

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Química - Araraquara

**ELETRODOS IMPRESSOS MODIFICADOS COM
POLI-HISTIDINA APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE
SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA CRÔMIO (VI)
E FÁRMACOS**

Márcio Fernando Bergamini

Tese apresentada ao Instituto de Química
de Araraquara como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Química

Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni

Orientadora

Araraquara

2007

DEDICATÓRIA

À minha mãe Mafalda, que sempre me incentivou, e me deu força nos momentos em que cheguei a pensar em desistir.

À minha tia Isaura, que com seu jeito manso e calmo, transmite uma sensação fantástica de paz.

Ao meu irmão José Antônio (Tonho), por me entender muito bem, ser um irmão maravilhoso e sempre cuidar de tudo.

A memória de meu pai José Gentil Bergamini, que ficaria muito orgulhoso de mim, e onde quer que esteja, sei que me passa uma energia muito boa.

A minha mulher Erika, uma pessoa maravilhosa que apareceu na minha vida, e me mostrou que o mais importante da vida é ser feliz. Poderia tentar escrever mais, mas dificilmente conseguiria expressar tudo o que sinto, em resumo:

EU TE AMO

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pois sem ELE nada se realizaria.
- A Prof^a Maria Valnice, por todos os momentos de trabalho e discussão que contribuíram para minha formação, pela atenção dispensada sempre que foi necessário, e acima de tudo, pela ótima convivência e boas risadas.
- Ao Prof. Nelson Stradiotto, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelas discussões científicas, pelo bom humor e disposição em contribuir para nossa formação.
- A Erika, minha mulher, por esses anos maravilhosos de vida juntos que me transformaram em um homem melhor, por acreditar em mim muito mais do que eu mesmo, pelo imenso trabalho em inspecionar meus originais e me entender melhor do que ninguém.
- A Prof.^a Hideko, pelo grande interesse em tentar unificar o grupo de trabalho.
- Ao André, pela grande amizade, que levarei comigo por toda a vida, pelas discussões mais produtivas e improdutivas possíveis, todas regadas a café e cigarro... Pela humildade, simplicidade e competência, tão raras em profissionais altamente capacitados.
- Ao Função, atualmente Prof. Marcos, pela orientação e incentivo no início de minha vida como pesquisador, pela grande amizade e pelas incansáveis discussões científicas.
- A Regina e Daniela, pela ótima convivência e amizade, que fizeram com que os dias de trabalho transcorressem de maneira muito agradável e divertida.
- Ao Magno, um amigo bem divertido e extremamente apressado.
- Aos amigos de minha graduação: Toni, Fernando, Luizão, Digão, Haruo, Joel, Gatti, Fabiano (loukaço), Zé Ricardo e Eurico, que a vida se encarregou de separar, mas a amizade firmada jamais será abalada pela distancia.
- A Fernando (Caracol) e Saulo, os meus primeiros orientados, pessoas de temperamento e comportamento tão diferentes que me ensinaram o quanto é difícil a arte de orientar.
- Aos colegas do grupo de trabalho: Fabiana, Michele, Paula, Thaís, Diana, Elaine, Paulo Brasil, Antonio, Marcelo, Fernando Montanha, Marquinhos, Leandro e todos aqueles que eu não lembro no momento.

- Ao Prof. Nerilso Bocchi, por ser meu primeiro orientador e sempre me incentivar na busca de respostas para as minhas inumeráveis perguntas.
- Aos Professores do IQ-UNESP: Mercedes Moraes, José Anchieta, Helena Pezza, Arnaldo Cardoso e Massao, os quais, eu não tive oportunidade de convivência, mas por serem profissionais competentes, servem de inspiração para minha carreira profissional.
- A Dona Thelma, Mônica, Albertinho e Rupert, pessoas fantásticas, que me receberam muito bem e me fizeram sentir da família.
- Aos casais de amigos: Adriana e Roberto Gallegos, Natilene e Osama, Diniz e Conceição, Fernando e Ivana e André e Regina, pelos ótimos momentos que passamos juntos.
- Aos amigos do Bar do Deco: Jonas, Marcelo, Tião, Bi, Caio, Cabeça, Warner, Lê, Marcelo Meira, Vando, Clayton, Douglas, Jorge, Eduardo, Gú e até o Dado, pessoas tão diferentes que em vários momentos, os bate-papos bem descontraídos e interessantes, que me fazem esquecer os assuntos acadêmicos.
- Aos amigos da “família trapo”: Alan, Kirian, Adriana, Cleones, Natilene e Ozelito.
- Aos amigos e colegas do IQ: Cláudio, Adriano, Willian, Wanderson, Adriana, Cristine, Marcos (Tomate), Patrícia, Silvana, Emerson, Daniel, Andrezinho, Marie e tantos outros que convivi durante minha breve estadia nessa instituição.
- Aos novos amigos de Chapadinha: Lívio, Rafael, Claudia, Isabel, João, Luis Henrique, Gilvanda e Gildmar, pessoas agradabilíssimas que compensam os aspectos limitantes da vida no “sertão”.
- Ao programa de pós-graduação, por não instituir nenhum limite de folhas de agradecimento, e assim fazer com que possamos agradecer a todos os necessários.
- Aos funcionários do IQ-UNESP.
- E por ultimo, mas não menos importante, a FAPESP (proc. nº 04/00111-8) pela bolsa concedida.

EPÍGRAFE

"Isso não é mais que mais uma tese, quem dera fosse uma declaração de amor."

"Começaria tudo outra vez, se preciso fosse meu amor, a chamar em meu peito ainda queimá, saiba, nada foi em vão..." (Gonçaguinhá)

"Eu sei, até parece sério, mas é tudo armação, o problema é muita estrela pra pouca constelação." (Raul Seixas)

"You can fool some people some times, but you can't fool all the people all the time..." (Bob Marley)

RESUMO

O presente trabalho investiga a aplicação de eletrodos impressos, de carbono (SPCE) e ouro (SPGE), na determinação de espécies de interesse farmacêutico, tais como, aurotiomalato, L-dopa e procaína, utilizando sistemas convencionais, com fluxo de solução e análise por injeção em fluxo, respectivamente. Após a otimização de todos os parâmetros voltamétricos e inerentes da técnica construí-se curvas analíticas para cada composto farmacêutico com respostas lineares entre concentrações de $1,4 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, $1,5 \times 10^{-6}$ a $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o aurotiomalato, a L-dopa e a procaína, respectivamente. O método foi aplicado na determinação dessas espécies em formulações farmacêuticas. A construção e caracterização voltamétrica de eletrodos de carbono impresso (SPCE) por filmes de poli-histidina (PH) foi também investigada com intuito de ampliar o nível de sensibilidade e seletividade dos métodos voltamétricos. Para isso, foram testados três diferentes procedimentos de para a construção dos eletrodos modificados: a adição direta de uma solução do polímero (SPCE/PH), a utilização de uma reação cruzada entre a poli-histidina e o glutaraldeído (SPCE/Glu-PH) e a eletropolimerização a partir do monômero histidina (SPCE/EPH). O comportamento voltamétrico dos eletrodos modificados mostrou-se fortemente dependente do procedimento de preparação dos filmes. Eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH apresentaram uma alta eficiência na pré-concentração de ânions, como o ferricianeto. Não sendo observado nenhum efeito eletrocatalítico para a oxidação de ácido ascórbico com esses eletrodos. Já para o SPCE/EPH foi observado um baixo desempenho na pré-concentração de ânions, mas um pronunciado efeito eletrocatalítico para a oxidação de ácido ascórbico. A aderência e estabilidade das respostas obtidas para os filmes apresentaram valores de desvio padrão de 6,1, 5,6 e 4,8 % para 10 medidas consecutivas utilizando os SPCE/PH, SPCE/Glu-PH e SPCE/EPH, respectivamente. Sugerindo uma boa aderência para os filmes formados. A aplicação de eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH na determinação de isoniazida, pirazinamida, aurotiomalato e crômio VI. Utilizando o SPCE/EPH foi observada uma diminuição no sobrepotencial de redução para a isoniazida e a pirazinamida, quando comparado ao SPCE não modificado. Esse efeito não foi observado para os SPCE/PH e SPCE/Glu-PH. Para ambos os analitos, o SPCE/EPH foi avaliado por diferentes técnicas voltamétricas, sendo os melhores resultados obtidos por voltametria de pulso diferencial (DPV), a qual exibiu respostas lineares no intervalo de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para a isoniazida e de $9,0 \times 10^{-7}$ a $9,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para a pirazinamida. Para a análise de aurotiomalato e crômio, os melhores resultados foram obtidos com o SPCE/PH, onde foi verificado um aumento no sinal de redução, devido a pré-concentração das espécies sobre a superfície eletródica. Todos os parâmetros experimentais pertinentes foram estudados e otimizados, e o método desenvolvido apresentou uma resposta linear para concentrações no intervalo de $4,9 \times 10^{-6}$ a $8,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o aurotiomalato e para o crômio VI, respectivamente. Os procedimentos foram aplicados na determinação dessas espécies em urina humana e em efluente da indústria de couro, respectivamente.

ABSTRACT

The present work investigated the application of screen-printed carbon (SPCE) and screen-printed gold electrodes (SPGE) in the determination of species of pharmaceutical interest, such as, aurothiomalate, L-dopa and procaine. The performance of all electrodes was tested in a conventional electrochemical system, and also in two electrochemical cells using amperometric detection. The first one was constructed to operate on hydrodynamic system and the second one to work on flow injection analysis (FIA) system. Analytical curves were obtained for all systems with linear relationship from peak current vs concentration from 1.4×10^{-6} to 1.5×10^{-4} mol L⁻¹ for aurothiomalate; 1.5×10^{-6} to 6.6×10^{-4} mol L⁻¹ for L-dopa and 1.0×10^{-5} to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ for procaine, respectively. The method was tested in pharmaceutical compounds with good recovery. Screen-printed carbon electrodes (SPCE) can be easily modified with poly-histidine (PH) films using three different procedures: by direct addition of a poly-histidine solution on the electrode surface (SPCE/PH), using a cross-link reaction between poly-histidine and glutaraldehyde (SPCE/Glu-PH) and by electropolymerization of the histidine monomer (SPCE/EPH). The voltammetric behavior of the three modified electrodes was evaluated using potassium hexacyanoferrate(III) and ascorbic acid as model compounds. All modified electrode from stable films, but SPCE coated by deposition of PH and Glu-PH presented higher efficiency for pre concentration anions, while SPCE coated by electropolymerization of the monomer (EPH) presented pronounced electrocatalytic effect in the ascorbic acid oxidation. The resulting PH films presented good adherence and high stabilities and they were applied in the voltammetric analysis of isoniazide, pyrazinamide, aurothiomalate and chromium (VI). The best experimental condition for isoniazide and pyrazinamide were obtained for SPCE/EPH, since the film promoted good electrocatalytic effect in their reduction. The optimized method presented analytical curves with linear response from concentration 5.0×10^{-7} to 1.1×10^{-4} mol L⁻¹ for isoniazide and from 9.0×10^{-7} to 9.6×10^{-5} mol L⁻¹ for pyrazinamide, using differential pulse voltammetry (DPV). The method was successfully applied in determination of both analytes in human urine. Screen printed carbon electrode modified with poly-histidine film obtained by PH deposition (SPCE/PH) was successfully applied for aurothiomalate and chromium(VI) determination based on its pre concentration on the electrode surface by electrostatic interaction. Using the best experimental conditions, analytical curves were obtained for both compounds, with linear response from 4.9×10^{-6} to 8.7×10^{-5} mol L⁻¹ and 1.0×10^{-7} to 1.5×10^{-5} mol L⁻¹ for aurothiomalate and chromium (VI) concentrations, respectively. The method was applied for determination of aurothiomalate in human urine and chromium (VI) in wastewater from leather industry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura molecular da histidina na forma monomérica (A) e polimerizada (B).	27
Figura 2	Estrutura molecular do aurotiomalato (AuTM) de sódio.	28
Figura 3	Estrutura molecular da L-dopa.	33
Figura 4	Estrutura molecular da procaína.	35
Figura 5	Estrutura molecular da isoniazida.	37
Figura 6	Estrutura molecular da pirazinamida.	41
Figura 7	Eletrodos de carbono impresso, onde W é o eletrodo de trabalho, R o eletrodo de referência, A o eletrodo auxiliar e C o contato elétrico.	50
Figura 8	Eletrodos impresso de ouro (I) e carbono (II), onde W é o eletrodo de trabalho, R o eletrodo de referência, A o eletrodo auxiliar e C o contato elétrico.	50
Figura 9	Diagrama esquemático da célula com fluxo de solução empregada em medidas voltamétricas e amperométricas.	51
Figura 10	Detector com o eletrodo de carbono impresso (A), onde: C- contato elétrico, CE- contra eletrodo, WE- eletrodo de trabalho, RE- eletrodo de referência, CF- contato externo, PB – Bloco de poliuretana, PT- Tubo de polietileno. Configuração do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado (B), onde: C- solução transportadora, P- bomba peristáltica, W- descarte, I- Injetor, L- alça de amostragem, S- amostra, D- detector.	52
Figura 11	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, sobre SPCE sem condicionamento (curva A) e após aplicação de $-1,1\text{V}$, durante 60 s (curva B).	60
Figura 12	Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, contendo $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons Au^{3+} (curva A), $5,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM (curva B) e $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons Au(III) junto com $5,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM (curva C).	61
Figura 13	Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de diferentes concentrações de HCl, na presença de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons AuTM, após a aplicação $-1,4 \text{ V}$ (vs. carbono impresso), por 60 s a 100 mVs^{-1} (A) pH = 1,0, (B) pH = 2,0, (C) pH = 3,0 e (D) pH = 4,0.	62
Figura 14	Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons	63

- AuTM, após a aplicação de -1,2 V (vs. carbono impresso), por diferentes tempos, (1) = 0s, (2) = 5s, (3) = 10s, (4) = 20s, (5) = 30s, (6) = 60s e (7) = 90s.
- Figura 15 Variação da corrente de pico anódica obtida para o SPCE em solução de 0,1 mol L⁻¹ de HCl contendo 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de íons AuTM após a aplicação de potenciais de acúmulo variando entre -800 a -1800 mV (vs. C impresso) e mantidos por 60 s. 64
- Figura 16 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de 0,1 mol L⁻¹ de HCl contendo 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de íons AuTM, após a aplicação -1,4 V (vs. carbono impresso), por 60 s, em diferentes velocidades de varredura, (1) = 5, (2) = 10 (3) = 25, (4) = 50, (5) = 75, (6) = 100 e (7) = 150 mVs⁻¹ 65
- Figura 17 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl, na presença de diferentes concentrações de AuTM, aplicando as condições otimizadas. 66
- Figura 18 Variação do sinal voltamétrico observado para o SPCE, em solução contendo uma concentração fixa de AuTM, antes e após adição de (1) = Sódio, (2) = Potássio, (3) = Creatinina, (4) = Glicose, (5) = Fosfato, (6) = Uréia, (7) = Albumina. 67
- Figura 19 Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão acetato pH 6 contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de procaína sobre eletrodo de carbono impresso. (A) vs. carbono impresso. (B) vs. Ag/AgCl., v = 50 mV s⁻¹. 69
- Figura 20 Variação da corrente e do potencial de pico anódico extraídos dos voltamogramas registrados em solução contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de procaína ajustada em diferentes valores de pH. 70
- Figura 21 Sinais transientes obtidos para injeções de 400 µL de solução de 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de procaína em diferentes valores potenciais, vazão 3,8 mL min⁻¹. 72
- Figura 22 Sinais transientes obtidos para injeções de 400 µL de solução de 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de procaína aplicando-se um potencial de 0,8 V (vs. Carbono impresso) em diferentes vazões: (a) 1,1, (b) 2,0, (c) 2,8, (d) 3,8 e (e) 6,5 mL min⁻¹. 73
- Figura 23 Variação do tempo de resposta, tempo de limpeza e frequência de injeção para diferentes vazões empregadas. 74
- Figura 24 Sinais transientes obtidos para injeções de diferentes volumes de amostragem: (a) 100 (b) 200, (c) 300, (d) 400 e (e) 600 µL de uma solução de 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de procaína, potencial aplicado 0,8 V e vazão 3,8 mL min⁻¹. 75

- Figura 25 Sinais transientes obtidos para diferentes concentrações de procaína. (a) $1,0 \times 10^{-5}$, (b) $2,5 \times 10^{-5}$, (c) $5,0 \times 10^{-5}$, (d) $7,5 \times 10^{-5}$, (e) $1,0 \times 10^{-4}$, (f) $2,0 \times 10^{-4}$ e (g) 3×10^{-4} mol L⁻¹. Curva analítica inserida. 76
- Figura 26 Sinais transientes obtidos nas condições otimizadas para injeções de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de procaína, obtido com diferentes proporções entre padrão e amostra: (A) $5,0 \times 10^{-5}$:0,0, (B) $4,0 \times 10^{-5}$: $1,0 \times 10^{-5}$, (C) $3,0 \times 10^{-5}$: $2,0 \times 10^{-5}$, (D) $2,0 \times 10^{-5}$: $3,0 \times 10^{-5}$, (E) $1,0 \times 10^{-5}$: $4,0 \times 10^{-5}$ e (F) 0,0: $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. 77
- Figura 27 Voltamogramas obtidos em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 3,0) na ausência (curva A) e na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de L-dopa (curva B). 79
- Figura 28 Calibração da célula de fluxo, valores da vazão obtida em função da voltagem aplicada ao motor. 81
- Figura 29 Voltamogramas obtidos em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 3,0) na ausência (curva A) e na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de L-dopa (curva B e C), em condição estática (curva A e B) e dinâmica com fluxo de 7,7 mL min⁻¹ (curva C). 82
- Figura 30 Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica (A) e variação da sensibilidade amperométrica em função do potencial (B) obtidas para a oxidação de $9,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de L-dopa em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,0 para potenciais de: (a) 400, (b) 500, (c) 600, (d) 700 e (e) 800 mV. 83
- Figura 31 Influência da vazão sobre a resposta amperométrica do eletrodo impresso de ouro para a oxidação de L-dopa $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,0. E_{ap} = 800 mV. 84
- Figura 32 Resposta amperométrica (A) e curva analítica obtida para L-dopa em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,0 (B), vazão = 14,1 mL min⁻¹. (a) $1,5 \times 10^{-6}$, (b) $4,3 \times 10^{-6}$, (c) $9,5 \times 10^{-6}$, (d) $2,0 \times 10^{-5}$, (e) $4,2 \times 10^{-5}$, (f) $8,5 \times 10^{-5}$, (g) $1,7 \times 10^{-4}$, (h) $3,4 \times 10^{-4}$, (i) $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de L-dopa. 85
- Figura 33 Resposta amperométrica e curva de adição padrão (inserida) obtida para a determinação de L-dopa na formulação farmacêutica SINEMET, E_{ap} = 0,8 V; vazão = 14,1 mL min⁻¹. 86
- Figura 34 Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (curva B). 87
- Figura 35 Voltamograma cíclico obtido para o SPGE modificado pela adição direta de PH, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). 89

Figura 36	Variação da corrente de pico, anódica (A) e catódica (B), obtida para o SPGE/PH, em função do número de ciclos realizados.	90
Figura 37	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), contendo 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆], para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (curva B).	91
Figura 38	Representação esquemática da modificação de um eletrodo de ouro impresso (SPGE) por uma monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA).	92
Figura 39	Representação da ionização do MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro impresso.	93
Figura 40	Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPGE não modificado (curva A), modificado com MPA (curva B) em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆], e para o SPGE modificado com MPA em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) após ciclado na presença de 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆].	93
Figura 41	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (SPGE/MPA-PH) (curva B).	94
Figura 42	Variação da corrente de pico, anódica (A) e catódica (B), obtida para o SPGE/PH em função do número de ciclos realizados para o SPGE/MPA-PH.	95
Figura 43	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (SPGE/MPA-PH) (curva B).	96
Figura 44	Voltamogramas cíclicos obtidos a 50 mV s ⁻¹ com SPGE não modificados (a) e SPGE/MPA-PH (b) em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo ajustada em 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de ferricianeto de potássio ajustada em diferentes valores de pH: 2,3 (A), 4,0 (B), 5,9 (C), 8,1 (D) e 9,4 (E). A diferença de corrente obtida para os SPGE/MPA-PH em função do pH da solução (F).	97
Figura 45	Representação da ionização da poli-histidina.	98
Figura 46	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl pH 5, contendo 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆], sobre eletrodos de carbono impresso, utilizando o eletrodo de pseudo-referência (curva A) e um eletrodo convencional de Ag/AgCl KCl _{sat.} (curva B).	100
Figura 47	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl pH 5, contendo 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆], para o SPCE não modificado (curva A) e para o SPCE/PH modificado pela adição direta de poli-histidina, seco a temperatura ambiente (curva B), e	101

em estufa a 80 °C (Curva C), $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

- Figura 48 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE modificado pela adição direta de poli-histidina em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl pH 5 após imersão em solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio diferentes tempos de acumulação, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. 103
- Figura 49 Modelo esquemático de um filme de polieletrólito na superfície de um eletrodo. Nesse exemplo o eletrodo está em equilíbrio em uma solução contendo um eletrólito C^+X^- não eletroativo e um par eletroativo Z/Z^2 [24,25]. 103
- Figura 50 Voltamogramas cíclicos obtidos sobre SPCE não modificado (curva B) e SPCE/Glu-PH (curva A) modificado com a adição de glutaraldeído em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 5, contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. 105
- Figura 51 Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato pH 9, contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de histidina, sobre SPCE, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$. 106
- Figura 52 Voltamogramas cíclicos obtidos sobre SPCE não modificado e SPCE/EPH modificado com a adição de glutaraldeído em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 5, contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. 107
- Figura 53 Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato pH = 5,0 contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico sobre diferentes eletrodos: (A) SPCE, (B) SPCE/EPH, (C) SPCE/PH e (D) SPCE/Glu-PH. 109
- Figura 54 Representação da superfície do eletrodo SPCE construído a partir da eletropolimerização da histidina (SPCE/EPH). 110
- Figura 55 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência (curva A) e na presença (curva B) de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. 112
- Figura 56 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência (curva A) e na presença (curva B) de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. 113
- Figura 57 Voltamogramas cíclicos obtidos com os SPCE não modificado (a) e modificados SPCE/PH (b), SPCE/Glu-PH (c) e SPCE/EPH (d) em solução tampão acetato pH 5,0, na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. 114
- Figura 58 Voltamogramas cíclicos obtidos com os SPCE não modificado (a) e modificados SPCE/PH (b), SPCE/Glu-PH (c), SPCE/EPH (d) em solução tampão fosfato pH 5,0, na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. 115

