (µL)	C* ($ng.mL^{-1}$)	C** ($ng.mL^{-1}$)	Correlação *** (%) ± DP
40	95,8	95,6	99,8 ± 0,002
80	191,6	197,8	103,0 ± 0,062
200	479,0	474,7	99,1 ± 0,008

*= Concentração especificada pelo laboratório (Janssen Farmacêutica Ltda)

**= Concentração encontrada

***= média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

Coeficiente de variação= 1,67% (Baccan *et al.*, 1979).

Tabela 3.16: Quantificação de miconazol na formulação farmacêutica denominada de Vodol através da técnica voltamétrica de redissolução catódica.

Aliquota (µL)	C* ($ng.mL^{-1}$)	C** ($ng.mL^{-1}$)	Correlação*** (%) ± DP
120	287,4	272,8	95,0 ± 0,004
160	383,2	377,2	98,4 ± 0,002
200	479,0	470,4	98,2 ± 0,001

*= Concentração especificada pelo fabricante (Andrômaco)

**= Concentração encontrada.

**= média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

Coeficiente de variação= 1,59% (Baccan *et al*., 1979).

Os valores médios de correlação iguais a 100,6 para Daktarin e 97,2 para Vodol apresentados nas Tabelas 3.15 e 3.16 foram obtidas através de interpolação das leituras de corrente das amostras na curva de calibração segundo a equação ipc(µA)= -0,01096 + 0,0005C, onde C= concentração ($ng.mL^{-1}$) e R= 0,9889 (curva II da Fig. 3.55).

Os resultados obtidos mostram boa concordância entre a concentração especificada pelo fabricante e aquela obtida segundo o método proposto, de onde se pode concluir que a técnica voltamétrica de redissolução catódica oferece um método rápido, preciso e econômico para análise de miconazol em baixos níveis de concentração, na forma pura ou em formulações farmacêuticas sem etapas de extração prévia ou utilização de outros reagentes específicos.

O método proposto foi comparado a um método espectrofotométrico para quantificação de miconazol nas mesmas formulações farmacêuticas utilizando-se o procedimento descrito por (Cavrini, *et al*., 1981). O método descrito pelos autores, possibilitou a construção de uma curva analítica para miconazol na faixa de concentração entre 3 a 15 $\mu g.mL^{-1}$ (Figura 3.56), após a complexação do fármaco com o corante azul de bromotimol em meio ácido pH 3,0. O complexo é extraído em clorofórmio após vigorosa agitação e quantificado em comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{máximo}$)= 424nm.