- Figura 59 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SCPE/EPH, em solução tampão fosfato contendo $3,0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 7,0 (d), 9,0 (e) e 11,0 (f). 117
- Figura 60 Variação do potencial e da corrente de pico catódica, em função do pH da solução. 118
- Figura 61 Circuito elétrico equivalente utilizado nas medidas de impedância eletroquímica, para os eletrodos de carbono impresso modificados e não modificados, na presença de isoniazida. 120
- Figura 62 Gráfico de impedância no plano complexo, obtido para o eletrodo de carbono impresso não modificado, na presença de 1 mmol L^{-1} de INZ, em potencial de $-0,9 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) (Curva A). Simulações empregando um circuito elétrico equivalente utilizando como componentes, um capacitor (Curva B) e um elemento de fase constante (Curva C). 121
- Figura 63 Gráfico de impedância no plano complexo obtido para os eletrodos de carbono impresso: não modificado (Curva B) e modificados: pela eletropolimerização da histidina (Curva A), pela adição direta de poli-histidina (Curva D) e utilizando glurataldeído (Curva C), em solução tampão acetato pH 5,0, na presença de 1 mmol L^{-1} de INZ, em potencial de $-0,9 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). 122
- Figura 64 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, após aplicação, por 60s, de diferentes valores de potencial: $-0,4 \text{ V}$ (Curva A), $-0,6 \text{ V}$ (Curva B) $-0,8 \text{ V}$ (Curva C) e potencial de circuito aberto (Curva D). 124
- Figura 65 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão acetato pH 7,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, imediatamente após a imersão do eletrodo (Curva A) e após 200 segundos de imersão (Curva B). 125
- Figura 66 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão acetato pH 7,0, na presença de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida (Curva A), e em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência de isoniazida, após ciclagem de potencial (Curva B) ou imersão por 10 minutos (Curva C) em solução contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. 126
- Figura 67 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/EPH em solução tampão fosfato pH 7,0, para diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $1,5 \times 10^{-6}$, (c) $3,5 \times 10^{-6}$, (d) $7,5 \times 10^{-6}$, (e) $1,5 \times 10^{-5}$, (f) $3,0 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$ e (i) $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando as condições otimizadas. Em detalhe é mostrada a curva analítica. 128

- Figura 68: Variação da corrente de pico catódica, em função da amplitude de pulso (A) e do tempo de duração do pulso (B). 129
- Figura 69 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $5,0 \times 10^{-7}$, (c) $1,5 \times 10^{-6}$, (d) $3,5 \times 10^{-6}$, (e) $7,5 \times 10^{-6}$, (f) $1,5 \times 10^{-5}$, (g) $3,0 \times 10^{-5}$, (h) $5,8 \times 10^{-5}$, (i) $1,1 \times 10^{-5}$ e (j) $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em detalhe é mostrada a curva analítica. 130
- Figura 70 Variação da corrente de pico catódica, em função da frequência (A) e da amplitude de pulso (B). 131
- Figura 71 Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $1,5 \times 10^{-6}$, (c) $3,5 \times 10^{-6}$, (d) $7,5 \times 10^{-6}$, (e) $1,5 \times 10^{-5}$, (f) $3,0 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$ e (i) $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em detalhe é mostrada a curva analítica. 132
- Figura 72 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pirazinamida, $v = 50$ mV s⁻¹. 135
- Figura 73 Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado e para modificados, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pirazinamida, $v = 50$ mV s⁻¹. 136
- Figura 74 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SCPE/EPH, em solução tampão fosfato contendo $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de pirazinamida, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 7,0 (d), 9,0 (e) e 11,0 (f). 139
- Figura 75 Variação do potencial pico catódica e anódica, para uma solução contendo $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pirazinamida, sobre SPCE/EPH, em função do pH da solução. 140
- Figura 76 Gráfico de impedância no plano complexo obtido para os eletrodos de carbono impresso: não modificado (Curva B) e modificados: pela eletropolimerização da histidina (Curva A), pela adição direta de poli-histidina (Curva D) e utilizando glurataldeído (Curva C), em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de 1 mmol L⁻¹ de pirazinamida, em potencial de -0,32 V (vs. Ag/AgCl). 143
- Figura 77 Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, para diferentes concentrações de pirazinamida: (a) 0,0, (b) $7,5 \times 10^{-6}$, (c) $1,1 \times 10^{-5}$, (d) $1,6 \times 10^{-5}$, (e) $2,3 \times 10^{-5}$, (f) $3,8 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$, (i) $1,5 \times 10^{-4}$ e (j) $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, aplicando as condições otimizadas. Em detalhe é mostrada a curva analítica. 145

- Figura 78 Gráfico da razão entre as correntes I_{pa}/I_{pc} , em função do logaritmo da concentração de pirazinamida. 146
- Figura 79 Gráfico do potencial de pico catódico (E_{pc}), em função do logaritmo da concentração de pirazinamida. 147
- Figura 80 Voltamogramas de pulso diferencial (A) obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de diferentes concentrações de pirazinamida: (a) 0,0, (b) $9,0 \times 10^{-7}$, (c) $3,0 \times 10^{-6}$, (d) $8,0 \times 10^{-6}$, (e) $2,1 \times 10^{-5}$, (f) $3,5 \times 10^{-5}$, (g) $6,4 \times 10^{-5}$, (h) $9,6 \times 10^{-5}$ e (i) $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em detalhe é mostrada a curva analítica (B). 149
- Figura 81 Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de diferentes concentrações de pirazinamida: (a) 0,0, (b) $3,0 \times 10^{-6}$, (c) $7,0 \times 10^{-6}$, (d) $1,6 \times 10^{-5}$, (e) $3,4 \times 10^{-5}$, (f) $5,7 \times 10^{-5}$, (g) $8,0 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-5}$ e (i) $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em detalhe é mostrada a curva analítica. 150
- Figura 82 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE não modificado (curva A), para os SPCE modificados pela adição direta da polihistidina (curva B) e pela polimerização eletroquímica (curva C), em solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após a aplicação de $-1,1 \text{ V}$, por 60 s. 153
- Figura 83 Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE não modificado (curva A) e SPCE/PH (curva B), em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM. 154
- Figura 84 Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE não modificado (curva A) e SPCE/PH (curva B), em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após condicionamento em potencial de $0,9 \text{ V}$, por 90 s. 155
- Figura 85 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 90 s de condicionamento, em diferentes valores de potencial: $0,6 \text{ V}$ (a), $0,7 \text{ V}$ (b), $0,8 \text{ V}$ (c), $0,9 \text{ V}$ (d), $1,0 \text{ V}$ (e) e $1,1 \text{ V}$ (f). 156
- Figura 86 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, modificado pela adição direta do polímero, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, iniciando a varredura em diferentes valores de potencial: $0,8 \text{ V}$ (a), $1,0 \text{ V}$ (b), $1,2 \text{ V}$ (c). 157
- Figura 87 Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0), contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM (a), e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Au^{3+} (b), pré-acumulado por 90 s, em potencial de $0,8 \text{ V}$ (A) e $1,0 \text{ V}$ (B). 158
- Figura 88 Diagrama de distribuição de espécies complexas formadas entre 160

- os íons Au^{3+} e Cl^- , em função do logaritmo da concentração de íons cloreto.
- Figura 89 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 2,0 (b), 3,0 (c) e 4,0 (d), após 60 s de pré-concentração, em 1,0 V. 161
- Figura 90 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 1,0) contendo $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após diferentes tempos de acúmulo, sob aplicação de 0,8 V (vs. Ag/AgCl), a 50 mVs^{-1} (curva A) e os resultados obtidos (curva B). 162
- Figura 91 Voltamogramas de varredura linear para o SPCE/PH, modificado pela adição direta do polímero, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 60 s de condicionamento, sob aplicação de 0,8 V (vs. Ag/AgCl KCl sat.), em diferentes velocidades de varredura (curva A). Variação da corrente de pico catódica em função de $v^{1/2}$ (curva B). 163
- Figura 92 Voltamogramas de varredura linear, obtidos para eletrodos de carbono impresso não modificado (A) e modificados SPCE/EPH (B), SPCE/GLU-PH (C) e SPCE/PH (D), em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 60 s de pré-concentração, em 1,0 V. 164
- Figura 93 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH = 1,0), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) 0,0, (b) $8,0 \times 10^{-6}$, (c) $1,8 \times 10^{-5}$, (d) $2,6 \times 10^{-5}$, (e) $5,4 \times 10^{-5}$, (f) $7,5 \times 10^{-5}$, (g) $1,1 \times 10^{-4}$ e (h) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando as condições otimizadas. 166
- Figura 94 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes valores de amplitude de pulso: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 mV. 167
- Figura 95 Voltamogramas de pulsos diferencial (A) obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes valores de amplitude de pulso: (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50, (e) 75 e (f) 100 ms. Variação da corrente de pico catódica com o tempo de pulso (B). 168
- Figura 96 Voltamogramas de pulso diferencial (A) obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 25 e (f) 30 mVs^{-1} . Variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura (B). 169
- Figura 97 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/PH, em 170

- solução de 0,1 de KCl (pH = 1,0), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) 0,0, (b) $4,8 \times 10^{-6}$, (c) $1,2 \times 10^{-5}$, (d) $2,5 \times 10^{-5}$, (e) $4,8 \times 10^{-6}$, (f) $6,7 \times 10^{-5}$, (g) $8,7 \times 10^{-5}$ e (h) $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Curva analítica B.
- Figura 98 Variação da corrente de pico catódica em função das diferentes amplitudes empregadas (B). 171
- Figura 99 Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/PH, em solução de 0,1 mol L⁻¹ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de AuTM, em diferentes valores de frequência: (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100 e (f) 150 Hz. Variação da corrente de pico catódica em função das diferentes frequências estudadas (B). 172
- Figura 100 Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/PH, em solução de 0,1 mol L⁻¹ de KCl (pH = 1,0), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) 0,0, (b) $1,2 \times 10^{-5}$, (c) $2,5 \times 10^{-5}$, (d) $3,7 \times 10^{-5}$, (e) $4,7 \times 10^{-5}$, (f) $6,0 \times 10^{-5}$, (g) $8,8 \times 10^{-5}$ e (h) $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, aplicando as condições otimizadas. 173
- Figura 101 (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 1,0), contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de AuTM, na presença de diferentes volumes de urina: 0 (a), 10 (b), 20 (c), 50 (d), 100 (e), 200 (f) e 300 μ L (g). (B) Variação percentual da corrente de pico catódica em função do volume de urina adicionado. 175
- Figura 102 Variação percentual da corrente de pico catódica, em função do volume de urina adicionado: com pré-tratamento (A) e sem pré-tratamento (B). 176
- Figura 103 Voltamogramas cíclicos obtidos para SCPE não modificado (curva a) e SPCE/PH (curva b), em solução de tampão acetato pH 4,4 contendo $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cr (VI), após 1 minuto de imersão. 177
- Figura 104 Voltamogramas de varredura linear, obtidos em solução tampão acetato pH 4,4 contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cr (VI), para os eletrodos modificados: SPCE/EPH (a), SPCE/Glu-PH (b) e SPCE/PH (c), após 1 minuto de imersão. 178
- Figura 105 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução de tampão acetato contendo $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cr^{VI}, ajustada em diferentes valores de pH: (a) 2,6 (b) 3,4 (c) 4,4 (d) 5,4 (e) 6,5 e (f) 7,3, após 1 minuto de imersão. 180
- Figura 106 Diagrama de distribuição de espécies para o ácido crômico, em função do pH. 181
- Figura 107 Variação da corrente de pico catódica e do potencial de pico catódico obtido para o SPCE/PH em solução de tampão acetato 183

contendo $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cr}^{\text{VI}}$, em função do pH da solução.

- Figura 108 Influência do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico catódica, para o SPCE/PH, em solução de tampão acetato pH 4,4 contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) de Cr (VI). 185
- Figura 109 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução tampão acetato pH 4,4, contendo diferentes concentrações de Cr (VI): 0,0 (a), $1,0 \times 10^{-7}$ (b), $7,5 \times 10^{-7}$ (c), $1,6 \times 10^{-6}$ (d), $3,2 \times 10^{-6}$ (e), $5,5 \times 10^{-6}$ (f), $1,0 \times 10^{-5}$ (g), $1,5 \times 10^{-5}$ (h) e $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (i). 186
- Figura 110 Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução tampão acetato pH 4,4, contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr (VI) contendo 0,0 mol L⁻¹ (A), $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (B) $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C) e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (D) de permanganato. 188

Lista de Tabelas

Tabela 1	Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o AuTM empregando um SPCE.	66
Tabela 2	Valores obtidos na determinação de AuTM em amostras de urina empregando o SPCE não modificado.	68
Tabela 3	Parâmetros estudados na otimização do sistema para a determinação de procaína.	76
Tabela 4	Resultados dos experimentos de adição e recuperação usando o procedimento proposto para determinação de procaína.	78
Tabela 5	Comparação entre os resultados obtidos com o método proposto e o método oficial.	78
Tabela 6	Determinação de L-dopa em formulações farmacêuticas empregando o método proposto e o preconizado pela farmacopéia.	86
Tabela 7	Valores de resistência a transferência de carga calculada para os eletrodos de carbono impresso não modificados e modificados por filmes de PH para a redução de isoniazida.	123
Tabela 8	Parâmetros extraídos das curvas analíticas obtidas para redução de isoniazida, sobre eletrodo SPCE/EPH, em tampão fosfato pH 7,0.	133
Tabela 9	Valores encontrados na determinação de isoniazida utilizando SPCE/EPH.	134
Tabela 10	Valores da corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) e da razão I_{pa}/I_{pc} em função do pH.	139
Tabela 11	Valores de resistência a transferência de carga calculada para os eletrodos de carbono impresso não modificados e modificados por filmes de PH para a redução de pirazinamida.	144
Tabela 12	Valores encontrados na determinação de pirazinamida utilizando SPCE/EPH.	152
Tabela 13	Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o AuTM empregando um SPCE/PH.	165
Tabela 14	Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH por voltametria de pulso diferencial.	170
Tabela 15	Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH por voltametria de onda quadrada.	173

Tabela 16	Resultados obtidos por diferentes técnicas, utilizando SPCE/PH, para a determinação de AuTM.	174
Tabela 17	Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH.	186
Tabela 18	Valores obtidos para determinação de cromo em amostras de águas residuais.	189

Lista de Esquemas

Esquema 1	Representação da reação entre a poli-histidina e o glutaraldeído na superfície do eletrodo de carbono impresso.	101
Esquema 2	Representação da interação entre o filme de PH e o complexo de ouro.	161
Esquema 3	Representação da interação do filme de PH e as possíveis espécies de cromo.	182

Sumário

Capítulo I	Introdução	
I.1	Sensores eletroquímicos	20
I.2	Eletrodos impressos	21
I.3	Eletrodos modificados por poliaminoácidos	23
I.4	Poli-histidina	26
I.5	Analitos avaliados	28
I.5.1	Determinação de aurotiomalato (AuTM)	28
I.5.2	Determinação de L-dopa	33
I.5.3	Determinação de procaína	35
I.5.4	Determinação de isoniazida	37
I.5.5	Determinação de pirazinamida	40
I.5.6	Determinação de crômio	42
Capítulo II	Objetivos	47
Capítulo III	Parte Experimental	48
III. 1	Equipamentos	49
III.2	Eletrodos e células eletroquímicas	49
III.2.1	Eletrodos de carbono impresso (SPCE)	49
III.2.2	Eletrodos de ouro impresso (SPGE)	50
III.2.3	Célula convencional	51
III.2.4	Célula com fluxo de solução	51
III.2.5	Célula empregada no sistema de análise por injeção em fluxo	52
III.3	Soluções e reagentes	52
III.4	Procedimento de modificação dos eletrodos impressos	53
III .4.1	Modificação dos eletrodos de carbono impresso (SPCE)	53
III .4.1.1	Eletropolimerização (SPCE/EPH)	54
III .4.1.2	Adição direta do poliaminoácido (SPCE/PH)	54

III .4.1.3	Utilização de glutaraldeído (SPCE/Glu-PH)	54
III .4.2	Modificação dos eletrodos de ouro impresso (SPGE)	55
III .4.2.1	Adição direta do poliaminoácido (SPGE/PH)	55
III .4.2.2	Utilização do ácido 3-mercaptopropiônico (SPGE/MPA-PH)	55
III. 5	Procedimentos empregados para a determinação dos analitos em amostras	55
III. 5.1	Determinação de aurotiomalato em urina humana	55
III. 5.2	Determinação de L-dopa em formulação farmacêutica	56
III. 5.3	Determinação de procaína em formulação farmacêutica	56
III. 5.4	Determinação de Isoniazida em urina humana	57
III. 5.5	Determinação de piraminamida em urina humana	57
III. 5.6	Determinação de cromo em água de curtume	58
Capítulo IV	Resultados e discussões	59
IV.1	Determinação de aurotiomalato (AuTM) por voltametria usando eletrodo de carbono impresso	60
IV.1.1.	Otimização dos parâmetros para análise voltamétrica de redissolução anódica	63
IV.1.2.	Curva analítica e aplicação do método	65
IV.2	Emprego de um eletrodo de carbono impresso como detector amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de procaína	69
IV.2.1	Comportamento voltamétrico da procaína sobre SPCE.	69
IV.2.2	Utilização do SPCE como um detector amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo.	71
IV.2.2.1	Otimização dos parâmetros experimentais	71
IV.2.2.2	Curva analítica e aplicação do método	75
IV.3	Determinação amperométrica de l-dopa utilizando um eletrodo impresso de ouro empregando um sistema com fluxo de solução	79
IV.3.1.	Comportamento Voltamétrico da L-dopa em sistema convencional	79

IV.3.2	Comportamento Voltamétrico da L-dopa em um sistema com fluxo de solução	80
IV.3.2.1.	Curva Analítica e aplicação do método	84
IV.4	Modificação de eletrodos de ouro impresso por filmes de poli-histidina (SPGE/PH)	87
IV.4.1	Modificação de eletrodos de ouro impresso pela adição direta de poli-histidina (SPGE/PH)	87
IV.4.2	Modificação de eletrodos de ouro impresso por filmes de poli-L-histidina utilizando o ácido 3-mercaptopropiônico (SPGE/MPA-PH).	92
IV. 5	Modificação de eletrodos de carbono impresso por filmes de poli-histidina	99
IV.5.1	Características do SPCE não modificado	99
IV.5.2.	Caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados por poli-histidina utilizando ferricianeto	100
IV.5.2.1	Modificação de eletrodos de carbono impresso pela adição direta de poli-histidina	100
IV. 5.2.2	Modificação de eletrodos de carbono impresso pela adição de mistura de poli-histidina e glutaraldeído (SPCE/Glu-PH)	104
IV.5.2.3	Modificação de eletrodos de carbono impresso por filmes de poli-histidina por eletropolimerização (SPCE/EPH)	106
IV.5.3	Caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados por poli-histidina utilizando ácido ascórbico	108
IV.6	Aplicação dos eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH na análise de isoniazida	112
IV.6.1	Comportamento voltamétrico da isoniazida sobre SPCE não modificado	112
IV.6.2	Comportamento voltamétrico da isoniazida sobre SPCE modificado por filmes de PH	113
IV.6.3	Medidas de impedância eletroquímica	119
IV.6.4	Determinação de isoniazida utilizando SPCE/EPH	124
IV.6.4.1	Utilização da voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada	128
IV.6.4.2	Comparação das técnicas voltamétricas e aplicação do	133

	método	
IV.7	Aplicação dos eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH na análise de pirazinamida	135
IV.7.1	Comportamento voltamétrico da pirazinamida sobre SPCE não modificado	135
IV.7.2	Comportamento voltamétrico da pirazinamida sobre SPCE modificado por filmes de PH	136
IV.7.3	Medidas de impedância eletroquímica	142
IV.7.4	Determinação voltamétrica de pirazinamida sobre SPCE/EPH	144
IV.7.5	Determinação de pirazinamida por SPCE/EPH utilizando voltametria de pulso diferencial e onda quadrada	148
IV.7.6	Comparação das técnicas voltamétricas e aplicação do método para determinação de pirazinamida	151
IV.8	Avaliação dos eletrodos de carbono impresso, modificados por filmes de PH, na presença de AuTM	153
IV.8.1	Estudo do comportamento voltamétrico do AuTM sobre SPCE por redissolução anódica	153
IV.8.2	Estudo do comportamento voltamétrico do AuTM sobre SPCE por redissolução catódica	154
IV.8.2.1	Redução voltamétrica de aurotiomalato sobre SPCE não modificado e modificado por filmes de PH	154
IV.8.2.2	Otimização dos parâmetros de análise	162
IV.8.2.3	Utilização das voltametrias de pulso diferencial e de onda quadrada	166
IV.8.2.4	Comparação das técnicas voltamétricas e aplicação do método	174
IV.9	Aplicação dos eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH na análise de crômio	177
IV.9.1	Comportamento voltamético do crômio sobre SPCE não modificado e modificado por filmes de PH	177
IV.9.2	Otimização dos parâmetros	184
IV.9.3	Curva analítica e aplicação do método	186
Capítulo V	Conclusões	190

Capítulo VI	Perspectivas futuras	194
Capítulo VII	Referências Bibliográficas	196

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

I.1- SENSORES ELETROQUÍMICOS

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido uma das áreas de maior avanço da química analítica nos últimos anos, tendo merecido inúmeras revisões na literatura [1-10]. Um sensor funciona como um dispositivo capaz de fornecer informações sobre a espécie de interesse, através da medida de alguma propriedade física ou química, o que permite o seu monitoramento. De um modo geral, sensores eletroquímicos fazem uso de uma camada quimicamente seletiva, que isola a resposta do analito da sua vizinhança imediata e promove a sua conversão em um sinal detectável por meio de um transdutor, usando uma instrumentação adequada. Comparado aos diversos tipos de sensores eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutométricos), o uso de sensores amperométricos tem se mostrado bastante atraente, devido a sua simplicidade experimental, ampla aplicação e baixo custo. Estes dispositivos, em geral, funcionam por aplicação de uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência, o que proporciona a oxidação ou redução da espécie eletroativa sobre o eletrodo de trabalho e possibilita a medida da corrente resultante [3,5], a qual é proporcional a concentração do analito. Desta forma, torna-se possível quantificar a espécie de interesse. A aplicação do potencial pode ser constante durante a medida, no caso do sensor amperométrico; ou ser realizada empregando-se uma varredura de potencial, no caso do sensor voltamétrico.

As inúmeras possibilidades de confecção de eletrodos de diferentes materiais eletródicos e tamanhos cada vez mais diferenciados têm contribuído significativamente para o interesse despertado por estes tipos de sensores nas áreas industrial, ambiental, farmacêutica, clínica médica e outras [11,12]. Em adição, a possibilidade de adicionar espécies na superfície eletródica, visando alterar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, tem contribuído para melhorar a seletividade e sensibilidade desses dispositivos. Eletrodos assim preparados são classificados como eletrodos quimicamente modificados (EQM). Dentro deste contexto, os EQM têm ganhado notoriedade pela sua versatilidade, cuja superfície é alterada pela imobilização de espécies de interesse [5-7]. A modificação da

superfície pode ocorrer através de reações químicas, adsorção química, formação de compósitos ou recobrimentos poliméricos. Exemplos destas aplicações incluem o desenvolvimento de sistemas eletrocatalíticos com alta seletividade e atividade química, propriedades anticorrosivas ou fotossensíveis, dispositivos eletrocromáticos, aceleração de reações de transferência de carga, acumulação preferencial e controlada de analitos, exclusão de interferentes e etc. Nesse sentido, EQM são particularmente adequados não só para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos e mecanismos físico-químicos, tanto de espécies orgânicas como inorgânicas.

A eletroanálise consiste no ramo da química analítica com maior diversidade de técnicas disponíveis, além de oferecer metodologias de baixo custo e aplicações nas mais diversas matrizes, algumas vezes sem necessitar de tratamento da amostra. Apesar disso, a sua difusão fora dos laboratórios de pesquisa especializados ainda é muito limitada, devido principalmente à fragilidade da instrumentação e a complexidade dos conceitos fundamentais envolvidos nos processos eletródicos, que requer profissionais bem treinados. Felizmente, este quadro tem mudado nos últimos anos, devido a maior divulgação dos estudos mecanísticos envolvendo redução e oxidação dos mais diferentes analitos (compostos inorgânicos, orgânicos e organometálicos) e a crescente formação de recursos humanos na área. Em adição, tem se observado um vertiginoso melhoramento na qualidade e tecnologia dos novos equipamentos e acessórios eletroquímicos.

I.2. ELETRODOS IMPRESSOS

Atualmente, existem diversos tipos de eletrodos utilizados em determinações analíticas, sendo cada vez mais desenvolvidos dispositivos com maior robustez, que permitem o uso de metodologias mais simplificadas. Adaptações no tamanho e arranjo dos eletrodos permitem a utilização destes em análises em campo, e também na coleta do analito para determinação posterior. Desta forma, visa-se oferecer ao operador não só instrumentos mais econômicos, com respostas sensíveis e seletivas, mas também facilidade de uso e simplicidade na medida da resposta. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de eletrodos impressos (EI) “screen-printed electrode” tem atendido a demanda deste mercado,

oferecendo um completo sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia, ou seja, eletrodos na forma de um único sistema, contendo um arranjo de eletrodos, onde eletrodos de trabalho, auxiliar e referência são impressos no mesmo suporte. São dispositivos de baixo custo e tão funcionais que permitem a comercialização na forma de eletrodos descartáveis. Como consequência, tem mostrado alta versatilidade de aplicações, tanto na forma de eletrodo convencional, quanto na forma de eletrodo modificado [13-23].

Os eletrodos impressos consistem basicamente em um filme depositado sobre um suporte inerte, pelo método conhecido por “silk-screen”, coberto por uma segunda camada de material isolante elétrico, que é responsável pela definição de uma área de contato elétrico interligado a área superficial ativa do eletrodo em outra extremidade, porém recoberta superficialmente [15]. Os métodos de fabricação têm sido revisados por diversos autores [15]. Para tal, tem se testado diversas tintas com elevada condutividade, como depósito do filme condutor, que são disponíveis comercialmente, como, por exemplo, tintas a base de carbono sem e com alguns metais (Au, Pt, Ag e Pd e etc.). Após impressão da tinta em suportes inertes (PVC, materiais cerâmicos e outros), o filme é seco a altas temperaturas e recoberto segundo projetos específicos com tinta isolante. No entanto, a maioria dos modelos de eletrodos com tintas condutoras e isolantes comerciais são de custo relativamente baixo e quase sempre patenteadas, cuja fabricação não é revelada apropriadamente.

Os eletrodos impressos descartáveis têm sido amplamente empregados como uma alternativa de sucesso ao uso de eletrodos convencionais, como, por exemplo, eletrodos de mercúrio, carbono vítreo, pasta de carbono, ouro, platina, prata e outros em eletroanálise, cuja substituição apresenta a vantagem de oferecer sistemas mais simples, menores, mais compactos e descartáveis, o que diminui as etapas de limpeza entre as análises, envenenamento da superfície e oferecem simplicidade no desenvolvimento de sensores portáteis. No entanto, é o acoplamento entre a versatilidade dos eletrodos impressos (EI) e a possibilidade de modificação de sua superfície com reagentes específicos (EQM) que tem melhorado sua sensibilidade e seletividade. O desempenho dos eletrodos impressos quimicamente modificados tem sido avaliado na determinação de espécies em vários setores importantes, tais como, monitoramento ambiental, industrial, biomédico, higiene ocupacional e etc. [11, 13]. Em resumo, o uso de eletrodos

impressos modificados ou até mesmo não modificados tem apresentado diversas vantagens requeridas para acompanhar o desenvolvimento tecnológico atual, como é o caso da procura por instrumentos eletroanalíticos portáteis, robustos, que ofereçam alta sensibilidade e seletividade, redução de contaminação e interferências, baixo peso e pequeno tamanho e longo tempo de vida. Deste modo, com o objetivo de atender a demanda de testes analíticos cada vez mais sensíveis, rápidos, simples e econômicos para determinação de compostos biologicamente e clinicamente importantes e monitoramento de compostos importantes em matrizes ambientais é de nosso interesse investigar a possibilidade de desenvolver sensores eletroquímicos que atendam a essas exigências. Para tal, pretende-se acoplar a versatilidade dos sistemas de eletrodos impressos não modificados ou modificados por filmes poliméricos de poliaminoácidos, capazes de permitir a rápida pré-concentração e simultânea detecção voltamétrica/amperométrica do analito.

I.3- ELETRODOS MODIFICADOS COM POLIAMINOÁCIDOS

A importância da construção e aplicação de eletrodos modificados na área de desenvolvimento de sensores eletroquímicos pode ser avaliada em inúmeros trabalhos reportados na literatura [6, 7]. Vários métodos para modificação de eletrodos têm sido destacados, tais como: polímeros condutores, filmes de sol-gel, membranas, eletrólitos poliméricos, monocamadas auto arranjadas (self-assembled), materiais cerâmicos, enzimas e etc. Dentre os diversos tipos de modificadores [6,7], polieletrólitos sintéticos têm recebido particular atenção, devido à sua importância como modelos simplificados de polieletrólitos naturais, tais como, proteínas e ácidos nucléicos. O uso destes polieletrólitos sintéticos como reagentes ancorados na superfície eletródica tem permitido além do estudo de interações mais complexas, aumentar a seletividade e sensibilidade analítica dos métodos de detecção, através de etapa de pré-concentração, ocorrida por meio de interações específicas de grupos de polieletrólito e a espécie eletroativa. Dentro deste contexto, polímeros derivados de alguns poliaminoácidos também têm sido usados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, destinados a análise de metais e compostos de interesse biológico e farmacêutico, através de métodos simples e rápidos de preparação e obtenção de eletrodos modificados.

Os poliaminoácidos são polieletrólitos sintéticos que possuem cadeias de tamanho controlável e portadoras de grupos funcionais específicos e sítios carregados, capazes de agirem como nucleófilos ou centros reativos com compostos orgânicos e inorgânicos. Os principais exemplos de aplicação de poliaminoácidos para construção de sensores eletroquímicos descritos na literatura são resumidos a seguir.

A obtenção de filmes de poli-L-lisina (PLL) sobre eletrodo de carbono pirolítico, descrita há bastante tempo, é efetuada através do uso de gotejamento de uma alíquota de solução, seguida da evaporação a 80°C por 30 segundos [24, 25]. Sua adsorção sobre eletrodos de gota pendente de mercúrio também tem sido utilizada para pré-concentração de alguns fármacos, tais como, nitroprussiato de sódio [26], nedocromil de sódio [27] e cefalosporinas [28], utilizando a técnica voltamétrica de redissolução catódica. Sua aplicação em eletrodos de grafite pirolítico e carbono impresso, modificados por filmes de poli-L-lisina, tem se mostrado adequada para imobilização de ferrocianeto e da enzima hidrogenase [29,30].

Estudos de imobilização de poli-L-lisina sobre superfícies eletródicas de ouro foram também investigados, com o intuito de monitorar sistemas enzimáticos [30,31]. A superfície é modificada pelo depósito de ácido 3-mercaptopropiônico/poli-L-lisina e membranas de poliestirenosulfonato/poli-L-lisina. Os resultados mostraram que a PLL melhora sensivelmente o sinal eletroquímico utilizado para determinação da glicose e o procedimento permite o monitoramento do ácido láctico, colina e glicose em baixos níveis de concentração.

Eletrodos modificados por filmes de poli-L-lisina e glutaraldeído [32, 33] melhoram a aderência do poliaminoácido sobre eletrodo de carbono vítreo e podem ser aplicados na determinação de idoxuridina e do ânion cromoglicato. Além disso, é possível observar que a modificação de eletrodos com poliaminoácidos tem sido utilizada na imobilização de enzimas, na determinação de proteínas carregadas negativamente e na pré-concentração de alguns fármacos.

Viana et al. [34] relataram a utilização de um eletrodo de carbono vítreo modificado por PLL e glutaraldeído (97,5% 2,5 % (m/v)), para a determinação do corante têxtil Cibacron Blue (CB). Foi observado um aumento no sinal do analito em comparação ao eletrodo não modificado, atribuído a uma possível interação entre o

grupamento amínico presente na PLL e o grupo antraquinona do corante. Monitorando um pico de oxidação em +0,75 V (vs. Ag/AgCl), foi observada uma resposta linear entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sob 10 minutos de pré-concentração.

Explorando a versatilidade da poli-lisina, para a incorporação de espécies carregadas negativamente, *Luz et al* [35] demonstraram a potencialidade analítica de um eletrodo de carbono vítreo recoberto por poli-L-lisina (PLL) e tetracianoetilenida de lítio (LiTCNE), para a determinação de 4-nitrofenol. Esta modificação baseia-se no fato da PLL possuir grupamentos amínicos protonáveis em uma ampla faixa de pH, o que por sua vez confere um excesso de carga positiva a superfície eletródica, fazendo com que os ânions TCNE⁻ possam ser incorporados ao filme. O eletrodo desenvolvido apresentou um aumento na corrente de pico de redução para o 4-nitrofenol, que foi explicado pela interação entre o produto da redução do grupo nitro, uma hidroxilamina, com o filme. Após otimização dos parâmetros, foi obtida uma resposta linear entre a corrente de pico e a concentração, entre 27 e 23200 nmol L⁻¹. O procedimento proposto foi aplicado na determinação do 4-nitrofenol em amostras de água.

Luz et al. [36] investigaram a utilização de poli-L-lisina (PLL) para modificar um eletrodo de carbono vítreo com tetracianoetilenida de lítio (LiTCNE), sendo o mecanismo de modificação idêntico ao trabalho anterior, ou seja, baseado em uma interação eletrostática entre o modificador TCNE⁻ e os grupos -NH₃⁺ presentes na PLL. O eletrodo modificado apresentou um efeito eletrocatalítico sobre a oxidação de dopamina e depois de otimizadas as condições experimentais, foi observada uma linearidade na resposta voltamétrica entre 0,01 μmol L⁻¹ e 10 μmol L⁻¹. O método proposto foi aplicado na determinação de dopamina em formulações farmacêuticas.

Luz et al [37] estudaram um eletrodo de carbono vítreo modificado pela adição direta de uma alíquota de solução (1:1 v/v) de PLL e ftalocianina tetrassulfonada de cobalto (CoTSPc). A utilização da PLL forneceu uma melhor fixação do CoTSPc, atribuída a uma interação eletrostática entre os grupos -NH₃⁺ da PLL e os grupos -SO₃⁻ do CoTSPc. O eletrodo construído apresentou um efeito eletrocatalítico para a redução de oxigênio, marcado por um descolamento de potencial de cerca de 200 mV, para valores menos negativos, em relação ao eletrodo não modificado. O eletrodo foi avaliado por cronoamperometria e por voltametria de pulso diferencial (DPV), sendo em ambas as técnicas obtidas faixa de

reposta linear de 0,2 a 8,0 mg L⁻¹, embora a DPV tenha apresentado os melhores valores de limite de detecção e sensibilidade.

Costa et al [38] desenvolveram um método para a determinação voltamétrica de diospirina, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado por PLL e CoTSPc. O eletrodo foi construído pelo procedimento supracitado e apresentou uma atividade catalítica para a redução da diospirina. Neste trabalho, tanto o eletrodo modificado quanto o analito apresentaram um pico de redução no mesmo potencial -0,16 V, sendo observado um aumento de 60 % na corrente de pico, comparando apenas com o eletrodo não modificado. Esse efeito foi atribuído à baixa resistência à transferência de carga devido à presença do CoTSPc. O eletrodo construído apresentou uma relação linear entre o sinal voltamétrico e a concentração do analito entre 1 e 120 nmol L⁻¹, sendo posteriormente aplicado na determinação de diospirina em extrato bruto de plantas.

Monterroso et al [39] estudaram o desempenho do recobrimento de um eletrodo de carbono vítreo por filmes mistos de poli-L-lisina e poli (4-estireno sulfonato de sódio) na resposta voltamétrica de um filme de mercúrio crescido sobre a superfície modificada. Os autores verificaram que a presença dos polímeros na superfície eletródica promovem uma diminuição do envenenamento no filme por espécies tensoativas, tais como o Triton X-100 e o SDS. O filme de mercúrio construído sobre o eletrodo modificado foi aplicado na determinação de chumbo, cobre e cádmio em água de estuário, empregando um procedimento de redissolução anódica por voltametria de onda quadrada.

I.4 POLI-HISTIDINA

Os estudos prévios envolvendo a imobilização de poliaminoácidos sobre superfícies eletródicas têm se mostrado extremamente vantajosos na construção de sensores eletroquímicos, podendo fornecer evidências de interação do agente modificador com uma dada classe de compostos de interesse e mimetizar reações metabólicas importantes. Dentro deste contexto, é nosso objetivo investigar a construção e aplicação de novos sensores eletroquímicos, baseados em eletrodos modificados por poliaminoácido sintético, estudando a possibilidade de imobilizar e caracterizar eletrodos modificados por filmes do poliaminoácido poli-histidina.

A Figura 1 apresenta as formas monomérica e polimerizada da histidina. É possível verificar a existência de três grupos na molécula do monômero, que podem apresentar equilíbrios do tipo ácido-base, sendo os valores de pKa descritos na literatura para os três sítios do monômero de 1,8, para o grupo α -COOH (pK_{a1}); 6,0, para o grupo imidazol (pK_{a2}); e 9,2, para o grupo NH_2 (pK_{a3}) [40]. Em sua forma polimerizada, o grupo imidazol encontra-se pendente na cadeia polimérica. Isto indica que os grupamentos imidazóis no poliaminoácido permanecem protonados até um meio levemente ácido, conferindo ao filme um excesso de carga positiva, que pode interagir com espécies carregadas negativamente.

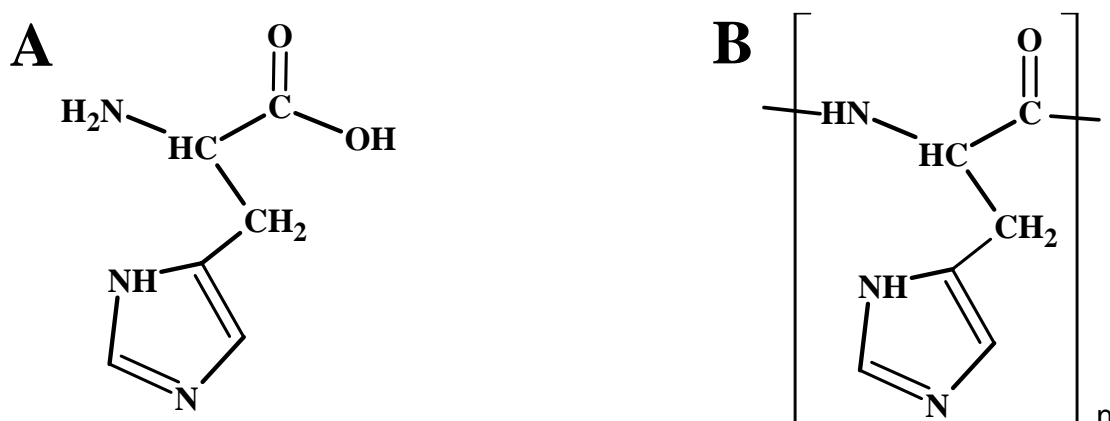


Figura 1: Estrutura molecular da histidina na forma monomérica (A) e polimerizada (B).

Embora a poli-histidina seja um poliaminoácido importante para o corpo humano, ela tem sido pouco explorada como agente modificador de superfícies eletródicas, visando o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Li et al.[41] estudaram o efeito eletrocatalítico observado para os processos redox de um eletrodo de prata modificado por histidina, na presença de mioglobina e citocromo C. A modificação da superfície eletródica é baseada na ligação covalente entre o grupo imidazol presente na histidina e o eletrodo de prata. Yu et al. [42] desenvolveram um método para a determinação de ácido ascórbico, utilizando eletrodo de carbono vítreo, modificado por poli-histidina. A modificação foi realizada por polimerização eletroquímica e o eletrodo apresentou um efeito eletrocatalítico sobre a oxidação do analito, marcado por uma diminuição de 400 mV no sobrepotencial de oxidação do ácido ascórbico.

I.5- ANALITOS AVALIADOS

Observando os trabalhos existentes na literatura, pode-se constatar que os eletrodos modificados por filmes de poliaminoácidos apresentam grande potencialidade analítica para a determinação de diferentes espécies, orgânicas e inorgânicas. Esses eletrodos podem atuar de duas formas principais: pré-concentrando o analito, o que melhora a resposta obtida, principalmente para baixas concentrações, ou atuando com um efeito eletrocatalítico, diminuindo o sobrepotencial necessário para promover a redução ou oxidação de espécies de interesse. Dentro deste contexto, diferentes analitos foram escolhidos para serem avaliados, sendo descritos a seguir os principais relatos envolvendo a determinação dessas espécies.

I. 5.1- DETERMINAÇÃO DE AUROTIOMALATO (AuTM)

O aurotiomalato (AuTM), composto empregado como agente anti-reumático em formulações farmacêuticas, contém um átomo de ouro ligado ao enxofre em sua estrutura base (ácido tiomálico), como mostrado na Figura 2 [43].

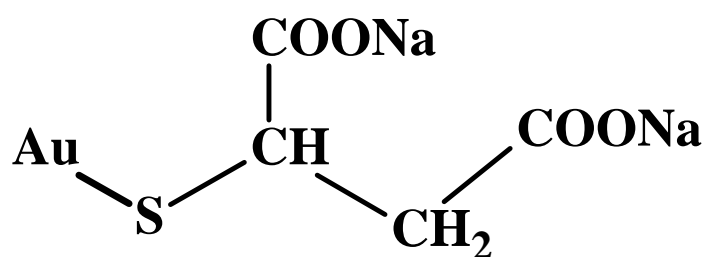


Figura 2: Estrutura molecular do aurotiomalato (AuTM) de sódio.

A utilização de compostos a base de ouro, no tratamento de artrite reumática, apresenta limitações, como, por exemplo, resposta variável entre os pacientes e efeitos tóxicos [44, 45], pois o ouro é um elemento não essencial ao ser humano e apresenta mecanismos de transporte, excreção e estocagem pouco conhecidos. No sentido de investigar as interações entre os compostos de ouro e moléculas do corpo humano, existem trabalhos relatados na literatura envolvendo técnicas de separação aplicadas em amostras diversas, como sangue e urina.

Smith et al. [46] relataram um estudo realizado para investigar as interações entre a albumina e o AuTM. Neste trabalho, alíquotas de plasma sanguíneo de pacientes tratados com AuTM foram submetidas a um processo de separação por eletroforese e posterior quantificação por espectroscopia de absorção atômica, sendo avaliada a razão entre o ouro ligado a albumina e a albumina total. Os resultados mostraram uma grande variação entre os valores encontrados para diferentes pacientes, porém, em todos os casos, foi constatada a interação entre o ouro e a albumina, com valores variando de 1 a 20 átomos de ouro, por molécula de albumina. Essas interações foram atribuídas ao fato da albumina apresentar grupos contendo átomos de enxofre, que podem complexar com o ouro.

A interação entre o AuTM e outros agentes quelantes, tais como a D-pelicilanina, ácido 2,3-dimercaptopropiônico, 2,3-dimercaptopropano sulfonato e bucillamina, foi estudada e relatada por Kojima et al.[47]. As substâncias supracitadas foram administradas a ratos logo após a injeção de AuTM e as amostras foram submetidas à separação por eletroforese ou cromatografia gel, onde a detecção foi realizada por espectroscopia de absorção atômica em ambas as técnicas. Em todos os casos avaliados, foi verificada uma interação com as substâncias estudadas nas amostras de bile e urina.