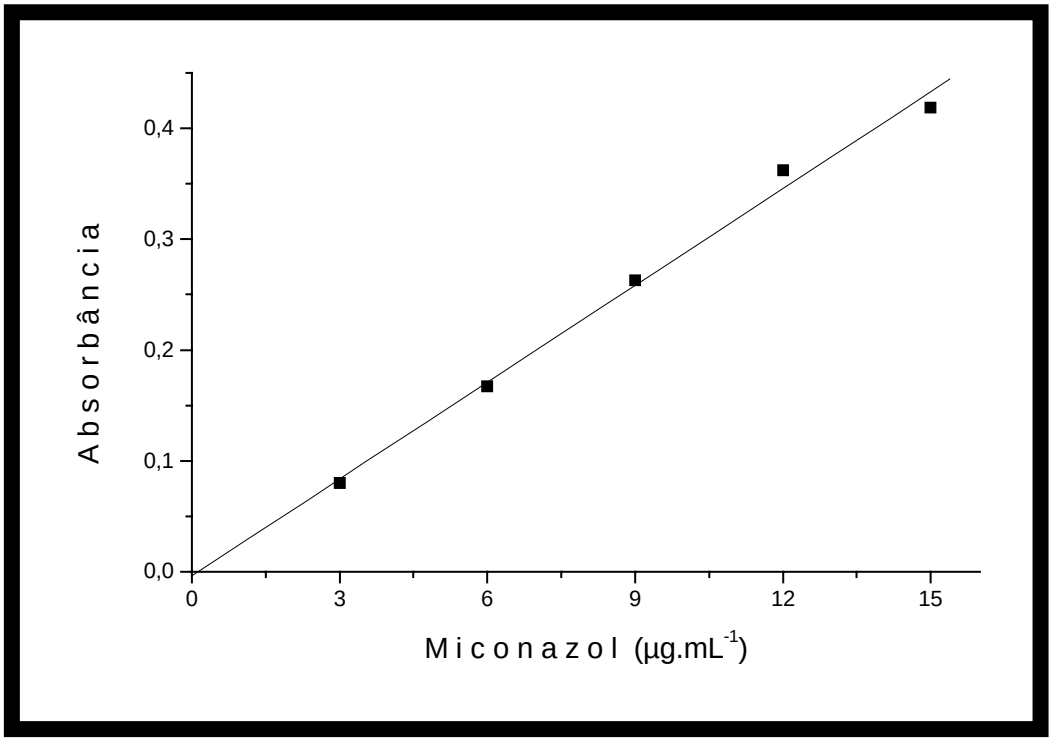


Figura 3.56: Curva analítica para miconazol segundo o método espectrofotométrico (Cavrini, *et al*., 1981).

Os valores de correlação entre a concentração de miconazol nas formulações farmacêuticas especificados pelos fabricantes do Daktarin (Janssen Farmacêutica Ltda) e do Vodol (Andrômaco) são mostrados nas Tabelas 3.17 e 3.18, respectivamente. Os valores apresentados foram obtidos através da interpolação das leituras de absorbância obtidas das amostras analisadas na curva analítica mostrada na Figura 3.56, cuja equação da reta é A= -0,0037 + 0,0291C, onde C= concentração em $\mu g.mL^{-1}$.

Tabela 3.17: Determinação de miconazol na formulação farmacêutica comercializada como Daktarin utilizando-se o método espectrofotométrico (Cavrini, *et al*., 1981).

C* nominal ($\mu g.mL^{-1}$)	C** Encontrada ($\mu g.mL^{-1}$)	***Correlação (%) ± DP
6,00	6,16	102,6 ± 0,002

*= concentração especificada pelo fabricante.

**= concentração encontrada pelo método oficial.

*** = média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

Tabela 3.18: Determinação de miconazol na formulação farmacêutica comercializada como Vodol utilizando-se o método espectrofotométrico (Cavrini, *et al*., 1981).

C* nominal ($\mu g.mL^{-1}$)	C** Encontrada ($\mu g.mL^{-1}$)	***Correlação (%) ± DP
6,00	5,94	99,0 ± 0,003

*= concentração especificada pelo fabricante.

**= concentração encontrada pelo método oficial.

*** = média para 3 determinações.

DP= desvio padrão.

A comparação entre os resultados de correlação obtidos pelo método proposto e o método espectrofotométrico mostra resultados satisfatórios, sugerindo que a técnica voltamétrica de redissolução catódica pode ser utilizada para monitoramento de miconazol na forma pura ou em formulações farmacêuticas em baixos níveis de concentração.

3.9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os principais resultados obtidos no estudo do comportamento eletroquímico e desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de clotrimazol e miconazol através de técnicas voltamétricas, podem ser resumidos em:

- A redução de clotrimazol e miconazol em meio neutro e alcalino, respectivamente, ocorre em uma única etapa, atribuída à redução da ligação R-Cl envolvendo a participação de 1 elétron. O comportamento eletroquímico evidencia a ocorrência de forte fenômeno de adsorção durante o processo de redução de ambos os fármacos. Este efeito é minimizado na presença de triton X-100, permitindo o monitoramento de clotrimazol através da técnica polarográfica de pulso diferencial.
- A técnica voltamétrica de redissolução catódica mostrou-se eficiente para determinação dos fármacos em baixos níveis de concentração em formulações farmacêuticas. Utilizando-se potencial de acúmulo de -0,2V, υ= 100mV. s^{-1} e tempos de acúmulo de 60s e 180s, construiram-se curvas de calibração para clotrimazol em solução tampão fosfato pH 6,9 com relação linear na faixa de concentracão entre 103 a 345µg.mL^{-1} e 48 a 172µg.mL^{-1}, respectivamente. Nível médio de correlação de 98,5% foram obtidos na análise de clotrimazol no spray de Canesten. A técnica voltamétrica de redissolução catódica mostrou-se também satisfatória para monitoramento de miconazol em solução tampão B-R pH 8,0, utilizando-se potencial de acúmulo de 0 V, υ= 100mV.s^{-1}. Utilizando-se estas condições

experimentais foi possível a obtenção de curvas de calibração para o fármaco na faixa de concentração no intervalo entre 192 a 718,5 $ng.mL^{-1}$ e 48 a 240$ng.mL^{-1}$, respectivamente para Tac= 30s e 100s. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas comerciais com níveis de correlação de 100% e 97,2% foram alcançados nas análises das formulações farmacêuticas denominadas como Daktarin e Vodol, respectivamente.

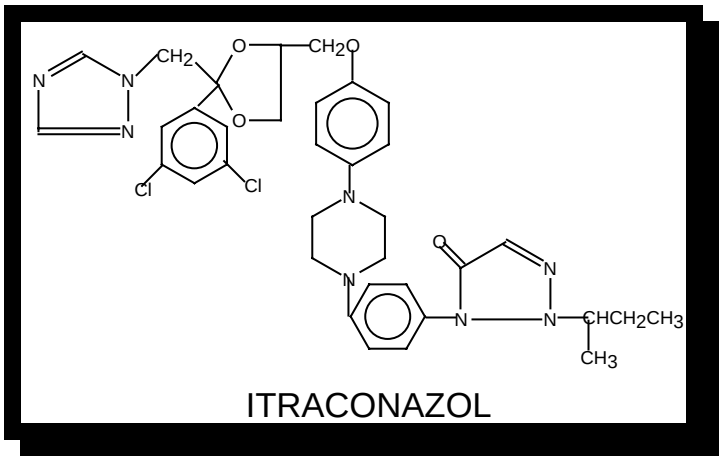
- A ocorrência da interação entre grupo imidazólico de clotrimazol e grupos clorotriazínas do corante RR 120 em meio ácido é responsável pela formação de um composto passível de redução em potencial ligeiramente mais negativo (-0,38V) do que o grupo azo do corante. Polarogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão B-R pH 2,0 mostram que está reação de derivatização permite o monitoramento de clotrimazol. Utilizando-se concentração de $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ do corante, com reação instantânea na própria célula voltamétrica à temperatura ambiente construiu-se curva de calibração para clotrimazol com relação linear no intervalo de concentração entre 10 a 34$\mu g.mL^{-1}$. O método aplicado para monitoramento de clotrimazol em amostra farmacêutica denominada de Canesten apresenta nível médio de correlação de 99,4% e de 148% em amostra comercial denominada de Dermobene.

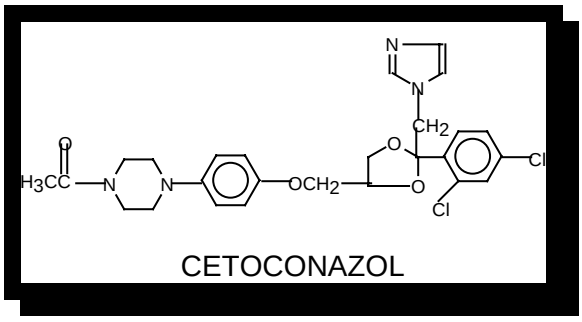
3.10 - ESTUDOS FUTUROS.