Os trabalhos existentes na literatura para a determinação do AuTM e/ou seus metabólicos envolvem a aplicação de procedimentos que empregam técnicas de absorção atômica, tais como, AAS, FAAS e ICP-AAS, geralmente em conjunto com técnicas de separação, como eletroforese e cromatografia. Uma revisão da literatura, escrita por Barefoot e Loon [48], apresenta diversos trabalhos realizados para a determinação de compostos de ouro e platina, muito usados como agentes anti-reumáticos e anti-cancerígenos, respectivamente. A maior parte das referências utiliza técnicas de absorção atômica na detecção. Porém, é importante ressaltar que além da absorção atômica, existem outras técnicas que visam verificar a interação desse fármaco com outras moléculas, mas não sua quantificação, como a metodologia proposta por Isab [49], que utilizando a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C constatou a formação de um complexo 1:1 em solução entre o AuTM e o 2-tiouracil sem a liberação do ligante tiomalato. A utilização de íons CN^- demonstrou a formação de um complexo de $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ e resultou na liberação do tiomalato e do 2-tiouracil como ligantes livres [50].

Um procedimento descrito para a determinação de proteína utilizando o AuTM foi desenvolvido [51]. Este trabalho foi baseado no efeito catalítico do ouro, eletrodepositado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo, sobre a redução de íons prata. Primeiramente, uma solução contendo as proteínas estudadas e o AuTM ficaram em contato por 24 horas, para promover a ligação entre o ouro e a proteína. Em seguida, o ouro livre foi separado por um processo de diálise e a fração de ouro ligada à proteína foi adsorvida na superfície do eletrodo, o qual foi submetido à redução sob aplicação de -1,0 V (vs. Ag/AgCl) e depois oxidado a um potencial fixo por 1 minuto. Posteriormente, íons prata foram reduzidos sobre a superfície eletródica e na varredura de oxidação foi registrado o sinal referente à oxidação da prata, o que possibilitou a determinação da proteína.

Na literatura existem poucos trabalhos relatando o emprego de técnicas eletroanalíticas para avaliar as interações específicas do AuTM, assim como a sua determinação ou a caracterização de seu comportamento eletroquímico. Entretanto, quando o analito é o ouro, há diversos trabalhos. Neste sentido, diversas propostas foram publicadas empregando procedimentos de redissolução adsortiva, anódica e catódica.

Assim como na determinação de outros cátions metálicos, a técnica de voltametria de redissolução anódica pode ser empregada para a determinação de ouro. Porém, um problema freqüentemente encontrado é o fato do ouro exibir um lento processo de nucleação sobre eletrodos de carbono e platina [52, 53], indicando uma dependência do eletrodo base e dificultando a sua determinação em baixas concentrações. Essas observações concordam com outras existentes na literatura [54], que descrevem o comportamento voltamétrico do ouro sobre macro e micro disco eletrodos de diferentes materiais, tais como, ouro, platina, irídio, ródio e carbono vítreo, em meio de água-régia. Os melhores resultados foram obtidos com eletrodo de platina e após a otimização do procedimento, limites de detecção de $4,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram alcançados.

Ye et al. [55] propuseram a utilização de um eletrodo de pasta de carbono, modificado com quitosana, para a determinação de alguns metais preciosos, tais como, ouro, prata e platina. A determinação do ouro foi baseada no incremento da corrente de pico de oxidação, verificado em 1,0 V (vs. Ag/AgCl), em solução de HCl pH 1-2, após a pré-concentração por 5 minutos. Esse efeito foi atribuído ao fato de nessa condição de pH os grupos NH_2 da quitosana encontrarem-se protonados e a

formação do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$ promove a interação eletrostática e proporciona a pré-concentração da espécie.

A utilização de etilenodiamina, fixada sobre ácido húmico como agente modificador na preparação de eletrodos de pasta de carbono, foi descrita por Wang et al. [56]. O procedimento é baseado na pré-concentração dos íons metálicos na superfície do eletrodo modificado. Na etapa de redução em $-0,3 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), em meio de HCl , ocorreu a redução do $\text{Au(III)}/\text{Au(0)}$ e na etapa de oxidação foi registrado um pico de oxidação em $1,1 \text{ V}$. O procedimento proposto apresentou um limite de detecção de $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o ouro.

Ye e Khoo [57] relataram o uso de um eletrodo tubular, modificado com benzotiazol, para a determinação de Au(III) em um sistema em fluxo utilizando um procedimento de redissolução catódica. Os íons ouro foram pré-concentrados por 10 minutos em condições de circuito aberto sobre uma vazão constante de solução. Posteriormente, foi realizada a varredura catódica e um pico de redução verificado em $+0,55 \text{ V}$ possibilitou o monitoramento do ouro. O procedimento proposto demonstrou um limite de detecção da ordem de $3,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

A determinação de Au(III) , empregando agentes complexantes em solução, foi proposta por Lack et al. [58], utilizando voltametria de varredura linear, em um procedimento de redissolução catódica. Este trabalho foi baseado na redução do complexo formado entre o ouro e o agente complexante, um polissacarídeo contendo diversos grupos OH responsáveis pela pré-concentração. Foram obtidos intervalos de linearidade entre a resposta voltamétrica do eletrodo e a concentração de Au(III) em um intervalo entre $5,0 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Korolczuk [59] propõe um método para determinação de ouro por um procedimento de redissolução anódica, utilizando um eletrodo de carbono vítreo ativado. A ativação foi realizada pela deposição de uma camada de ouro na superfície eletródica, o que facilita a pré-concentração de íons ouro (III). Realizando a etapa de acúmulo em $+0,36 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) por 10 minutos, na varredura anódica foi observado um pico de oxidação em $+0,72 \text{ V}$, o qual foi adotado para determinar a concentração de ouro. Uma resposta voltamétrica linear entre $5,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi observada e o método proposto aplicado na determinação de ouro em amostras certificadas.

Turyan e Mandler relataram dois trabalhos [60, 61] envolvendo a determinação de ouro III empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado por

azo éter de coroa, o 8,9,17,18-dibenzo-1,7,-dioxo-10,13,16-triazociclooctadecano (DDTC). O eletrodo foi modificado após um pré-tratamento anódico-catódico (+1,75 V/-1,55 V (vs. Ag/AgCl)), sendo a modificação realizada pela imersão do eletrodo em solução contendo DDTC. Na etapa de redissolução foram empregadas a voltametria de varredura linear e a voltametria de onda quadrada, sendo verificados intervalos lineares entre $8,71 \times 10^{-8}$ e $1,82 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,62 \times 10^{-9}$ e $1,59 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. Em ambos os trabalhos, a determinação foi realizada em amostras geológicas.

Kula e Navratilova [62] investigaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com um trocador aniônico, para a determinação de ouro em compostos farmacêuticos. O funcionamento é baseado na formação de espécies complexas entre os íons ouro (III) e cloreto, como por exemplo, o $[\text{AuCl}_4]^-$, que possui carga negativa, possibilitando sua pré-concentração na superfície do eletrodo modificado. Depois de estudadas as melhores condições experimentais, foram observados intervalos de linearidade entre $4,06 \times 10^{-6}$ e $1,22 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $8,12 \times 10^{-7}$ e $6,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, utilizando tempo de pré-concentração de 5 e 10 minutos, respectivamente.

Geralmente os estudos realizados para a determinação de ouro (III), envolvendo métodos eletroanalíticos, são desenvolvidos em meio ácido e os processos eletródicos são afetados por diversos fatores, tais como, pH, agentes complexantes e outros metais, como cobre e prata [58, 60, 61]. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos para determinação de compostos de ouro e ouro livre, usando técnicas eletroanalíticas que muitas vezes apresentam vantagens sobre outras técnicas em termos de seletividade, sensibilidade e custo, ainda é de grande importância.

I.5.2. DETERMINAÇÃO DE L-DOPA

O mal de Parkinson é uma desordem neurológica progressiva causada pela incapacidade patológica do organismo humano de produzir um importante neurotransmissor, a dopamina. Um dos tratamentos empregado para alívio dos sintomas baseia-se no uso de L-dopa (3,4-di-hidroxifenilalanina), que é um precursor da dopamina. A Figura 3 apresenta a estrutura molecular da L-dopa.

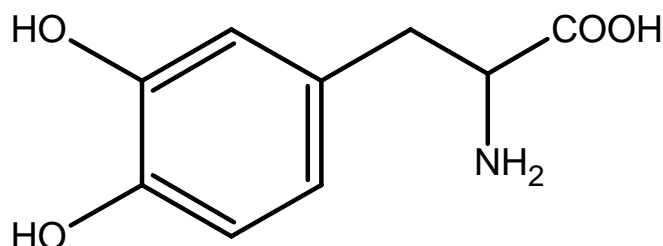


Figura 3: Estrutura molecular da L-dopa.

A quantificação de L-dopa tem sido importante para a avaliação do mecanismo de ação, biodisponibilidade, propriedades biofarmacêuticas e controle das diferentes formulações farmacêuticas disponibilizadas comercialmente. Os métodos de análise usualmente reportados para a determinação de L-dopa têm sido aqueles envolvendo técnicas espectrofotométricas [63], cromatográficas [64], eletroanalíticas [65-70] entre outros. A eletroatividade da L-dopa já foi bem estudada e está relacionada a presença dos dois grupos hidroxilas presentes na molécula, e seu comportamento voltamétrico semelhante a outras catecolaminas. A seguir, serão brevemente descritos alguns trabalhos relatando a determinação de L-dopa envolvendo técnicas eletroanalíticas.

Teixeira et al. [65] relataram a aplicação de um eletrodo de pasta de carbono modificado por um complexo de rutênio, conhecido como rutênio vermelho, incorporado em uma zeólita. O método é baseado na oxidação química da L-dopa pelo complexo de rutênio, essa reação gera uma corrente catalítica na oxidação do complexo metálico. Diversos parâmetros foram estudados e otimizados e utilizando as melhores condições experimentais, o eletrodo desenvolvido apresentou uma faixa de linearidade de $1,2 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $8,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de L-dopa em

formulações farmacêuticas e os valores obtidos apresentaram boa concordância com aqueles obtidos por um método oficial.

Lopes et al. [66] estudaram o comportamento eletroquímico de algumas catecolaminas sobre um eletrodo de pasta de carbono modificado *in situ* por agentes surfactantes. A utilização de agentes surfactantes em concentrações sub-micelar levou a um aumento na corrente e melhora na reversibilidade dos processos redox observados. Os efeitos observados foram discutidos em termos de interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

Xiang et al. [67] demonstraram a potencialidade analítica de um eletrodo de carbono vítreo modificado por uma camada de nanotubos de carbono e Nafion na determinação voltamétrica de L-dopa. A proposta de funcionamento é baseada na pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo modificado. Empregando as condições otimizadas, os autores relataram uma resposta linear entre $3,5 \times 10^{-7}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Yan et al. [68] avaliaram o comportamento eletroquímico da L-dopa sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado por um filme de nanotubos de carbono. O eletrodo modificado apresentou uma melhora significativa para a oxidação do analito quando comparado ao eletrodo não modificado. Empregando a voltametria de pulso diferencial foi possível construir uma curva analítica com uma linearidade de reposta entre $5,0 \times 10^{-7}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa e um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do analito.

Quintino et al. [69] estudaram o comportamento da L-dopa e carbidopa sobre um eletrodo de carbono vítreo utilizando como técnica a voltametria de pulso diferencial (DPV). Foram verificados processos em potenciais de 0,58 V e 0,52 V referentes à oxidação e redução da L-dopa, respectivamente. Depois de otimizadas as condições experimentais, o método foi aplicado na determinação de L-dopa em amostras comerciais. Os valores determinados foram comparados aos resultados obtidos por cromatografia e apresentaram boa concordância.

Teixeira et al. [70] propuseram um eletrodo de poliuretano modificado por um filme fino contendo um complexo de oxovanádio como um detector amperométrico para L-dopa em um sistema de análise por injeção em fluxo. O eletrodo foi modificado por adições de alíquotas de uma solução de acetonitrila contendo 10 mmol L^{-1} do complexo sobre a superfície eletródica. A resposta voltamétrica é controlada por um mecanismo eletrocatalítico, onde a L-dopa é

quimicamente oxidada pelo complexo de vanádio (V), levando à regeneração de vanádio (IV) na superfície do eletrodo. Após otimização do método, os autores relataram uma região de linearidade entre a resposta amperométrica do eletrodo e a concentração de L-dopa no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ apresentando um limite de detecção de $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de L-dopa.

Os trabalhos relatados na literatura sobre os métodos eletroanalíticos de L-dopa apresentam dois enfoques principais, aqueles destinados à caracterização do processo redox em diferentes eletrodos e aplicação de eletrodos modificados no desenvolvimento de métodos para sua determinação. Com relação a eletrodos impressos, não são encontrados relatos sobre sua utilização na determinação de L-dopa.

I.5.3. DETERMINAÇÃO DE PROCAÍNA

A procaína (2-dietilaminoetil p-aminobenzoato) é um dos mais antigos anestésicos locais empregados na medicina. Este fármaco foi sintetizado em 1905 e foi o primeiro anestésico local injetável produzido pelo homem. A procaína tem seus efeitos reduzidos quando aplicada diretamente sobre a pele ou membranas de mucosas, devido à baixa absorção do fármaco pela pele. No entanto, a procaína age prontamente quando injetada intramuscularmente. A Figura 4 apresenta a estrutura molecular da procaína

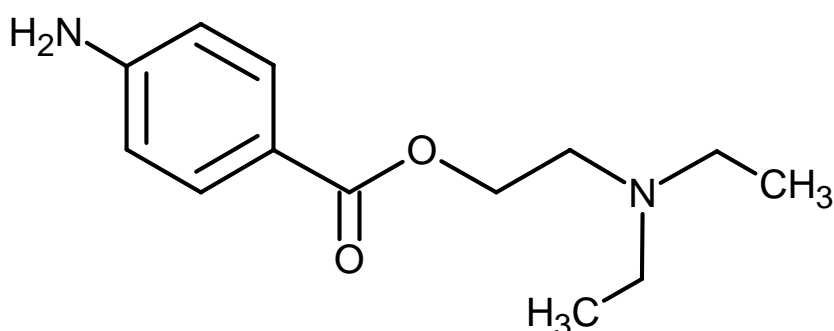


Figura 4: Estrutura molecular da procaína.

Vários métodos analíticos para a quantificação de procaína em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos têm sido reportados na literatura. Dentre

esses, a detecção espectrofotométrica da procaína em 280 nm é o método preconizado pela farmacopéia norte-americana. Métodos alternativos de análise também são propostos, incluindo métodos espectrofotométricos [71], cromatográficos [72], fluorimétricos [73], e eletroanalíticos [74-76].

Dentre os métodos eletroanalíticos, destacamos os métodos voltamétricos para a determinação de procaína em formulações farmacêuticas cuja quantificação tem sido obtida pelo monitoramento do pico anódico relativo a oxidação do grupo amino presente na procaína para a hidroxilamina correspondente. A seguir, serão relatados os trabalhos mais relevantes envolvendo a determinação de procaína utilizando técnicas eletroanalíticas.

Zhou et al. [74] descreveram a utilização de um eletrodo de carbono vítreo recoberto por óxidos metálicos dispersos usado como detector amperométrico de procaína acoplado a um sistema de cromatografia líquida. O eletrodo apresentou uma faixa de resposta linear entre 2 a 220 ng mL⁻¹ e ofereceu um limite de detecção de 1,5 ng mL⁻¹.

Wang et al. [75] empregaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com pedra-pome na determinação de procaína. O método é baseado na oxidação do analito em +0,98 V após pré-concentração por 30 s sobre a superfície do eletrodo. Empregando a voltametria de pulso diferencial, os autores encontraram uma resposta linear para concentrações de procaína entre $9,0 \times 10^{-7}$ a $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ foi também relatado. O método foi aplicado na determinação de procaína em amostras farmacêuticas comerciais e também em amostras de urina.

Wu et al. [76] estudaram o comportamento voltamétrico da procaína sobre um eletrodo de carbono vítreo recoberto por um filme de nanotubos de carbono. O eletrodo foi construído pela adição de suspensão de nanotubos de carbono e dihexadecil-hidrogenofosfato. Monitorando um sinal de oxidação em potencial de 0,7 V (vs. ECS), os autores desenvolveram um método capaz de determinar procaína em uma faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção é de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ usando tempo de pré-concentração de 4 min. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de procaína em amostras injetáveis desse anestésico.

Pode ser verificado pelos trabalhos relatados na literatura que a maior parte dos métodos eletroanalíticos apresentados são baseados principalmente na

utilização de eletrodos de carbono vítreo modificados e freqüentemente baseados em procedimentos envolvendo uma etapa de pré-concentração. Não existem trabalhos relatados envolvendo a utilização de eletrodos impressos na determinação de procaína.

I.5.4- DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA

A isoniazida (Figura 5) é uma substância empregada como agente antituberculoso, cuja função é prevenir o desenvolvimento do quadro clínico da tuberculose. Geralmente é administrada sozinha ou em conjunto com outras substâncias, tais como antibióticos. A determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas ou fluidos biológicos tem sido amplamente estudada e realizada por diversas técnicas analíticas, como eletroforese capilar [77, 78], espectrofotometria [79], quimiluminescência acoplada a sistemas de análise por injeção em fluxo [80, 81], cromatografia [82, 83] e outras [84-86]. No caso das técnicas eletroanalíticas [87-97], vários estudos são relatados na literatura, tanto para a determinação da isoniazida, quanto para a caracterização de seu comportamento eletroquímico.

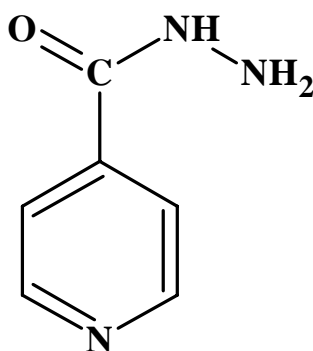


Figura 5: Estrutura molecular da isoniazida.

Estudos realizados por *Lund* [87] empregando a técnica polarográfica evidenciaram que a isoniazida apresenta em meio ácido duas ondas de redução. A primeira é atribuída à redução do grupo hidrazina levando a formação de uma amida, após transferência de 2 elétrons e a segunda corresponde à redução da amida gerada envolvendo o mesmo número de elétrons. Para valores de pH acima

de 9,0, existe uma sobreposição das duas ondas de redução, culminando em uma única onda, referente a uma transferência de quatro elétrons.

Sulaiman e Hameed [88] relataram a determinação de isoniazida e outras hidrazidas usando a polarografia de pulso diferencial. Utilizando um sinal de redução em pH 9, os autores apresentaram um método com um intervalo de linearidade entre 1×10^{-6} e 5×10^{-4} mol L⁻¹ de isoniazida, o qual foi aplicado na sua determinação em uma mistura ternária com outras hidrazidas.

Rodrigues-Mellado e colaboradores [89] estudaram a oxidação da isoniazida sobre eletrodo de mercúrio, em um intervalo de pH entre 6 e 13. Os autores reportaram que em valores de pH > 8,5 o fármaco é oxidado em duas ondas, onde a primeira é atribuída a forte adsorção do produto e a segunda é referente à oxidação da hidrazida não adsorvida.

Angulo et al. [90] relataram que a redução polarográfica da isoniazida caracteriza-se por duas ondas em pH < 9,5. A primeira refere-se à redução da ligação C=N presente no anel piridínico da molécula e a segunda resulta da redução do grupo hidrazida, o que leva a formação de amônia, segundo um mecanismo ECE.

Tong et al. [91] descreveram a determinação voltamétrica da isoniazida em pH 8 sobre eletrodo de carbono vítreo. O método é baseado na oxidação eletrocatalítica da isoniazida pelo radical 2,2,6,6-tetrametil-4-acetilpiperidina-1-oxi (TMAPO) em solução. Depois de otimizadas as condições experimentais, foi observada uma resposta linear entre a corrente de pico anódica e a concentração de isoniazida entre 4×10^{-5} e 2×10^{-3} mol L⁻¹. O método proposto foi aplicado na determinação do analito em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos apresentaram boa concordância, quando comparados aos valores determinados por método espectrofotométrico.

You et al. [92] descreveram o desenvolvimento de um eletrodo de microdisco de platina modificado com uma monocamada de 4-piridil-hidroquinona, o qual foi utilizado como detector amperométrico de isoniazida, em um sistema de eletroforese capilar. O eletrodo apresentou efeito eletrocatalítico sobre a oxidação de três compostos: hidrazina, metil-hidrazina e isoniazida. No caso da isoniazida, a estabilidade do eletrodo foi satisfatória durante quatro semanas, sendo possível a detecção do composto em um intervalo de concentração de 5×10^{-7} a 2×10^{-3} mol L⁻¹.

Ghoneim et al. [93] reportaram a utilização de um procedimento de voltametria de redissolução adsortiva, empregando um eletrodo de mercúrio, para a determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos. O método é baseado nos sinais de redução da isoniazida após uma etapa de pré-concentração, em condições de potencial controlado a $-0,9$ V (vs. ECS). Depois de otimizadas as condições experimentais, empregando a voltametria de onda quadrada os autores alcançaram limites de detecção e quantificação da ordem de $1,18 \times 10^{-10}$ e $3,93 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Hammam et al. [94] descreveram o comportamento voltamétrico de redissolução adsortiva para a determinação de isoniazida e rifampicina, em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos, empregando um eletrodo de pasta de carbono. O método é baseado na pré-concentração dos analitos, em condições de potencial controlado a $0,0$ V (vs. Ag/AgCl), sobre um eletrodo de pasta de carbono. Na etapa de redissolução, foram verificadas duas ondas de oxidação, em potenciais de $0,65$ V e $1,00$ V (vs. Ag/AgCl), atribuídas a rifampicina e a isoniazida, respectivamente. O método proposto apresentou um intervalo linear para concentrações de isoniazida entre 5×10^{-7} e 6×10^{-6} mol L⁻¹, após 180 s de acumulação.