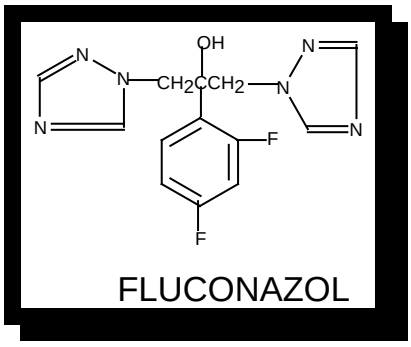
- Estudar mais profundamente a interação do clotrimazol com o corante RR 120, utilizando-se outras técnicas de análise com o objetivo de investigar o desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado na imobilização do corante RR 120 em eletrodo de carbono vítreo.
- Aplicação dos métodos desenvolvidos para monitoramento de clotrimazol e miconazol em fluidos biológicos.
- Investigação de possíveis compostos formados entre os fármacos estudados e o íon mercúrio (I) quando aplicado em potencial ligeiramente mais positivo que 0 V no eletrodo de trabalho.

APÊNDICE I.

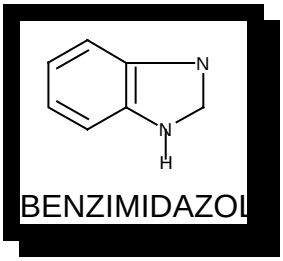
ESTRUTURAS DE ALGUNS AGENTES ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NA CLASSE MÉDICA.



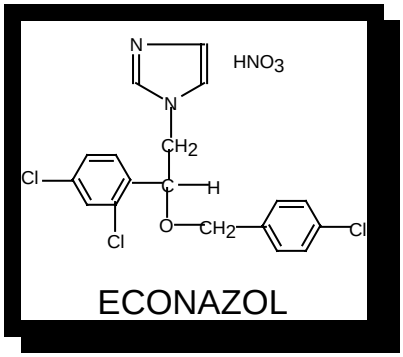




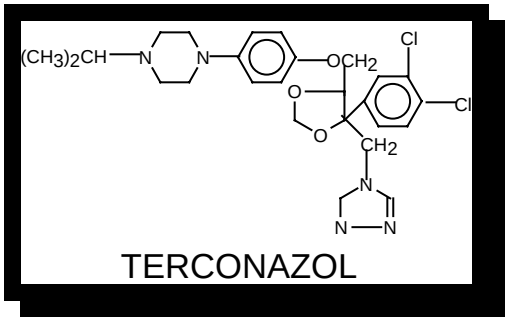
APÊNDICE I.



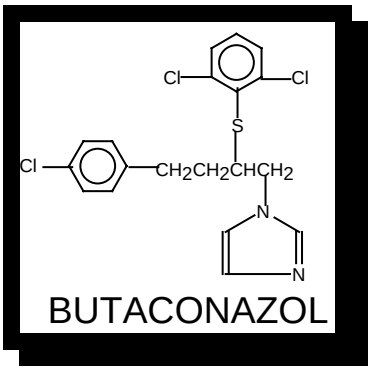
BENZIMIDAZOL



ECONAZOL



TERCONAZOL



BUTACONAZOL

3.11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABDEL - KHALEK, M. M.; **J. Pharm. Sci.,** - v.7, n.2, p. 151- 3 1993 :In Chem. Abst., v. 119, p.517, 1993, (Abstract n. 210922d).

- ANSON, F.C.; SAVEANT, J.; SHIGEHARA, K.; **J.Am. Chem. Soc**., v.105, p. 1096 - 106, 1983.

- BACCAN, N.; DE ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.C.; **Química analítica quantitativa elementar,** ed. 2ª, Campinas - São Paulo, Edgar Blücher Ltda. 1979, cap.1.

- BAIZER, M.M.; LUND, H.; **Organic electrochemistry,** New York, Marcel Dekker, 1983, p.259 -60.

- BARD, A.J.; LUND, H.; **Encyclopedia of electrochemistry of the elements,** New York, Marcel Dekker, 1973, vol**.** 15, p. 228 - 41.

- BARD, J.A.; **Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications,** New York, Jonh Wiley & Sons, 1980, cap. 5.

- BEDAIR, M.M.; KORANY, M.A.; ELSAYED, F.O.T.; **J. AOAC.,** v.72, n.3, p. 432 - 5, 1989.

REFERÊNCIAS

- BELAL, F.; **J. AOAC Int.,** v. 68 p. 207,1985. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- BENNETT, J.E.; **Fármacos antimicrobianos**. In Goodman Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, ed. 9ª, 1996, p.864 - 75.

- BERSIER, P.M.; **Anal. Proc.,** V.24, p. 44,1987.*Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- BOND, A.M. HEFTER, G.; **J. Electroanal. Chem**., v.68, p. 203 - 16, 1976.

- BOND, A.M.; **Modern polarographic methods in analytical chemistry.-**New York, Marcel Dekker, 1980.

- BOWERS, L.D.; GURIRA, R.C.; **Clin. Chem.**, - v.27,p. 1088, 1981. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- BREZINA, M. ZUMAN, P.; **Polarografic in medicine, biochemistry and pharmacy,** New York, Interscience, 1958.

REFERÊNCIAS

- BROWN, E.R.; LARGE, R.F.; **Techniques of chemistry,** New York, Jonh Wiley & Sons, 1971, v. 1, p. 423.

- CAVRINI, V.; DI PIETRA, A.M.; RAGGI, M.A.; **Pharm. Acta Helv.,** v. 56, n.6, p. 163 -5, 1981.

- CAVRINI, V.; DI PIETRA, A.M.; RAGGI, M.A.; **Int. J. Pharm.,** - v.10, n.2, p. 119 - 24, 1982.

- CHAINANI, M,L.; RAO, L.S.; CHAVDA S.J.; **Ind. Drugs,** v.18, n. 11, p. 405 - 7, 1981.

- CHEN, B.; **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi,** v.24, n.7 p. 318 - 19,1993: In Chem. Abst., v. 120, p.547, 1994, (Abstract n. 62455g.)

- CZERKOWICZ, T.J.; STUART, L.S.; **Methods of testing fungicites.** In: Lawrence C.A., Block, S.S. (Eds**) Desinfection, sterilization and preservation.** Philadelphia, Lea & Febiger, 1968, p.207 - 20.

- DALKARA, S.; BRAUN, H.O.J.; PLOUDE, R.; **Anal. Lett**., - n.17, p. 793, 1984*. Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

REFERÊNCIAS

- DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas 96/97. - Rio de Janeiro: J.B.M., - 1997, p. 92,105.

- DOL, I;. ALTESOR, C.; **Safybi,** v.28, n.77, p. 2660 - 6, 1988: In Chem. Abst., v.110, p. 427, 1989, (Abstract n.219215x).

- DROUHET, E.; Antifungal Agents. **Antibiot. Chemother., -** v.25, p. 253 - 88, 1978.

- ELLAITHY, M.M.; EL-TARRAS, M.F.M.; TADROS, M.F.; AMER, M.M.; **Am. Arch. Pharm. Chem. Sci.,** v**.** 10, p. 99, 1982. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- EWING, G.W.; **Métodos instrumentais de análise química.** São Paulo: EDUSP, 1972, p. 210 - 30.

- FACI, J.; MURRAY, R.W.; **J. Electroanal. Chem**., v.124, p. 339 - 43, 1981.

- FIJALEK, Z.; SZYSZKO, E. GALL, M.; **Acta Pol. Pharm.**, v.61, p. 547, 1985. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- FIJALEK, Z.; CHODKOWSKI, J.; WAROWWNA, M.; **Acta Pol. Pharm.,** v.49 n.1-2**,** p. 1 - 5**,** 1992.

- FRY, A.J.; **Sinthetic organic electrochemistry,** New York, Harper Row, 1972, cap 3 .

- GALUS, Z.; **Fundamentals of electrochemical analysis,** Chichester**,** Ellis Horwood, 1976.

- GEORGESCU, P;. CALUSARU, A.; **Ftiziologia,** v.20, p. 25 - 32, 1971: In Chem. Abstr., v. 76, p. 306, 1972, (Abstract n 90084b).

- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B.; FOGG, A.G.; **Proceeding of chemical and biological sensors and analytical electrochemical methods,** Joint. International Meeting, 1997, Paris, p.467 - 76.