Lomillo e colaboradores [95] relataram a utilização de um modelo matemático para obter uma resolução voltamétrica de misturas ternárias contendo rifampicina, isoniazida e pirazinamida, empregando polarografia de pulso diferencial. Foram observadas em solução tampão McIlvaine pH $7,0$ duas ondas de redução em potenciais de $-0,9$ V e $-1,19$ V (vs. Ag/AgCl), para a rifampicina; três ondas em $-0,98$ V, $-1,10$ V e $-1,25$ V (vs. Ag/AgCl), para a isoniazida; e duas outras em $-0,78$ V e $-1,25$ V (vs. Ag/AgCl), para a pirazinamida. Aplicando o método proposto, foi possível determinar essas substâncias em amostras de urina de pacientes em tratamento, em níveis de concentração de $0,250$, $0,039$ e $0,151$ g L⁻¹ para rifampicina, isoniazida e pirazinamida, respectivamente.

Majjidi e colaboradores [96] explorando o efeito eletrocatalítico de um eletrodo de carbono vítreo, modificado por um filme de poli pirrol, sobre a oxidação de isoniazida, apresentaram um método para sua determinação em formulações farmacêuticas. O eletrodo modificado exibiu uma diminuição de 200 mV no sobrepotencial de oxidação da isoniazida, em comparação ao eletrodo de carbono

vítreo convencional. O método atingiu limites de detecção e de quantificação respectivos de 3×10^{-6} e 5×10^{-6} mol L⁻¹, utilizando a amperometria.

Quintino e Agnes [97] empregaram um procedimento BIA-amperométrico ("Batch Injection Analysis") para determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas. O método é baseado na oxidação da isoniazida, em meio alcalino, sobre um eletrodo de carbono vítreo. Após sua otimização, foram verificados limites de detecção e quantificação de $4,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $1,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente.

De acordo com os trabalhos reportados na literatura, pode ser constatado que a isoniazida tem sido analisada sob dois aspectos principais: caracterização do seu comportamento eletroquímico e desenvolvimento de métodos para sua determinação. Nesses trabalhos, vários tipos de eletrodos (carbono vítreo, pasta de carbono, mercúrio, eletrodos quimicamente modificados) são empregados, sendo o mercúrio o mais utilizado. Em relação aos eletrodos impressos, com ou sem modificação, não existem relatos na literatura de sua aplicação na determinação de isoniazida, apesar de se tratarem de dispositivos que oferecem diversas vantagens, como simplicidade e baixo custo. Baseado nisso, propõe-se a determinação de isoniazida usando eletrodos de carbono impresso, modificados com filmes de polihistidina.

I.5.5- DETERMINAÇÃO DE PIRAZINAMIDA

A pirazinamida (Figura 6) é empregada como um agente antituberculástico, é empregada principalmente para diminuir o tempo de terapia. Embora a pirazinamida seja fortemente utilizada, a compreensão do seu mecanismo de ação ainda não é bem esclarecida, e variações significativas na atividade farmacológica têm sido reportada [98].

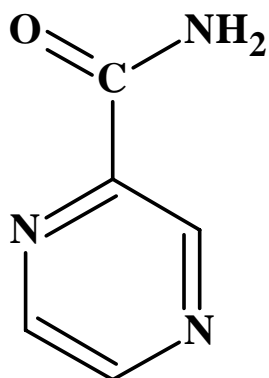


Figura 6: Estrutura molecular da pirazinamida.

Os métodos analíticos para sua determinação são escassos, sendo o desenvolvimento e aplicação de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas as mais exploradas. Em geral, esses trabalhos apresentam dois enfoques diferentes, entender o mecanismo de distribuição da pirazinamida no sangue e em tecido de animais [99, 100] e desenvolver métodos para sua determinação em formulações farmacêuticas [101, 102].

A utilização de métodos eletroanalíticos para sua avaliação redox ou determinação limita-se a poucos trabalhos. Um deles foi proposto por Lomillo et al. [95]. Os autores descrevem a determinação polarográfica da pirazinamida em uma mistura ternária contendo rifamicina, isoniazida e pirazinamida. Utilizando-se um modelo matemático, os autores conseguiram obter uma boa resolução para contornar a sobreposição dos sinais de redução dos analitos. O método proposto foi aplicado na determinação de uma mistura contendo os três fármacos.

Embora especificamente a pirazinamida não tenha sido explorada do ponto de vista eletroquímico, ela pertence ao grupo das pirazinas, uma classe de compostos heterocilcicos que contém dois átomos de nitrogênio (para). Diversos trabalhos são relatados envolvendo o comportamento eletroquímico de alguns compostos dessa classe.

Ni et al. [103, 104] relataram a determinação polarográfica de pirazina e de derivados metil substituídos. O método é baseado na redução das ligações N=C presentes no anel aromático. Individualmente, quando avaliados por polarografia de pulso diferencial os compostos exibiram picos de redução em -0,75, -0,77, -0,82 e -0,84 V (Ag/AgCl) para pirazina, 2-metilpirazina, 2,3-dimetilpirazina e 2,3,5-trimetilpirazina, respectivamente. Devido a sobreposição dos sinais de redução, a

determinação em mistura não é possível por procedimentos convencionais, sem uma etapa de separação prévia. Os autores utilizaram ferramentas de quimiometria para obter uma resolução dos sinais para cada analito em uma mistura. Esse tratamento apresentou valores de recuperação entre 96 e 108%, para concentração dos analitos de $2,0$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sendo considerado um valor aceitável.

Swartz e Anson [105] estudaram o comportamento eletroquímico de uma série de derivados substituídos da pirazina. Os autores encontraram que a redução do anel da pirazina pode ocorrer por dois mecanismos diferentes dependendo da estrutura da molécula. Um desses mecanismos de redução envolve 2 elétrons e 3 prótons, reduzindo assim as duas ligações N=C presentes na molécula. Outro mecanismo é atribuído a redução de apenas uma das ligações N=C após transferência de 1 elétron e 2 prótons. A estabilidade do produto gerado é grandemente influenciada pela posição e características do substituinte. Para moléculas com substituintes doadores de elétrons, observou-se que o sistema apresenta características reversíveis. Por outro lado, substituintes retiradores de elétrons levou a perda da reversibilidade do sistema uma vez que o produto da redução é instável quimicamente. Para todos os compostos monosubstituídos utilizados, foram observadas razoáveis correlações com a equação de Hammett.

De acordo com a literatura, pode ser verificado que a pirazinamida, do ponto de vista eletroanalítico, é um analito ainda pouco explorado, tornando-se assim importante que se investigue seu comportamento redox visando obter maiores informações sobre esse analito.

I.5.6- DETERMINAÇÃO DE CRÔMIO

O crômio é um elemento que existe no ambiente mais comumente em dois estados de oxidação, o Cr (III) e o Cr (VI). Entretanto, estes dois estados diferem significativamente com relação à toxicidade, sendo o Cr (VI), cerca de 100 a 1000 vezes mais tóxico que o Cr (III). A contaminação de crômio hexavalente pode ocorrer por diversas fontes antropogênicas, como indústrias de couro, papel e aço. Recomendações sobre a qualidade de água sugerem um limite tolerável de crômio (VI) de 50 ppb [106]. Técnicas de absorção atômica são freqüentemente empregadas para a determinação de crômio total, porém, como a concentração de

crômio geralmente é baixa e a especiação é muito importante, é comum trabalhos que relatem o uso da absorção atômica em conjunto com técnicas de separação. Sobre a utilização de técnicas eletroanalíticas, são encontrados diversos métodos propostos para a determinação de crômio, em geral baseados em procedimentos de redissolução. A seguir são relatados alguns dos trabalhos mais pertinentes encontrados na literatura.

Li e Xue [107] demonstraram a aplicabilidade de um eletrodo de gota de mercúrio na determinação de crômio (III) e (VI), baseados na formação de um complexo entre o ácido dietilenotriaminopentacético (H_2DTPA) e o crômio (III), por um procedimento de redissolução catódica catalisada pela presença de nitrato. Inicialmente, foi monitorado um pico de redução em $-1,23$ V (vs. Ag/AgCl), referente a redução do complexo Cr(III)- H_2DTPA a Cr(II)- H_2DTPA . O crômio (VI) é reduzido para crômio III em potenciais mais negativos que $-0,05$ V e rapidamente se complexa com o H_2DTPA , sendo que com o tempo, o complexo formado entre o Cr(III)- H_2DTPA se converte a uma forma não eletroativa, a Cr(III)-DTPA, e após 60 minutos é possível verificar apenas o sinal de redução referente ao complexo de Cr(III)- H_2DTPA formado pela redução do crômio VI na superfície eletródica. O método proposto foi aplicado na determinação de crômio em amostras de água natural.

Welch et al [108] realizaram um estudo sobre a redução do crômio hexavalente sobre eletrodos de carbono vítreo, de ouro e de diamante dopado com boro. A eletroatividade do crômio VI foi verificada em três diferentes valores de pH 1,0; 4,2 e 13, sendo verificado apenas um sinal voltamétrico de redução significativo em pH 1,0. O pico de corrente referente à redução do crômio VI apresentou grande dependência do material eletródico, sendo observado em $+0,27$ V para o eletrodo de ouro, $-0,02$ V para o carbono vítreo e em $-0,30$ V para o eletrodo de diamante. Os autores propõem que a redução de crômio (VI) para crômio (III) ocorre via uma reação eletródica envolvendo um elétron e um próton, seguida de duas reações de desproporcionamento. Aplicando o eletrodo de ouro sobre as condições otimizadas, foi possível obter um limite de detecção de $4,3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Svancara et al. [109] relataram a eficiência de um eletrodo de pasta de carbono modificado in situ por agentes surfactantes, tais como a Septonex[®], CTBA e o CPB, na pré-concentração de crômio (VI). O efeito da pré-concentração foi atribuído a uma interação eletrostática entre os grupos amônio quaternário

(R'R3'N⁺), presentes no surfactante, e as espécies de cromo carregadas negativamente como, por exemplo, Cr₂O₇²⁻ e HCrO₄⁻. O método apresentou uma resposta linear entre concentrações de 2,5 a 25 μmol L⁻¹ de cromo (VI) e foi aplicado na determinação de cromo em chá preto, sendo os valores comparados com os obtidos por um método de referência.

Khalil et al [110] propuseram um método para a determinação potenciométrica de cromo III, baseado na resposta de um par iônico formado entre [Cr(C₂O₄)₃]³⁻ e o Aliquat 336, imobilizado em uma matriz de PVC sobre um eletrodo de grafite epóxi. Depois de otimizadas as condições experimentais, foi verificada uma resposta linear entre 2,6 x 10⁻⁶ a 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹, sendo o eletrodo aplicado na determinação de cromo em amostras alimentícias.

Turyan e Mandler [111] apresentaram um método para determinar cromo VI por um procedimento de redissolução catódica, baseado na pré-concentração das espécies de cromo, carregadas negativamente (Cr₂O₇²⁻ e CrO₄²⁻), sobre a superfície de um eletrodo de ouro modificado por uma camada auto organizada (SAM) de 4(2-mercaptoetil)-piridínio. Este modificador foi protonado, tornando-se carregado positivamente, de modo que pudesse interagir eletrostaticamente com as espécies de cromo. Depois de otimizadas as condições, monitorando um pico de redução em +0,22 V (vs. Ag/AgCl), foi observado um intervalo de resposta linear do eletrodo entre 4,2 x 10⁻¹¹ e 5,4 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹.

Husakova et al [112] descreveram um trabalho comparando a determinação de cromo em urina humana, empregando como técnicas a absorção atômica e um procedimento de redissolução adsortiva, catalisada pela presença de nitrato. O procedimento eletroanalítico é baseado na redução do complexo formado entre o cromo (III) e o H₂DTPA, o qual foi adsorvido na superfície de um eletrodo de mercúrio. Um pico de redução foi observado em -1,25 V (vs. Ag/AgCl), sendo referente a redução de Cr(III) a Cr(II), o qual é reoxidado quimicamente pelo nitrato, regenerando a espécie Cr(III), que por sua vez pode ser reduzida novamente, gerando um incremento de corrente em um mecanismo de transferência de carga e reação química subsequente (EC'). Os autores concluíram que o procedimento de redissolução é mais eficiente que a técnica de absorção atômica, pois apresentou limites de detecção na faixa de concentrações de 0,007 μg L⁻¹, enquanto que a técnica de absorção atômica ofereceu um limite de 0,18 μg L⁻¹.

Locatelli e Torsi [113] realizaram a determinação de diversos metais, tais como, cromo, chumbo, titânio, antimônio, cobre e zinco, utilizando a voltamétrica de onda quadrada, em um procedimento de redissolução anódica. Os metais foram pré-concentrados sobre um eletrodo de gota de mercúrio em um potencial de -1,4 V (vs. Ag/AgCl), por 270 s. A varredura anódica apresentou uma resolução satisfatória para os sinais voltamétricos, tornando possível a determinação de todos os metais. O cromo apresentou um pico de oxidação -0,41 V, o qual foi utilizado para sua determinação, sendo obtidos valores de limite de detecção de 0,095 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Embora existam vários trabalhos para a determinação de cromo (VI) empregando técnicas eletroanalíticas com eletrodos modificados, não existem trabalhos relatando uma possível interação entre espécies de cromo e a polihistidina. Esse modificador poderia atuar no sentido de pré-concentrar o analito e melhorar assim os limites de detecção para esse analito.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar eletrodos impressos, de ouro e carbono, em sistemas convencionais, com fluxo de solução e como detector amperométrico em um sistema análise de injeção em fluxo visando desenvolver métodos de análise para compostos de interesse farmacêutico, tais como, L-dopa, aurotiomalato e procaína.

Construir e avaliar o comportamento eletroquímico de eletrodos de ouro impresso (SPGE) modificados por poli-histidina empregando dois procedimentos diferentes para a preparação dos eletrodos. Construir e caracterizar o comportamento eletroquímico de eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de poli-histidina utilizando três diferentes procedimentos para a preparação dos eletrodos.

Aplicar os eletrodos de carbono impresso modificados com filmes de PH na determinação de espécies de interesse farmacêutico e ambiental, tais como, a isoniazida, pirazinamida, aurotiomalato e íons crômio.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III. 1– EQUIPAMENTOS

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se Potenciostatos/Galvanostatos (μ AUTOLAB Type III e AUTOLAB PGSTAT 30, ambos produzidos pela Eco Chemie) acoplados a microcomputadores e gerenciados pelo programa GPES 4.9.

Medidas espectrofotométricas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico em um espectrofotômetro HP modelo Kayak XA.

As medidas de pH foram efetuadas usando um pHmetro MICRONAL modelo B222, com um eletrodo de pH/combinado da marca MICRONAL.

As transferências de volumes pequenos foram realizadas com o auxílio de micropipetas (Boeco) de volumes variáveis nos intervalos 0,1 μ L a 1000 μ L.

III.2 ELETRODOS E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS

III.2.1 ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO (SPCE)

O conjunto de eletrodos de carbono impresso foram adquiridos da Oxley Developments & Company (Inglaterra), e estão mostrados na Figura 7. O arranjo consiste em eletrodos de trabalho (2mm de diâmetro), referência e auxiliar impressos em tinta de material condutor a base de carbono, sobre um suporte cerâmico.

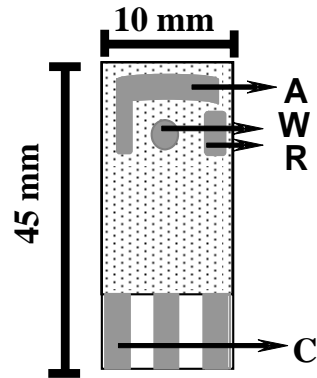


Figura 7: Eletrodos de carbono impresso, onde W é o eletrodo de trabalho, R o eletrodo de referência, A o eletrodo auxiliar e C o contato elétrico.

Para conexão dos eletrodos foi desenvolvido um “plug”, o qual é encaixado na extremidade dos contatos elétricos e ligados a saída dos eletrodos do potenciostato/galvanostato.

III.2.2 ELETRODOS DE OURO IMPRESSO (SPGE)

Um conjunto de eletrodos modelo AC1.W1.RS da BVT-Technologies (Republica Tcheca) também foi utilizado. Esse arranjo é formado por eletrodo de trabalho uma liga Au-Pd (98-2%) de 1 mm de diâmetro (Figura 8) e eletrodos auxiliar e referência de Ag-Pd (98-2%) e Au-Pd (98-2%), respectivamente. Esse eletrodo foi conectado ao potenciostato/galvanostato utilizando um “plug” comercial feito pela BVT-Technologies, o qual é encaixado na extremidade dos contatos elétricos.

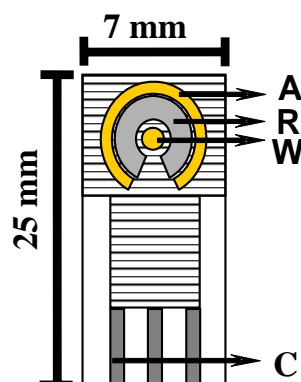


Figura 8: Eletrodos impresso de ouro, onde W é o eletrodo de trabalho, R o eletrodo de referência, A o eletrodo auxiliar e C o contato elétrico.

III.2.3 CÉLULA CONVENCIONAL

Para a avaliação dos eletrodos impressos em sistema convencional foi utilizada uma célula de 5 mL para a avaliação dos eletrodos de ouro impresso (SPGE) e uma célula de 10 mL ou 20 mL para os eletrodos de carbono impresso (SPCE).

III.2.4 CÉLULA COM FLUXO DE SOLUÇÃO

Na avaliação de eletrodos de ouro impresso foi empregada uma célula com fluxo de solução produzida pela BVT-Technologies (Republica Tcheca), a qual é apresentada na Figura 9.

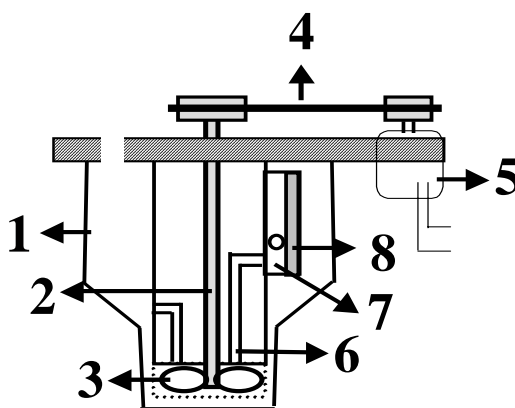


Figura 9: Diagrama esquemático da célula com fluxo de solução empregada em medidas voltamétricas e amperométricas.

Esse dispositivo possui uma haste móvel (2) localizada no centro da célula (1) onde na extremidade inferior está conectada uma hélice em forma de pá (3), e na superior uma correia de borracha (4) ligada a um motor elétrico (5). Com o sistema em funcionamento, a hélice fornece propulsão para a solução que por um tubo fino (6) de $\Phi = 2\text{mm}$ é conduzida até o compartimento (7) onde está o eletrodo impresso (8) e em seguida, por um orifício (não indicado) retorna para o interior da célula.

III.2.5 CÉLULA EMPREGADA NO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

As medidas amperométricas realizadas em sistema de análise por injeção em fluxo com a configuração em linha única, utilizando tubos de polietileno com 0,8 mm de diâmetro interno. Como unidade propulsora foi empregada uma bomba peristáltica ISMATEC modelo 78001-00. A introdução da amostra no sistema foi realizada por meio de um injetor comutador manual confeccionado em acrílico. A unidade de detecção consiste de uma célula eletroquímica confeccionada em poliuretano. As Figuras 10A e 10B apresentam, respectivamente, a configuração do sistema de análise por injeção em fluxo empregado e uma representação esquemática da célula eletroquímica e do eletrodo impresso

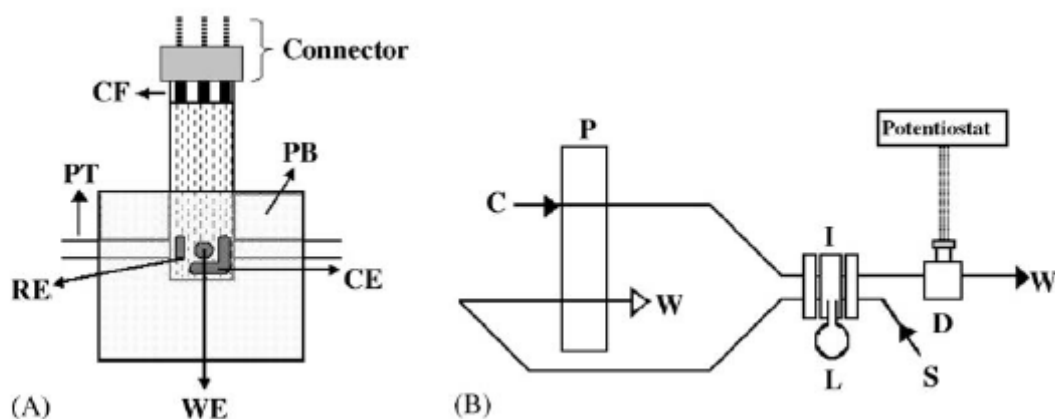


Figura 10: Detector com o eletrodo de carbono impresso (A), onde: C- contato elétrico, CE- contra eletrodo, WE- eletrodo de trabalho, RE- eletrodo de referência, CF- contato externo, PB – Bloco de poliuretano, PT- Tubo de polietileno. Configuração do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado (B), onde: C- solução transportadora, P- bomba peristáltica, W- descarte, I- Injetor, L- alça de amostragem, S- amostra, D- detector.

III. 3- SOLUÇÕES E REAGENTES

Todos os reagentes empregados foram de pureza analítica e foram utilizados sem prévia purificação. Foram preparadas diferentes soluções de eletrólito sempre utilizando água obtida de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore.

Para a modificação dos eletrodos foi empregada uma solução 1% (m/v) de poli-histidina MW = 15800 (Aldrich) dissolvido diretamente em água. Alíquotas de 100 μ L dessa solução foram separadas e congeladas, sendo retiradas individualmente no dia da utilização e descartadas posteriormente.

Para a eletropolimerização do monômero foi utilizada uma solução 0,01 mol L⁻¹ de L-histidina (Synth) preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 9,0). Sempre que utilizada, esta solução foi recém preparada.