- GUERRIERI, A.; PALMISANO, F.; **Anal. Chem**., v.59, p. 2127 - 30, 1987.

- GULRAJANI, M.L.; **Rev. Prog. Color.,** v.23, p. 51 - 6, 1993.

- GURIRA, R.C.; BOWERS, L.D.; **J. Electroanal. Chem.,** v.146, p. 109 - 22, 1983.

- HART, J.P.; **Electroanalysis of biologically important compounds**, West Sussen,Ellis Horwood, 1990.

- HEEL, R.C.; BROGDEN, R.N.; PAKES, G.E.; SPEIGHT, T.M.; AVERY, G.S.; **Drugs,** v.19, p. 7 - 30, 1980.

REFERÊNCIAS

- HOLT, R.J.; **J. Cutaneous Pathol**., v.3, p. 45, 1976. *Apud:* HOOGERHEIDE, J.G.; WYKA, B.E.; **Analytical profiles of drug substances,** New York, Academc Press**,** 1982, v.2, p. 225 - 55.

- HOOGERHEIDE, J.G.; STRUSIAK, S.H.; TADEI, C.R.; TOWNLEY, E.R.; WIKA, B.E.; **J. AOAC.,** v.64, n4, p. 864 - 9, 1981.

- HOOGERHEIDE, J.G.; WYKA, B.E.; **Analytical profiles of substancs,** New York, Academc Press**,** 1982**,** v.2, p. 225 - 55.

- HORN, G.; JACOB, H.E.; BERG, H.; **Stud. Biophys.,** v**.**104, n. 1-3, p. 201 - 6, 1984: In Chem. Abstr., v. 103, p. 20, 1985.(Abstract n. 32049j).

- HOSOTSUBO, H.; **Chromatographia** v.25, n 8, p 717 - 20, 1988.

- IBRAHIM, M.K.; NASSAR, M.W.; EL-ABSSAWY, N.M.; HAMID, S.G.; **J. Pharm. Sci.,** v.14, p. 184 - 92, 1994. :In Chem. Abstr., v.124, p. 720, 1996. (Abstract n. 212254q).

- KARANDEEVA, N.I.; TKACH, V.I.; GLUKHOVA, O.I.; TSYGANOK, L.P.; MUSHIK O.V.; **J. Anal. Chem.,** v.53, n.6, p. 544 - 50, 1998.

REFERÊNCIAS

- KAZANDZHIEVA, P.N.N.; NEDELCHEV, I.; **Farmatisya** v**.**36, n. 4, p. 6 - 12, 1986: In Chem. Abstr., v.106, p. 391, 1987. (Abstract n. 73006y).

- KOBYLINSKA, M.; KOBYLINSKA, K.; SOBIK, B.; **J. Chromatogr. B.,** v.685, n.1, p. 191 - 5, 1996.

- KRZYSZTOF, S.; DIAMANDO, M.; HOWARD, M.H.; **J. Chromatogr. A.,** v.434, n. 1, p. 259 - 64, 1988.

- LAVIRON, E.; **Bull. Soc. Chim. Fr.,** p.418 - 20, 1962.

- LAVIRON, E.; **J. Electroanal. Chem.,** v.63, p. 245 - 9, 1975.

- LEMLI, J.; KNOCKAERT, I.; **Pharm. Weerbi, Sci.,** v.5, n.4, p. 142 - 4, 1983: In Chem. Abstr., v.99,p 392, 1983.(Abstract n.146207p).

- MASSACCESI, M.; **Analyst** v.111, n 8, p. 987 - 92,1986.