Soluções de L-dopa (BDH) foram utilizadas recém preparadas pela dissolução de uma quantidade apropriada do fármaco em eletrólito suporte (ácido acético 0,1 mol L⁻¹).

Soluções estoques de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de procaína (Aldrich) foram preparadas pela dissolução direta do fármaco em tampão acetato.

As soluções de aurotiomato de sódio (Aldrich) e dos interferentes, tais como, albumina (Sigma), creatinina (Sigma) e uréia (Sigma) foram utilizadas recém preparadas.

Soluções contendo Au³⁺ (1 % HNO₃), de padrão espectroscópico (Ridel), foram utilizadas nos estudos comparativos.

As soluções de dicromato (Merck) foram preparadas pela direta dissolução do sal, após secagem em estufa por uma hora (140 °C).

Soluções de isoniazida (Sigma) e pirazinamida (Sigma) foram utilizadas recém preparadas pela dissolução direta no eletrólito suporte utilizado para cada estudo realizado.

III.4 PROCEDIMENTO DE MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS

III .4.1– MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO (SPCE)

A modificação da superfície eletródica através da deposição dos filmes poliméricos foi feita de acordo com métodos descritos na literatura [24, 42, 114] e adequação ao material eletródico. Para tal, testou-se três diferentes metodologias que são descritas a seguir.

III .4.1.1– ELETROPOLIMERIZAÇÃO (SPCE/EPH)

A modificação de eletrodos SPCE foi realizada inicialmente pela eletropolimerização de soluções contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de L-histidina, em meio de tampão fosfato pH 9,0.

Os eletrodos de carbono impresso foram submetidos a varredura sucessiva por 6 ciclos, em um intervalo de potencial de $-1,0 \text{ V}$ a $2,0 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), a 100 mV s^{-1} após borbulhamento de nitrogênio por 10 minutos.

III .4.1.2– ADIÇÃO DIRETA DO POLIAMINOÁCIDO (SPCE/PH)

Na modificação da superfície dos SPCE adotou se o seguinte procedimento. Os eletrodos receberam na superfície uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução 1% (m/v) de poli-histidina. A etapa de evaporação do solvente foi realizada em duas condições: à temperatura ambiente e em estufa pré-aquecida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos.

III .4.1.3– UTILIZAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO (SPCE/Glu-PH)

Os SPCE modificados pela mistura de PH e glutaraldeído foram obtidos pela reação direta em sua superfície [24]. Os eletrodos receberam em sua superfície uma alíquota de $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de glutaraldeído (0,05 % v/v) e depois uma alíquota de $9,5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução 1% de poli-histidina, sendo a homogeneização realizada com a ponta da micropipeta. Nesse procedimento utilizou-se apenas a secagem em estufa pré-aquecida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

III .4.2– MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS DE OURO IMPRESSO (SPGE)

III .4.2.1– ADIÇÃO DIRETA DO POLIAMINOÁCIDO (SPGE/PH)

Os eletrodos SPGE receberam na superfície uma alíquota de 5 μL de uma solução 1% de poli-histidina. A etapa de evaporação do solvente foi realizada em estufa pré-aquecida a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos.

III .4.2.2– UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO (SPGE/MPA-PH)

Os eletrodos SPGE modificados por PH usando o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) foram obtidos pelo seguinte procedimento. Os eletrodos receberam primeiramente na superfície uma solução alcoólica contendo 1 mmol L^{-1} de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) deixado em repouso por uma hora. A seguir o eletrodo foi lavado com álcool e recebeu em sua superfície uma alíquota de 5 μL de uma solução 1% de poli-histidina. A etapa de evaporação do solvente foi realizada em estufa pré-aquecida a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos.

III. 5 – PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS EM AMOSTRAS

III. 5.1 – DETERMINAÇÃO DE AUROTOMALATO EM URINA HUMANA

A determinação de aurotiomalato (AuTM) foi realizada em amostras de urina, em dois métodos desenvolvidos adotando-se o seguinte procedimento: Uma alíquota de 10,0 mL de urina humana, coletada de uma pessoa saudável, foi enriquecida com aurotiomalato, de modo a se obter uma concentração de $1,3 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . A amostra foi acidificada com 1,0 mL de HCl concentrado e aquecida a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

Utilizando o eletrodo de carbono impresso não modificado, foram realizados voltamogramas de varredura linear em solução de 0,1 mol L^{-1} KCl + 0,1 mol L^{-1} HCl (pH = 1,0) em um intervalo de potencial entre -0,6V e +0,6 V (vs. carbono impresso), a 100 mV s^{-1} após pré-concentração em -1,5 V por 60 s. A amostra após retornar a temperatura ambiente, foi diluída com uma solução 0,2 mol L^{-1} de KCl na razão 1:1.

A determinação de AuTM nesta solução foi realizada pelo método da adição de padrão, para quatro sucessivas adições de $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM.

A determinação de AuTM empregando o SPCE/PH foi realizada por voltametria de pulso diferencial utilizando como parâmetros: intervalo de varredura: +0,7V a -0,3V, amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 10 ms, velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} , potencial de acumulação: 1,0 V, tempo de pré-concentração: 60s em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ (pH = 1,0). A amostra foi enriquecida com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e o procedimento de digestão foi o mesmo descrito acima. Uma alíquota de 200 μL dessa amostra foi diluída com $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ (pH = 1,0), até um volume final de 10 mL. A determinação foi realizada em triplicata, pelo método de adição de solução padrão de AuTM para concentrações finais na célula eletroquímica de 0,5, 1,0, 2,0 e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

III. 5.2 – DETERMINAÇÃO DE L-DOPA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

A determinação de L-dopa foi realizada em duas formulações farmacêuticas, SINEMET e PROLOPA, ambas comercializadas na forma de comprimidos, adotando-se o seguinte procedimento: três comprimidos foram pesados e macerados com pistilo em um almofariz até a obtenção de um pó finamente dividido. Posteriormente, uma quantidade apropriada foi dissolvida em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução resultante foi quantitativamente filtrada, transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com tampão acetato.

A quantificação foi realizada pelo método da adição de padrão. Amperogramas hidrodinâmicos foram registrados sob as condições otimizadas: pH 3,0, $E = 0,8 \text{ V}$ (vs. Ag) e vazão de $14,1 \text{ mL min}^{-1}$ para a solução contendo amostra e quatro sucessivas adições de solução padrão, fornecendo concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,3 e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de L-dopa.

III. 5.3 – DETERMINAÇÃO DE PROCAÍNA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

A determinação de procaína foi realizada em uma amostra líquida, comercializada como TIMPANOL. A preparação da amostra consistiu na diluição

direta de uma alíquota apropriada da formulação farmacêutica em solução de acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Os sinais transientes foram obtidos empregando as condições otimizadas: pH = 6,0, potencial aplicado = 0,8V (vs. carbono impresso), vazão da solução transportadora = $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $450 \text{ }\mu\text{L}$. A determinação amperométrica foi realizada pelo método da adição de solução padrão, empregando concentrações de procaína de 15, 30, 45 e $60 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

III. 5.4 – DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA EM URINA HUMANA

A determinação de isoniazida (INZ) foi realizada em amostras de urina humana, adotando-se o seguinte procedimento: Uma alíquota de $10,0 \text{ mL}$ de urina humana, coletada de uma pessoa saudável, foi enriquecida com INZ em ordem de obter uma concentração de $7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. Voltamogramas de pulso diferencial foram registrados no intervalo entre $-0,4\text{V}$ e $-1,3\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) sob as seguintes condições: tempo de pulso de 5 ms , amplitude de pulso de 75 mV , pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} após borbulhamento de nitrogênio por 10 minutos. A determinação foi realizada pela diluição direta de uma alíquota de $100 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra em 10 mL de eletrólito suporte, seguida de quatro adições sucessivas de uma solução de isoniazida, resultando em concentrações finais de 0,3, 0,6, 0,9 e $1,2 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

III. 5.5 – DETERMINAÇÃO DE PIRAMINAMIDA EM URINA HUMANA

A determinação de pirazinamida (PIR) foi realizada em amostras de urina humana, segundo o seguinte procedimento: Uma alíquota de $10,0 \text{ mL}$ de urina humana, coletada de uma pessoa saudável, foi enriquecida com PIR em ordem de obter uma concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. Voltamogramas de pulso diferencial foram registrados no intervalo entre $-0,4\text{V}$ e $-1,3\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) sob as seguintes condições: tempo de pulso de 5 ms , amplitude de pulso de 75 mV , pH 1,0 e velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} borbulhamento de nitrogênio por 10 minutos. A determinação foi realizada pela diluição direta de uma alíquota de $200 \text{ }\mu\text{L}$ da

amostra em 10 mL de eletrólito suporte, seguida de quatro adições sucessivas de uma solução de pirazinamida, resultando em concentrações finais de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pirazinamida.

III. 5.6 – DETERMINAÇÃO DE CRÔMIO EM ÁGUA DE CURTUME

Amostras de água residual foram coletadas do efluente tratado do curtume Betin indústria de couro (Lins-SP) em frascos de polietileno previamente limpos, e conservadas em geladeira a 4°C. Essa amostra foi avaliada em duas condições, com e sem o enriquecimento com Cr (VI) e Cr (III).

Voltamogramas de varredura linear foram registrados em um intervalo de potencial entre +0,5V e -0,7V (vs. Ag/AgCl) empregando uma solução tampão acetato pH 4,0, velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹, tempo de pré-concentração de 180 s em condições de potencial de circuito aberto.

Amostras foram analisadas pelo método proposto sem o enriquecimento, porém não foi detectada concentração de crômio na faixa de linearidade. Por esta razão, optou-se por realizar o enriquecimento da amostra.

As determinações nas amostras enriquecidas com Cr (III) e Cr (VI) foram realizadas em duas etapas: a primeira, antes da oxidação da amostra, fornecia valores de Cr (VI) e a segunda, após a oxidação, fornecia Cr (VI) total. Através da diferença entre os valores, foi possível obter a concentração de Cr (III). A oxidação da amostra foi realizada pelo seguinte procedimento: alíquotas de 5,0 mL das amostras foram alcalinizadas pela adição de 1 mL de solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, seguida da adição de 1mL peróxido de hidrogênio 30 volumes, sendo o excesso eliminado por fervura sob aquecimento. O pH foi ajustado, e a solução transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL. A determinação foi realizada por adições múltiplas de soluções padrão de Cr (VI).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1- DETERMINAÇÃO DE AUROTOMALATO (AuTM) POR VOLTAMETRIA USANDO ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO

O perfil voltamétrico para a oxidação do AuTM sobre eletrodo de carbono impresso (SPCE) está apresentado na Figura 11. Os experimentos foram conduzidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, na presença de $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, sem condicionamento (curva A) e condicionado em $-1,1\text{V}$ (curva B), por 60 s.

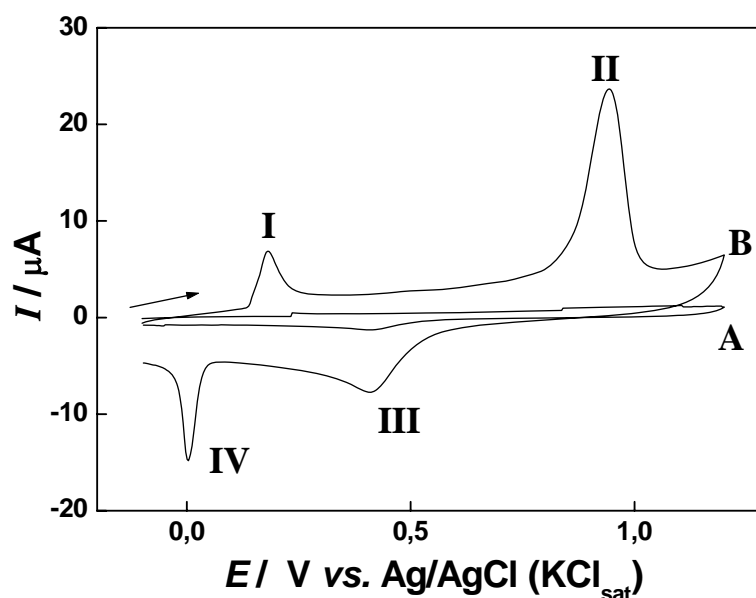


Figura 11: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, contendo $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, sobre SPCE sem condicionamento (curva A) e após aplicação de $-1,1\text{V}$, durante 60 s (curva B).

O voltamograma obtido para a oxidação de AuTM sobre SPCE sem condicionamento apresentou apenas um pico de redução em $+0,40\text{V}$, com baixa intensidade de corrente. No entanto, quando o eletrodo é submetido à aplicação de um potencial de $-1,1\text{V}$, durante 60 s observa-se dois picos anódicos em potenciais de $+0,18\text{V}$ (pico I) e $+0,94\text{V}$ (pico II). Isto ocorre provavelmente sob potenciais de $-1,1\text{V}$ há a redução do AuTM e o produto pré-reduzido é adsorvido na superfície do eletrodo na forma de Au (0). Na etapa seguinte, ocorre a redissolução anódica do

material, com picos de oxidação em +0,18 V (I) e +0,94 V (II). Na varredura reversa observa-se também 2 picos de redução em 0,42V (III) e 0,02V (IV), respectivamente.

Visando investigar os processos redox observados para o AuTM, o comportamento voltamétrico do sistema foi avaliado em três diferentes condições: em solução contendo AuTM, em solução contendo Au (III) e na presença de AuTM e Au(III). Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 12.

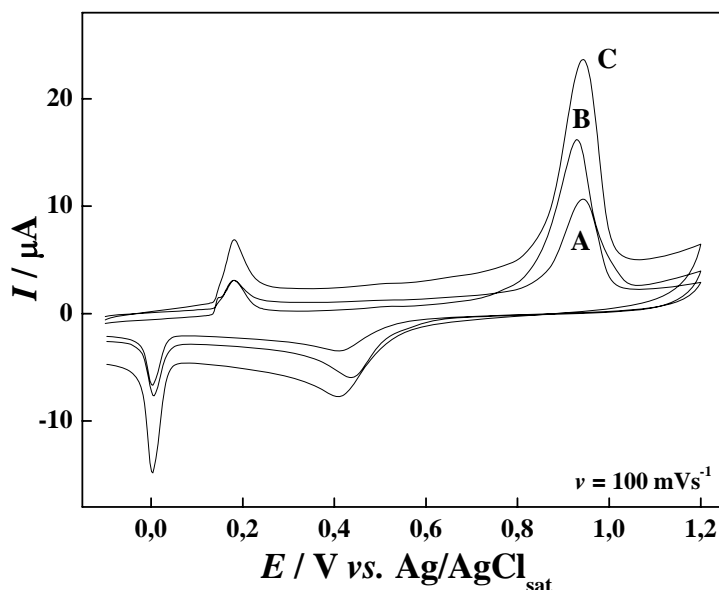


Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE em solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl, contendo 4,5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de íons Au³⁺ (curva A), 5,3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM (curva B) e 4,5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de íons Au(III) junto com 5,3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM (curva C).

Os voltamogramas cíclicos obtidos após a aplicação de -1,1V, por 30 s, para a solução contendo íons Au(III), apresentou valores de potencial de pico muito semelhantes aos observados para a solução contendo AuTM. A adição da solução padrão de Au(III) à solução contendo AuTM (Curva C) gerou um incremento na corrente de pico. Os processos de oxidação e redução envolvendo ouro são fortemente dependentes da natureza do eletrodo, do eletrólito suporte e da presença de íons complexantes no meio [54,58,59]. Assim, nas condições empregadas, sugere-se que a redução de Au(III) ocorre em duas etapas, primeiro via formação de Au(I) (+0,42V), o qual se reduz em 0,02V. Isso demonstra que a eletroatividade do

AuTM, em solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, é baseada na eletroatividade dos íons Au(III) sobre eletrodos de carbono impresso.

A influência da variação do pH, na resposta voltamétrica do sistema, foi investigada entre valores de 1,0 a 4,0. A Figura 13 apresenta os respectivos voltamogramas de varredura linear obtidos após prévia redução em potencial $-1,1\text{V}$ (vs. Ag/AgCl).

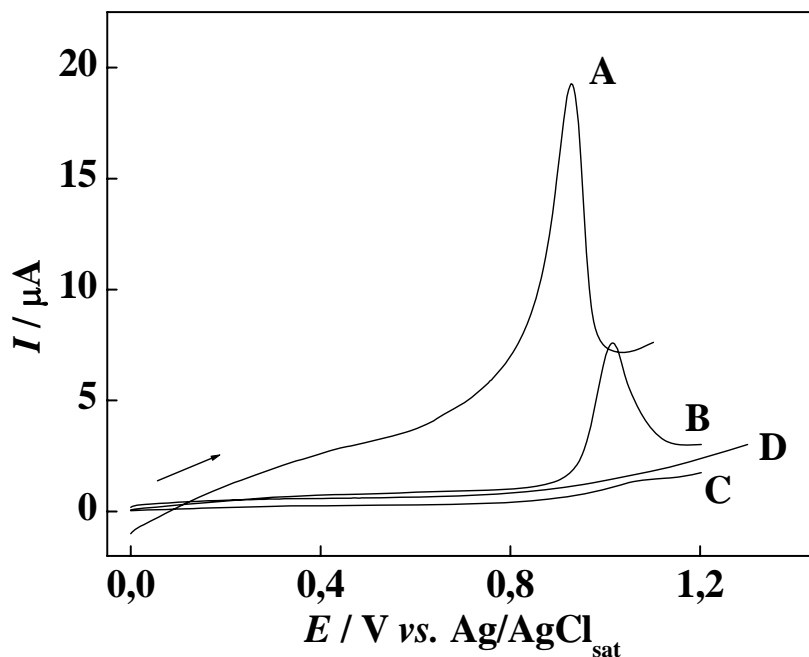


Figura 13: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de diferentes concentrações de HCl, na presença de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons AuTM, após a aplicação $-1,4 \text{ V}$ (vs. carbono impresso), por 60 s a 100 mVs^{-1} (A) pH = 1,0, (B) pH = 2,0, (C) pH = 3,0 e (D) pH = 4,0.

Pode ser observado uma diminuição na corrente de pico com o aumento do pH; para valores acima de pH 3,0, não é mais verificado o pico de oxidação e para valores menores que pH 1,0, a etapa de pré-concentração é fortemente influenciada pela redução dos íons H^+ , que atuam no sentido de competir com a redução do AuTM e, conseqüentemente, causam uma diminuição na corrente de pico na etapa de redissolução. Os valores de potencial de pico apresentam uma variação para valores menos positivos. Para fins analíticos, foi adotado o valor de pH igual a 1,0.

IV.1.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA

A seguir investigou-se a potencialidade dos eletrodos SPCE na determinação de AuTM, otimizando-se outros parâmetros importantes, como é o caso do tempo de pré-acumulo. A Figura 14 apresenta os voltamogramas de varredura linear, obtidos em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, sobre o SPCE submetido à redução, sob um potencial de -1,2 V, em tempos de 0 a 90 s.

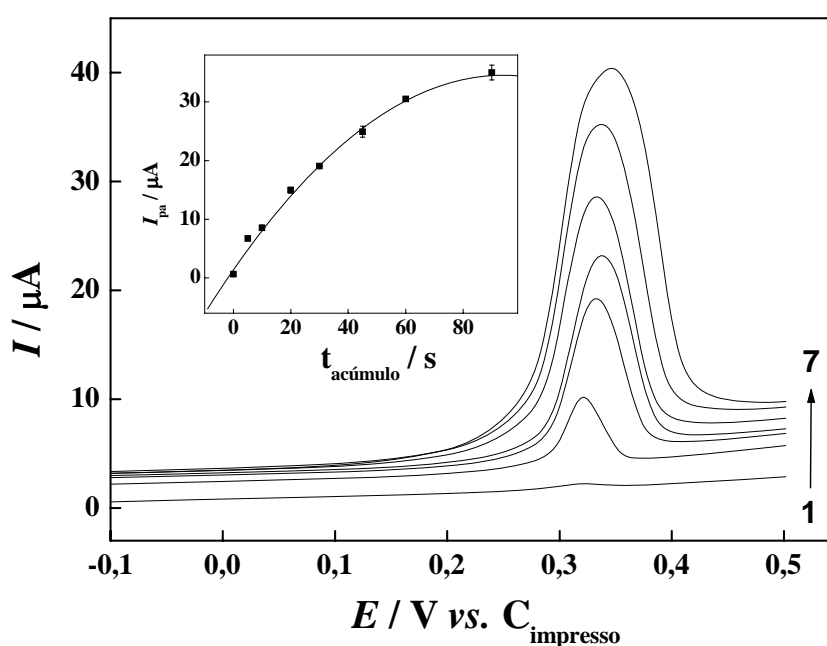


Figura 14: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl contendo $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de íons AuTM, após a aplicação de -1,2 V (vs. carbono impresso), por diferentes tempos, (1) = 0, (2) = 5, (3) = 10, (4) = 20, (5) = 30, (6) = 60 e (7) = 90s.

Os resultados demonstraram que o aumento do tempo de acumulo sob potencial, onde se promove a prévia redução do AuTM, é responsável pela pré-concentração do Au(0) na superfície do eletrodo e conseqüentemente pelo aumento da corrente de pico em $E_p = 0,33$ V. Para fins analíticos, adotou-se $t = 60$ s para monitorar a quantidade de AuTM, pois apresenta a melhor resolução voltamétrica.

A influência do potencial de pré-redução, para acúmulo indireto de AuTM, foi investigada entre valores de -0,8 a -1,8 (vs. C impresso). Em valores menores que -0,8 V, não se observou nenhum pré-acúmulo de Au oriundo do AuTM. A Figura 15 mostra os resultados obtidos.

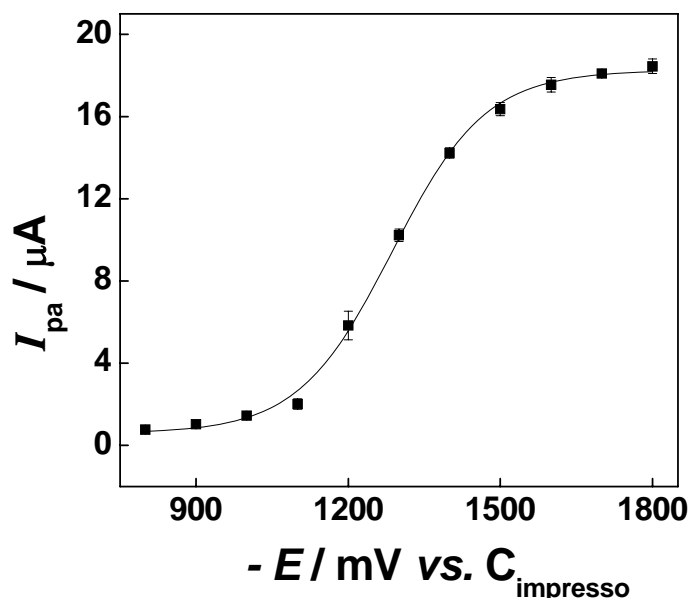


Figura 15: Variação da corrente de pico anódica obtida para o SPCE em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons AuTM após a aplicação de potenciais de acúmulo variando entre -800 a -1800 mV (vs. C impresso) e mantidos por 60 s.

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que a aplicação de potenciais menos negativos que -1,0 V, não leva a formação de nenhum pico significativo de corrente de oxidação; porém, potenciais mais negativos que -1,1 V, apresentaram um aumento na corrente de oxidação. Estes valores aumentaram até -1,4 V, o qual foi escolhido como adequado para aplicações analíticas, uma vez que potenciais mais negativos levam a redução de H^+ , comprometendo a pré-concentração do AuTM sobre o eletrodo.

O efeito da velocidade de varredura do potencial sobre o sistema foi estudado entre 5 e 100 mVs^{-1} e os respectivos voltamogramas de varredura linear estão apresentados na 16 (A). Os valores de I_p vs $v^{1/2}$ foram colocadas em gráfico e mostrados na Figura 16 (B)

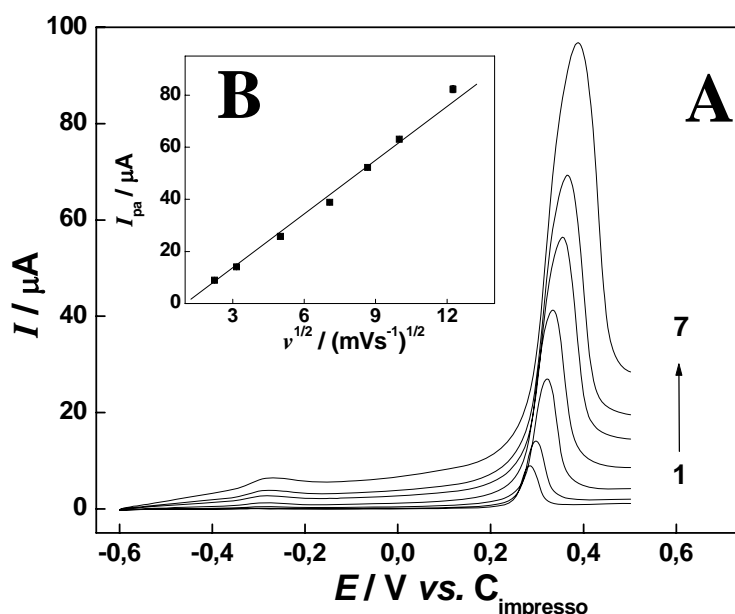


Figura 16: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de 0,1 mol L⁻¹ de HCl contendo 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de íons AuTM, após a aplicação -1,4 V (vs. carbono impresso), por 60 s, em diferentes velocidades de varredura, (1) = 5, (2) = 10 (3) = 25, (4) = 50, (5) = 75, (6) = 100 e (7) = 150 mVs⁻¹.

Foi observada uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, segundo a equação: $I_{\text{pa}} = -11,7 + 7,5 v^{1/2}$. Esses resultados indicam que o processo eletródico é controlado pela difusão dos anions cloreto até a superfície do eletrodo.

IV. 1.2 CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO MÉTODO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros estudados, intervalo avaliado e os valores otimizados para a determinação do AuTM, por voltametria de varredura linear.

Tabela 1: Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o AuTM empregando um SPCE.

Parâmetro estudado	Intervalo avaliado	Valor escolhido
Tempo de pré-concentração	0 s a 90 s	60 s
Potencial de pré-concentração	-0,8 V a -1,8 V	-1,4 V (vs. C impresso)
pH	1,0 a 3,0	1,0
Velocidade da varredura	5 mV s ⁻¹ a 150 mV s ⁻¹	100 mV s ⁻¹

Empregando as melhores condições experimentais, foi construída uma curva analítica em triplicata. A Figura 17 apresenta os voltamogramas de varredura linear, obtidos em solução contendo diferentes concentrações de AuTM, assim como a curva analítica.

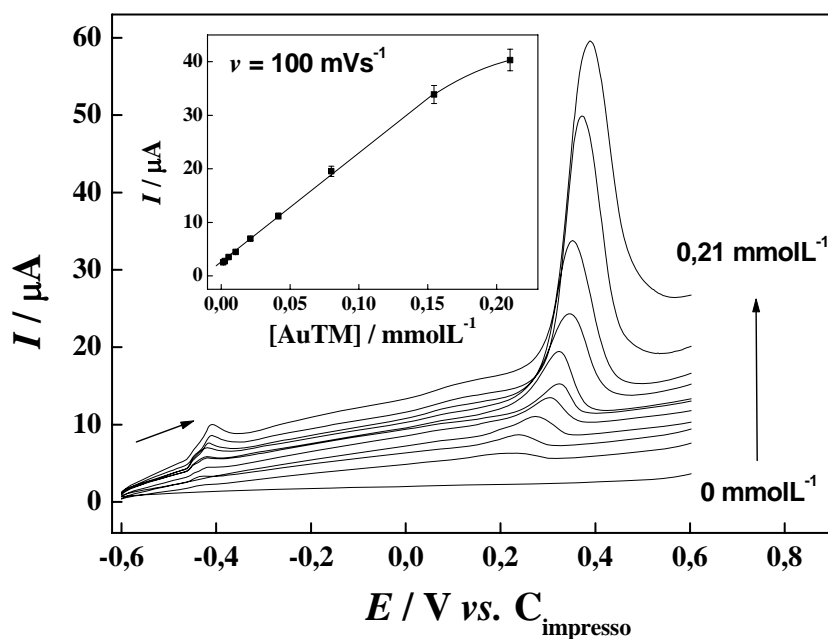


Figura 17: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, na presença de diferentes concentrações de AuTM, aplicando as condições otimizadas.

A curva analítica apresentou um intervalo de linearidade entre a resposta voltamétrica do SPCE e concentração de AuTM de $1,43 \times 10^{-6}$ a

$1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a equação: $I_p = 2,45 + 2,06 \times 10^5 C_{\text{AuTM}}$. Em valores superiores a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, observa-se uma estagnação da corrente, indicando, assim, a saturação da superfície do eletrodo. O método ofereceu uma sensibilidade de $206,18 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ e um limite de detecção ($3 \times$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $6,50 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizadas 10 Medidas consecutivas com o mesmo eletrodo e 5 medidas para 3 diferentes eletrodos, sendo obtidos desvios padrão de 4,1% e 5,8%, respectivamente.

Comparando-se os resultados obtidos pela curva analítica com os valores de concentração descritos na literatura [44, 45] para o AuTM, em amostras de urina que é $< 5 \mu\text{g L}^{-1}$ nos leva a concluir que o método proposto poderia ser utilizado para a determinação de AuTM nesse tipo de amostra.

Visando a aplicação do SPCE em amostras de urina, diversas substâncias existentes nesse tipo de amostra foram avaliadas, tais como, albumina, creatinina, glicose, íons fosfato, potássio, sódio e uréia. A influência destes interferentes foi estudada separadamente, testando concentrações variáveis entre 0,0 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em relação a concentração fixa de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM. A Figura 18 apresenta os resultados obtidos.

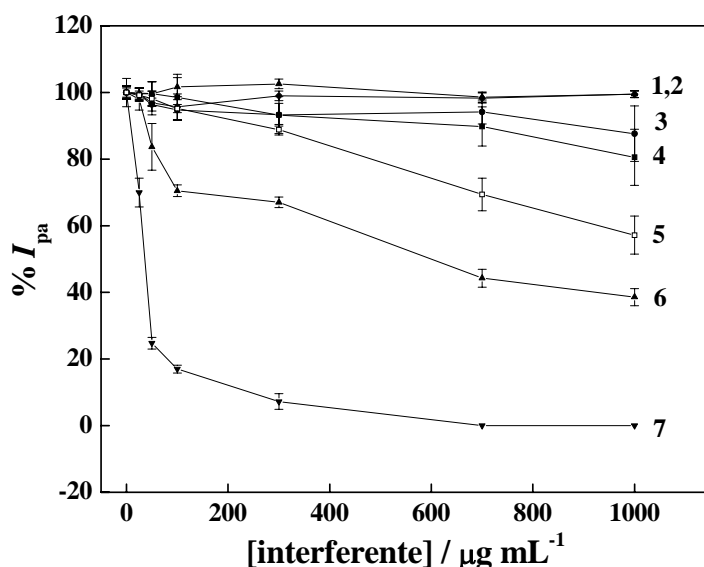


Figura 18: Variação do sinal voltamétrico observado para o SPCE, em solução contendo uma concentração fixa de AuTM, antes e após adição de (1) = Sódio, (2) = Potássio, (3) = Creatinina, (4) = Glicose, (5) = Fosfato, (6) = Uréia, (7) = Albumina.

Das substâncias avaliadas como possíveis interferentes, verifica-se que para os diversos componentes da urina, tais como íons sódio e potássio, não há influência na resposta voltamétrica do sistema. No entanto, substâncias como glicose, fosfato e creatinina apresentam uma interferência significativa em concentrações maiores que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. O efeito mais acentuado na redução da corrente foi verificado para a albumina, pois em concentrações maiores que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se uma diminuição de 25% na corrente de pico anódica. Este resultado pode estar relacionado com a complexação entre soro albumina e AuTM [115], que apresenta forte interação com os grupos contendo enxofre, presentes na albumina humana. Esse fato sugere que a determinação em amostras de urina deve ser realizada utilizando o mínimo da concentração das espécies interferentes ou realizando uma etapa de separação dessas substâncias.

A determinação de AuTM em amostras enriquecidas de urina foi realizada adotando-se um procedimento de digestão da amostra, como descrito na parte experimental. A Tabela 2 apresenta os valores adicionados e recuperados.

Tabela 2: Valores obtidos na determinação de AuTM em amostras de urina empregando o SPCE não modificado.

Amostra	AuTM adicionado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	AuTM recuperado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	E / %
1	13,0	12,9	0,8
2	13,0	12,6	3,2
3	13,0	12,6	3,2

Os valores obtidos apresentaram uma boa concordância entre os valores adicionados e recuperados, sugerindo que o método proposto pode ser aplicado na determinação de AuTM nesse tipo de amostra.

IV.2. EMPREGO DE UM ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO COMO DETECTOR AMPEROMÉTRICO EM UM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE PROCAÍNA

IV.2.1 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA PROCAÍNA SOBRE SPCE.

A Figura 19 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína sobre o eletrodo de carbono impresso utilizando como eletrodo de referência um eletrodo de carbono impresso (curva A) e um eletrodo de Ag/AgCl convencional (curva B).

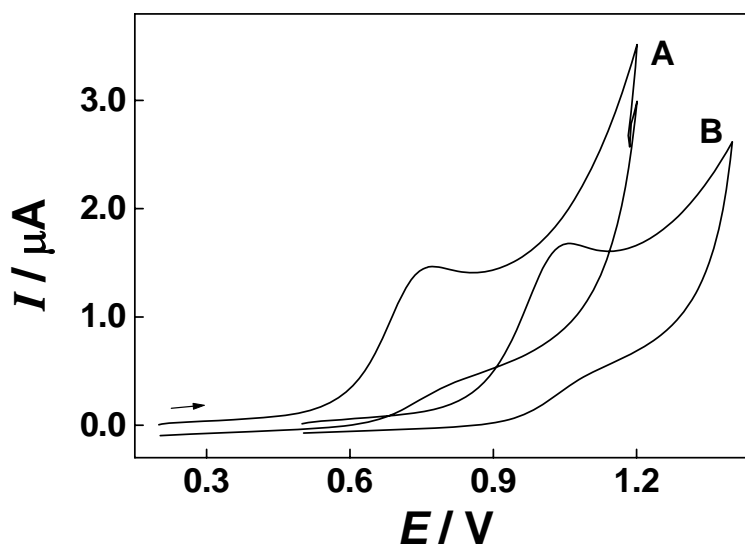


Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão acetato pH 6 contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína sobre eletrodo de carbono impresso. (A) vs. carbono impresso. (B) vs. Ag/AgCl., $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Verificou-se que a procaína exibe um pico anódico com características irreversíveis em $+1,06 \text{ V}$ vs Ag/AgCl referente a oxidação do grupo $-\text{NH}_2$ presente em sua estrutura. Utilizando como eletrodo de referência um eletrodo de carbono impresso observa-se uma diferença constante de aproximadamente 300 mV para valores de potencial menos positivo.

A influência do pH sobre a resposta voltamétrica do eletrodo impresso, foi avaliada entre valor de pH 3,0 a 7,0 e os respectivos valores de potencial e corrente de pico anódica estão apresentados na Figura 20.

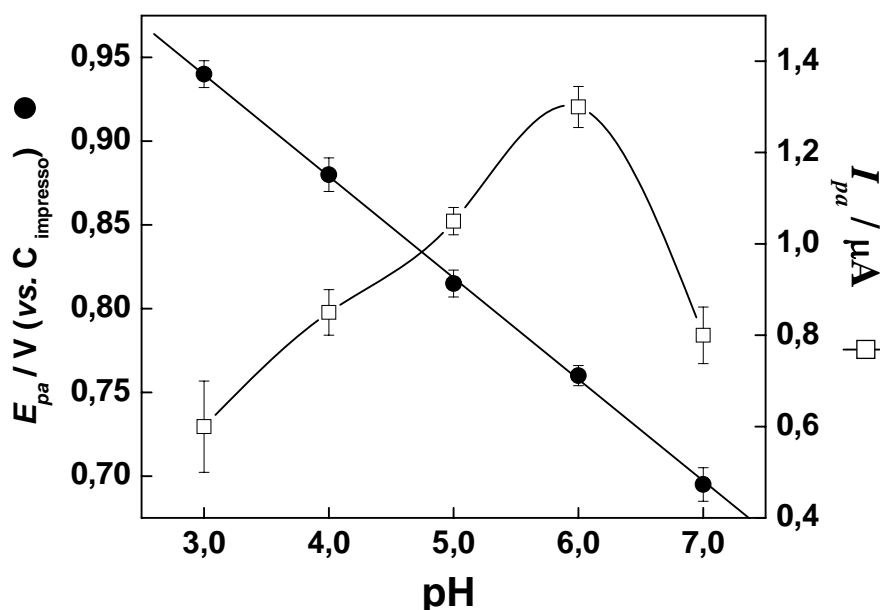
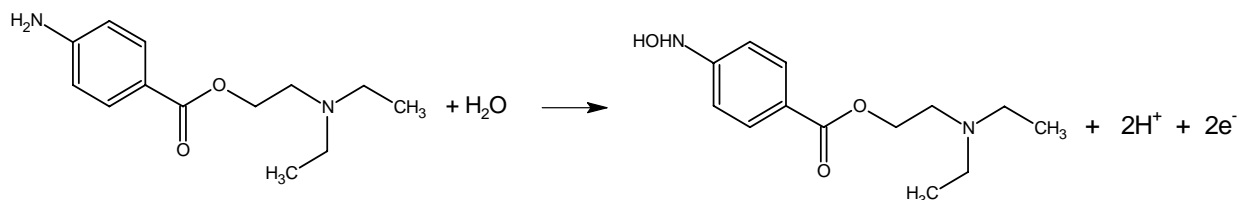


Figura 20: Variação da corrente e do potencial de pico anódico extraídos dos voltamogramas registrados em solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína ajustada em diferentes valores de pH.

Observou-se um deslocamento do potencial de pico anódico de 60 mV por década de pH para todo o intervalo investigado. De acordo com a literatura o grupo amino é oxidado a hidroxilamina correspondente após transferência de 2 elétrons e 2 prótons. A variação do potencial de pico anódico comprova o mecanismo de oxidação da procaína envolve dois prótons e dois elétrons como proposto no Equação 1 [75, 76].



Equação 1: Reação de oxidação da procaína.

Para os demais estudos foi escolhido pH 6,0 foi escolhido para análise de procaína por apresentar o maior valor da corrente de oxidação para a procaína. Embora valores de pH maiores que 6,0 apresentem um menor valor de potencial de

oxidação, o que poderia ser vantajosos em termos de seletividade, existe uma queda acentuada no valor da corrente de pico.

IV.2.2 UTILIZAÇÃO DO SPCE COMO DETECTOR AMPEROMÉTRICO EM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.

Em condições de voltametria cíclica, sem fluxo da solução, foi observado um decréscimo na intensidade da corrente de pico anódico após sucessivos ciclos de potencial, sugerindo que o produto da oxidação se adsorve na superfície do eletrodo. Após a lavagem do eletrodo com solução do eletrólito verificou-se o restabelecimento da resposta voltamétrica do sistema. Diante deste resultado, optou-se por aplicar o eletrodo de carbono impresso como um detector amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo, onde o eletrólito passa continuamente pelo detector, minimizando o efeito de envenenamento da superfície do eletrodo pela adsorção do produto.

IV.2.2.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

O primeiro parâmetro avaliado foi a influência do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, para isso foram investigados potenciais variando entre 650 mV e 900 mV (vs. Carbono impresso) para três sucessivas injeções de 400 μL de uma solução de uma $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína. Os sinais transientes e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.

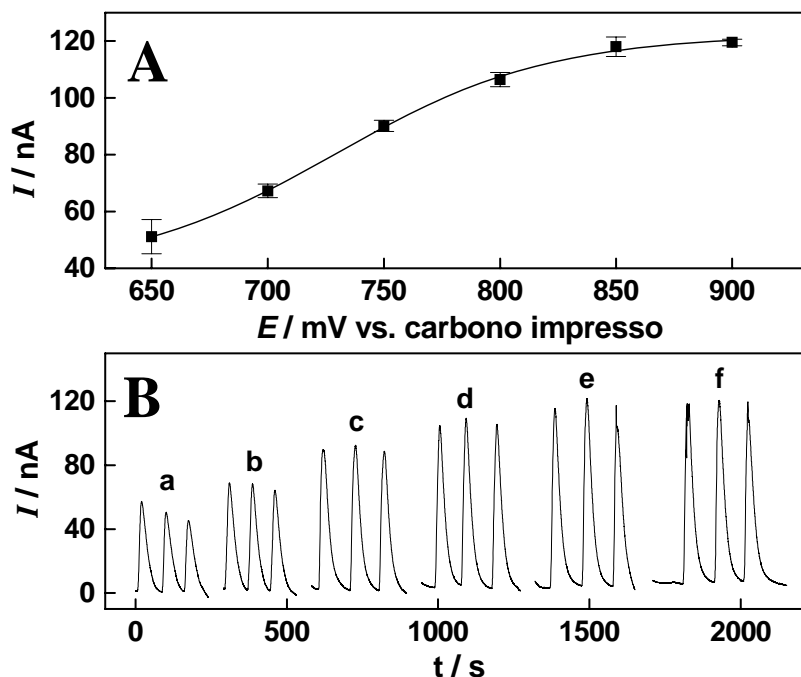


Figura 21: Sinais transientes obtidos para injeções de 400 μL de solução de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A) de procaína em diferentes valores potenciais, vazão $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ (B).

Foi observado um aumento da corrente de oxidação para potenciais entre 650 mV e 800 mV. Valores de potencial entre 800 e 950 mV não apresentaram aumento significativos, desta forma, buscando a melhor concordância entre a corrente de oxidação e seletividade do detector, foi escolhido um potencial de 800 mV para os demais estudos.

A vazão da solução transportadora foi investigada alterando a rotação da bomba peristáltica, foram utilizadas vazões entre $1,1$ e $6,5 \text{ mL min}^{-1}$. Foram registrados os sinais transientes para três injeções consecutivas de $400 \mu\text{L}$ de solução de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína em cada vazão aplicada e os resultados obtidos são apresentados na Figura 22.

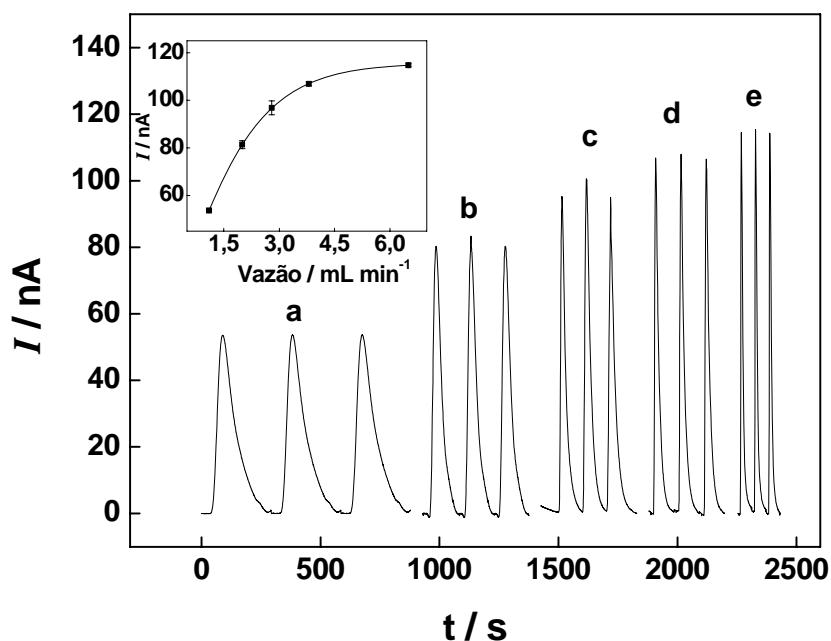


Figura 22: Sinais transientes obtidos para injeções de 400 μL de solução de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína aplicando-se um potencial de 0,8 V (vs. Carbono impresso) em diferentes vazões: (a) 1,1, (b) 2,0, (c) 2,8, (d) 3,8 e (e) 6,5 mL min^{-1} .