- MELOAN, C.E.; KISER, R.W.; **Problemas y experimentos en analisis instrumental**,. México, Reverte, 1973, cap. 6

- MISHRA, A.K.; GODE, K.D.; **Ind. Drugs,** v.22, p. 317, 1985. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- MORALES, A.; TORAL, M.I.; RICHTER, P.; **Analyst,** v.109, p. 623, 1984. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- MOUNT, D.L.; PATCHEN, L.C.; DINH, P.N.; BARBER, A.M.; SCHWARZ, I.K.; CHURCHILL, F.C.; **J. Chromatogr.,** v.383, p. 375, 1986. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- MPASI, N.; DE RANTER, C.J.; JOTTIER, W.; **J. Pharm. Belg.,** v.42, n.2, p. 118 - 27, 1987: In Chem. Abstr., n.107, p. 30, 1987. (Abstract n.89390a).

- NEILL, G. P.; DAVIES, N.W.; MCLEAN, S.; **J**.**Chromatogr.,** v.565, n.1-2, p. 207 - 24, 1991.

- NICHOLSON, R.S.; SHAIN, I.; **Anal. Chem.,** v.36, p. 706 - 23,1964.

- ONG, C.W.; LEE, H,C.; **Inorg. Chim. Acta.,** v.125, p. 203 - 6, 1986.

- OSAMA, A.; PAKINAZ, K.; **Talanta** v.40, n.8, p. 1289 - 94, 1993.

- OYAMA, N.; ANSON, F.C.; **J. Electrochem. Soc.,** v.127, p. 247 - 50, 1980.

- OYLER, A.R.; NALDI, R.E.; FACCHINE, K.L.; BURINSKY, D.J.; COZINE, M.H.; DUNPHY, R.; ALVES, S. DOUGLAS, J.; COTTER, M.L.; **Tetrahedron,** v.47, n.33, p. 6549 - 60, 1991.

- PALMISANO, F.; CATALDI, T.R.I.; ZAMBORIN, P.G.; **J. Chromatogr.,** v.344, p. 249, 1985. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- PERSON, M.; LAVIRON, E.; **Bull. Soc. Chim. Fr.,** p.2669 - 71, 1968.

- PINZAUTI, S.; CASANI, M.; **Il Farmaco**, v.35, p.92, 1980. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- PRASAD, C.V.N.; PARIHAR,C.; SUNIL, K.; PARIMOO, P.; **Pharm. Sci.,** v.3,n.7, p. 337 - 41,1997: In Chem. Abstr., v. 127, p. 1067, 1997. (Abstract n. 195592r).

- QUIAN, Z.; YAN, W.; HE, Y.; LU, G.; **Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi.** v11, n.10, p. 435 - 7, 1991: In Chem. Abstr., v.117,p. 110, 1992. (Abstract n.50797v).

- REDGE, H.VON.; **Prog. in Drug Res.,** v.22, p. 117 - 22, 1978.

REFERÊNCIAS

- RIHOVA, M.; PACAKOVA, V.; STULIK, K.; WAISSER, K.; **J. Chromatogr.,** v.361, p. 347, 1976. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- SAKURA, S.; IMAI, H.; **Anal. Sci.,** v.1, p. 413, 1985. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- SILVA, P.; **Farmacologia**., ed 2ª, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985, p 1166 - 75.

- SMITH, W.F.; **Electroanalysis in higiene, enviromental, clinical and pharmaceutical chemistry,** Amsterdam, Elsevier, 1980, v.2.

- SMYTH, W.F.; **(Anal. Chem. Symp. Series)**. v.25, p. 29, 1986. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- SMYTH, M.R.; EGAN, A.E.; **Anal. Proc.,** v.23, p. 87, 1986. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- SMITH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical voltammetry.** New York, Elsevier, 1992.

- STUBER, B.; MUELLER, K.H.; **Pharm. Acta Helv.,** v.59,n.8, p. 210 - 12, 1984: In Chem. Abstr., v.101,p.387, 1984. (Abstract n.198297x).

- SUZUKI, M.; OGIWARA, R.; TAKITANI, S.; **Ivakuhin Kenkyu** v.23, n.1, p. 44 - 8, 1992: In Chem. Abstr., v.116, p. 467, 1992. (Abstract n. 181283b).

- SZATHMARY, S.CS.; LUHMANN, I.; **J. Chromatogr.,** v.425, n. 1, p. 193 -6, 1988.

- TUMBAY, E.; SEELIGER, H.P.R.; ANG, O.; **Candida and candidamycosis**, New York, Plenum Press, 1991, p. 83 - 95.

- TURNER, A.; WARNOCK. D.W.; **J. Chromatogr.,** v.22, n.1, p. 229 - 32, 1982.

- TYLER, T. A.; GENZALE, J.A.; **J. AOAC.** v.72, n.3, p. 442 - 4, 1989.

- VALLE, L.B.S.; OLIVEIRA, R.M.F.; DE LUCIA, R.; OGA, S.; **Farmacologia integrada - fundamentos farmacológicos da terapêutica -** São Paulo, Liv. Atheneu, 1991, v. 2, p.679 - 86.

- VECECK, A.A.; **Progress in inorganic chemistry,** New York, Jonh Wiley & Sons, 1963, v.2.

- VIRE, J.C.; KAUFFMANN, J.M.; PATRIARCHE, G.J.; **Anal. Lett.,** v.20, p. 1293, 1987. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- VISOR, G.C.; JACKSON, S.E.; KENLEY, R.A.; LEE, G.C.; **J. Pharm. Sci.,** v.74, p. 1078, 1986. *Apud:* SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- VOLKMANN, D.; **Git. Fachz. Lab.,** v.25, n n.5, p. 375 - 6, 379 - 80, 1981: In Chem. Abstr., v.95, p. 345,1981. (Abstract n.86352n).

- VOLKMANN, D.; **Git. Fachz. Lab.,** v.27, n.6, p. 524 - 6, 1983: In Chem. Abstr., v.99, p. 321, 1983. (Abstract n.58985k).

- WALASH, M.I.; RIZK, M.S.; IBRAHIM, F.A.; **J. AOAC.Int.**, v.68, p.523, 1985. *Apud*: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- WALLACE, S.M.; SHAH, V.P.; EPSTEIN, W.L.; GREENBERG, J.; RIEGELMAN. S.; **Arch. Dermatol.,** v.113, p. 1539, 1977. *Apud:* HOOGERHEIDE, J.G.; WYKA, B.E.; **Analytical profiles of substances,** New York, Academic Press, 1982, v.2, p. 225 - 55.

- WANG, J.; **Stripping analysis principles, instrumentations and applications**, Verlag Chemie, 1985.

- WANG, J. M.; MORGAN, C.; **Anal. Chem.,** v.58, p. 1024 - 28,1986.

- WANG, J.; LIN, M.S.; VILLA, V.; **Analyst**, v.112, p. 247 - 51, 1987.

- WANG, J.; BARD, A.J.; **Electroanalytical chemistry,** New York, Marcel Dekker, 1989, v. 16.

- WANG, G.S.X.; SHOUYAO, Z.; ZANG, L.; **Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi,** v.16, n.2, p. 67 - 70, 1996: In Chem. Abstr., v.125,p 616, 1996. (Abstract n. 19192k).

- WILLEMS, G.J.; JOTTIER, W.I.; DE RANTER, C.J.; **Analusis,** v.9, n.7, p. 327 - 32, 1981.

- WILSON, C.; GISVOL'S, O.; **Textbook of organic, medicinal and pharmaceutical chemistry,** Philadelphia, J.P. Lippincott, 1982. Apud: SMYTH, M.R.; VOS, J.G.; **Analytical Voltammetry,** New York, Elsevier, 1992, cap. 4.

- ZHANG, H.; DENG, S.; **Zhongguo Kangshengsu Zazhi,** v.17, n.3, p. 236 - 7, 1992: In Chem. Abstr., v.117, p 8, 1992. (Abstract n.204420f).

- ZOLLINGER, H.; **Color chemistry.** 2ª ed., New York, VCH, 1991.

- ZUMAN, P.; KOLTHOFF, J.M.; **Progress in polarographia,** New York, Wiley Interscience, 1962, v. 3, p. 73.

- ZUMAN, P.; GERMAN, C.; **Bioelectrochemistry** - 2ª ed., New York, Marcel Dekker, 1983.