Para valores de vazão entre 1,1 e 3,8 mL min^{-1} observou-se um aumento na corrente de oxidação com concomitante “afinamento” do sinal transiente. Para valores de vazão maiores que 3,8 mL min^{-1} não foi mais verificado aumento significativo na corrente, apenas a diminuição do alargamento do sinal transiente. O aumento na corrente é atribuído a uma melhora no transporte de massa do sistema. Para a escolha da melhor vazão, três parâmetros foram considerados, o tempo de resposta, tempo de limpeza e frequência analítica. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

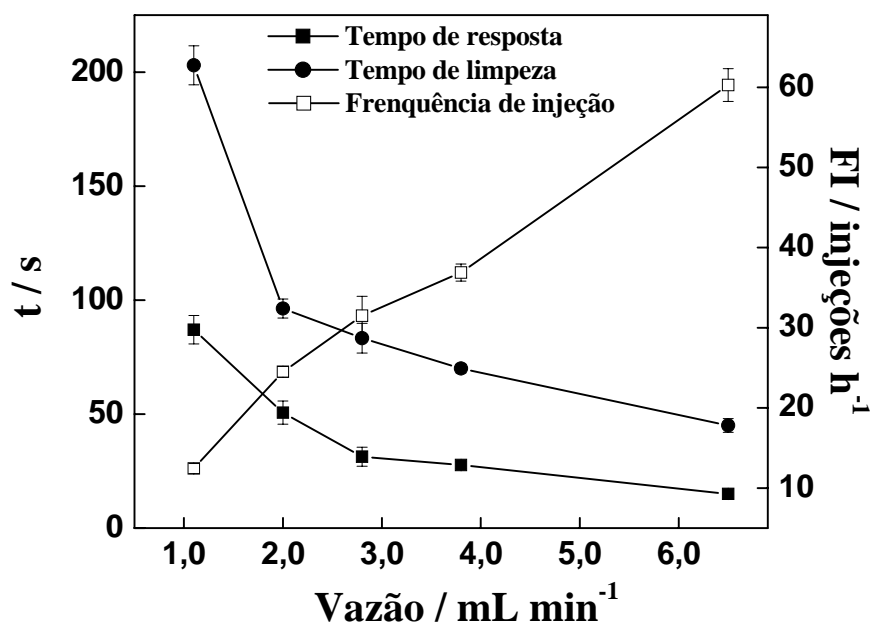


Figura 23: Variação do tempo de resposta, tempo de limpeza e frequência de injeção para diferentes vazões empregadas.

Analisando o gráfico construído foi possível verificar uma diminuição nos tempos de resposta e limpeza com o aumento da vazão, e com isso um acréscimo na frequência de injeção. Para os demais estudos foi utilizada uma vazão de 3,8 mL min⁻¹ visto que apresentou uma boa concordância entre os três parâmetros avaliados. Embora vazões superiores a 3,8 mL min⁻¹ apresentem frequências de injeção maiores, a pressão hidrodinâmica do sistema é significativamente aumentada, o que pode acarretar eventuais problemas de vazamento no sistema.

O volume de injeção foi estudado variando-se a alça de amostragem. Volumes de injeção entre 100 e 600 µL foram avaliados para uma solução 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de procaína. Os sinais transientes e os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

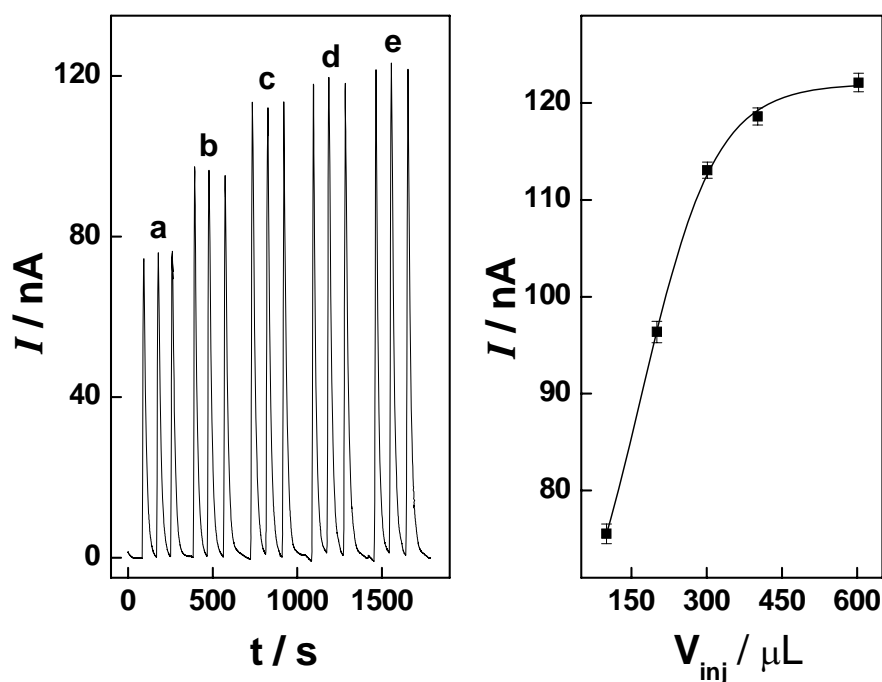


Figura 24: Sinais transientes obtidos para injeções de diferentes volumes de amostragem: (a) 100 (b) 200, (c) 300, (d) 400 e (e) 600 μL de uma solução de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína, potencial aplicado 0,8 V e vazão $3,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Foi verificado um acréscimo da corrente de oxidação com o aumento do volume injetado para valores entre 100 e 400 μL , acima deste valor não foi verificada variação significativa. Esse comportamento pode ser explicado considerando a dispersão da amostra durante o percurso analítico, quando maior o volume de injeção, menor é o grau de dispersão do analito, como conseqüência a amostra chega menos diluída ao detector e gera um sinal maior. Para fins analíticos, foi adotado um volume de injeção de 400 μL foi escolhido para os demais estudos.

IV.2.2.2 CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO MÉTODO

O estudo dos diferentes parâmetros inerentes do método visando a otimização das condições operacionais do sistema são sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros estudados na otimização do sistema para a determinação de procaína.

Parâmetro	Intervalo estudado	Valor escolhido
pH	4,0 a 7,0	6,0
Potencial aplicado / V vs C impresso	0,65 a 0,9	0,8
Vazão / mL min ⁻¹	1,0 a 7,0	3,8
Volume injetado/ µL	130 a 600	450

Empregando as condições previamente otimizadas, construiu-se uma curva analítica no intervalo de concentração entre $1,0 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de procaína. Os sinais transientes registrados e a respectiva curva analítica estão apresentados na Figura 25.

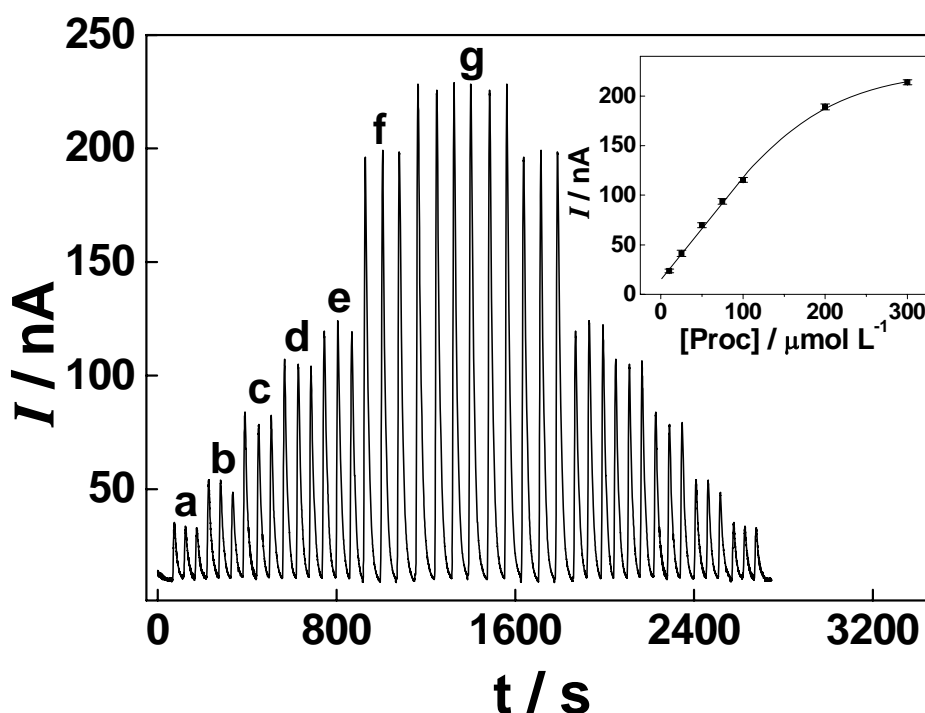


Figura 25: Sinais transientes obtidos para diferentes concentrações de procaína. (a) $1,0 \times 10^{-5}$, (b) $2,5 \times 10^{-5}$, (c) $5,0 \times 10^{-5}$, (d) $7,5 \times 10^{-5}$, (e) $1,0 \times 10^{-4}$, (f) $2,0 \times 10^{-4}$ e (g) 3×10^{-4} mol L⁻¹. Curva analítica inserida.

A partir da curva analítica foi observada uma linearidade entre a resposta amperométrica do eletrodo e a concentração de procaína no intervalo de $1,0 \times 10^{-5}$ a

$1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com sensibilidade amperométrica (SA) de $1,03 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ e limite de detecção (3 desvio padrão do branco SA) de $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

A repetitividade do método proposto foi avaliada realizando 15 injeções de uma solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína. Nestas condições verificou-se um desvio padrão relativo de 3,2% e uma frequência analítica de 36 injeções por hora. Utilizando-se 5 diferentes eletrodos foi observado um desvio padrão de 4,3% quando comparada a média obtida para 10 injeções consecutivas de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ procaína, demonstrando assim uma boa reprodutibilidade do método proposto.

O efeito da matriz sobre a resposta amperométrica do eletrodo foi avaliado utilizando soluções contendo diferentes composições, de amostra e de padrão. Os sinais transientes e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26.

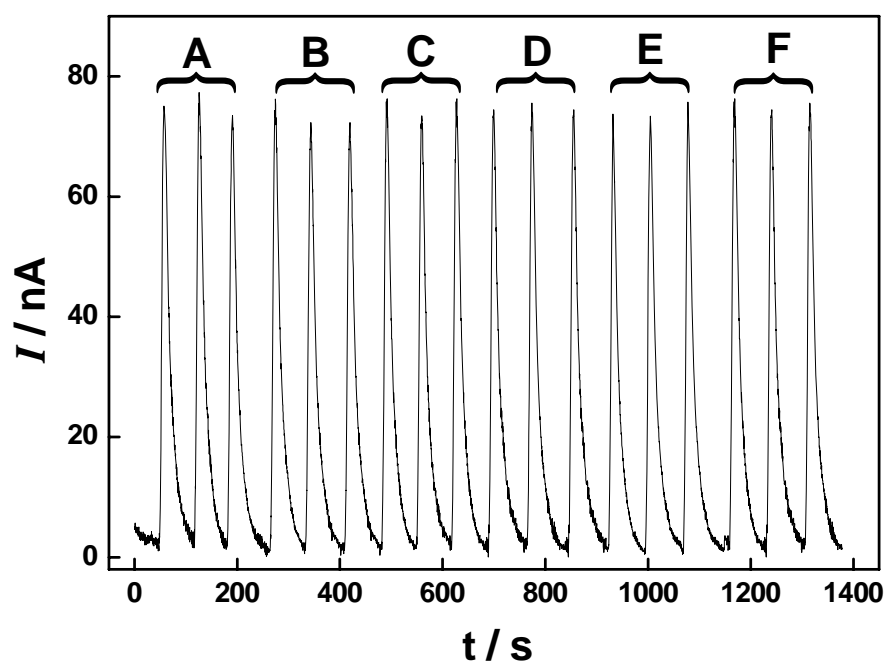


Figura 26: Sinais transientes obtidos nas condições otimizadas para injeções de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de procaína, obtido com diferentes proporções entre padrão e amostra: (A) $5,0 \times 10^{-5}:0,0$, (B) $4,0 \times 10^{-5}:1,0 \times 10^{-5}$, (C) $3,0 \times 10^{-5}:2,0 \times 10^{-5}$, (D) $2,0 \times 10^{-5}:3,0 \times 10^{-5}$, (E) $1,0 \times 10^{-5}:4,0 \times 10^{-5}$ e (F) $0,0:5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 4: Resultados dos experimentos de adição e recuperação usando o procedimento proposto para determinação de procaína.

Padrão (mol L ⁻¹) / Amostra (mol L ⁻¹)	Recuperação* / %
5,0 x 10 ⁻⁵ / 0,0	100,0 ± 2,5
4,0 x 10 ⁻⁵ / 1,0 x 10 ⁻⁵	97,8 ± 3,0
3,0 x 10 ⁻⁵ / 2,0 x 10 ⁻⁵	100,1 ± 2,2
2,0 x 10 ⁻⁵ / 3,0 x 10 ⁻⁵	99,4 ± 0,9
1,0 x 10 ⁻⁵ / 4,0 x 10 ⁻⁵	98,7 ± 1,7
0,0 / 5,0 x 10 ⁻⁵	100,2 ± 1,3

*n = 3

Os valores de recuperação obtidos para amostras contendo diferentes concentrações de procaína foram testadas e os resultados obtidos apresentados na Tabela 4. Os resultados demonstraram excelente nível de recuperação e a amostra não apresentou efeito de matriz sobre a resposta amperométrica do eletrodo, sugerindo assim, que o mesmo pode ser aplicado na determinação do analito nessa amostra.

O método proposto foi aplicado para a quantificação de procaína na formulação farmacêutica TIMPANOL, o procedimento adotado foi descrito na seção experimental. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5:

Tabela 5: Comparação entre os resultados obtidos com o método proposto e o método oficial.

Amostra	Valor nominal	Método oficial	Método proposto	Er /%
TIMPANOL	50 mg mL ⁻¹	51,8 ± 1,3 mg mL ⁻¹	52,5 ± 2,0 mg mL ⁻¹	1,4

Er = erro relativo, método proposto vs. método oficial.

Em todas as análises foram realizados teste t e teste F e os valores obtidos não excederam os valores tabelados [116] indicando uma boa concordância entre os resultados obtidos pelo método proposto e o oficial.

IV.3 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE L-DOPA UTILIZANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE OURO EMPREGANDO UM SISTEMA COM FLUXO DE SOLUÇÃO

IV.3.1. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA L-DOPA EM SISTEMA CONVENCIONAL

O perfil voltamétrico correspondente à oxidação de L-dopa no eletrodo de ouro impresso é semelhante aquele observado sobre eletrodo de ouro convencional utilizando um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($\text{KCl}_{\text{sat.}}$). Observa-se apenas um deslocamento de +0,16V no pico de oxidação do composto no eletrodo impresso de ouro. A Figura 27 apresenta o voltamograma cíclico obtido em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 3,0 na ausência (curva A) e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa (curva B).

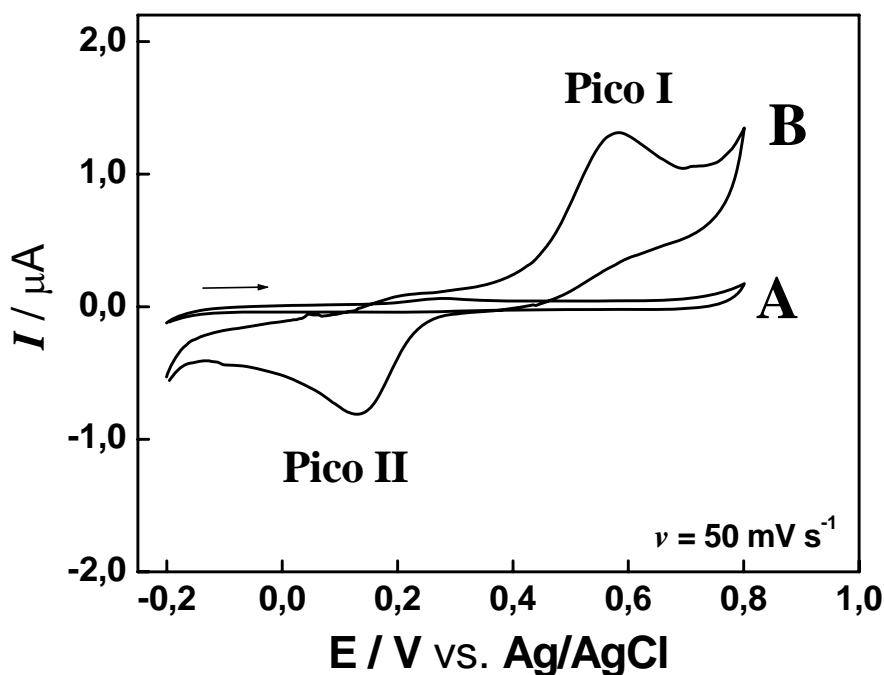


Figura 27: Voltamogramas obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (pH = 3,0) na ausência (curva A) e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa (curva B).

Na Figura 27-A, obtida na ausência de L-dopa, não são verificados processos faradáicos no intervalo de potencial avaliado, a partir de 0,9 V (vs

Ag/AgCl) foi observado um aumento da corrente referente à oxidação da superfície eletródica. A curva B, obtida na presença L-dopa, apresenta dois picos de corrente: o pico I em 0,58 V (vs. Ag/AgCl), que é atribuído à oxidação da L-dopa a dopaquinona, e o pico II em 0,14 V (vs. Ag/AgCl), é referente à redução da dopaquinona.

A influência do pH sobre a resposta voltamétrica do eletrodo impresso, foi avaliada entre valor de pH 3,0 e 5,0, observa-se um deslocamento de $\Delta E_p=60$ mV por década de pH. Acima de pH 6,0 observa-se o completo desaparecimento do processo de oxidação do analito. Essa variação comprova o mecanismo de oxidação da L-dopa envolvendo dois prótons e dois elétrons proposto na literatura. Para os demais estudos foi escolhido o pH 3,0 por apresentar o menor potencial para a oxidação da L-dopa, embora os valores de potencial de pico assumam valores menos positivos com a diminuição do pH, soluções possuindo pH menor que 3,0 podem danificar o material (acrílico) com o qual a célula utilizada foi construída.

O efeito da velocidade de varredura de potencial foi investigado entre 5 e 100 mV s^{-1} , verificou-se uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que sugere um controle difusional para o processo de oxidação da L-dopa no eletrodo impresso. A velocidade de 50 mV s^{-1} forneceu o melhor perfil voltamétrico e foi escolhida para a construção da curva analítica. O eletrodo impresso de ouro apresentou uma linearidade entre corrente de pico e concentração do analito no intervalo de $9,9 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$, sensibilidade amperométrica de $0,9 \mu\text{A L mol}^{-1}$ e limite de detecção de $6,8 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$.

IV.3.2. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA L-DOPA EM UM SISTEMA COM FLUXO DE SOLUÇÃO

Visando melhorar a sensibilidade amperométrica e o limite de detecção do método proposto, o eletrodo impresso foi submetido a medidas voltamétricas em condições dinâmicas. Para isso utilizou-se um sistema com fluxo de solução, o qual foi apresentado na seção experimental. Antes de serem realizadas medidas voltamétricas ou amperométricas em condições hidrodinâmicas, foi realizada a calibração da vazão da célula de fluxo. Utilizando um controlador de tensão foram

aplicadas voltagens ao motor elétrico variando entre 1,5 V e 3,0 V. A Figura 28 apresenta os resultados obtidos.

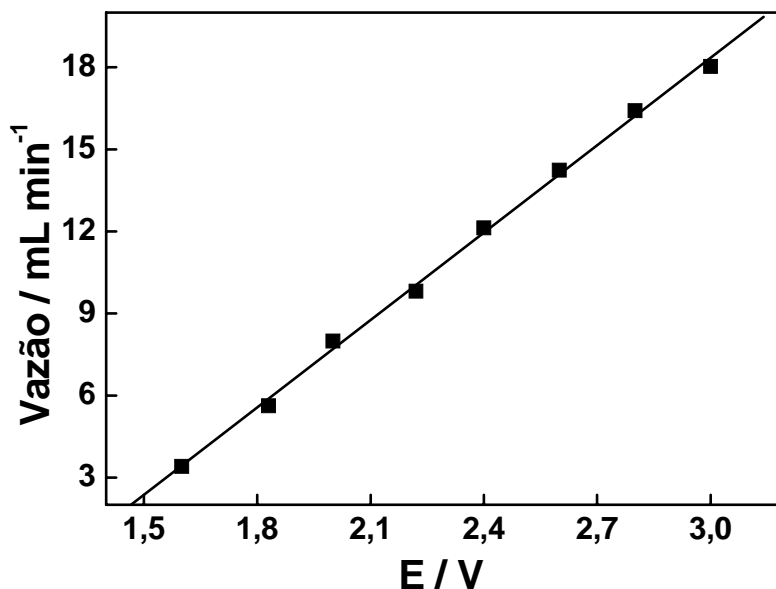


Figura 28: Calibração da célula de fluxo, valores da vazão obtida em função da voltagem aplicada ao motor.

Foi observada uma variação linear entre a vazão na célula e a tensão de alimentação do motor segundo a equação: $V \text{ (mL min}^{-1}\text{)} = -13,6 + 10,7 \cdot U \text{ (V)}$. Para o intervalo avaliado foram verificadas vazões entre aproximadamente 3 e 18 mL min⁻¹. Voltagens menores que 1,5 V não produziram fluxo na célula e maiores que 3,0 V não são recomendados pelo fabricante. Após a calibração foram registrados os os voltamogramas e amperogramas em condições hidrodinâmicas.

A Figura 29 apresenta o voltamograma hidrodinâmico obtido com o eletrodo de ouro impresso, na mesma figura, para efeito comparativo, estão apresentados os voltamogramas registrados sem fluxo de solução.

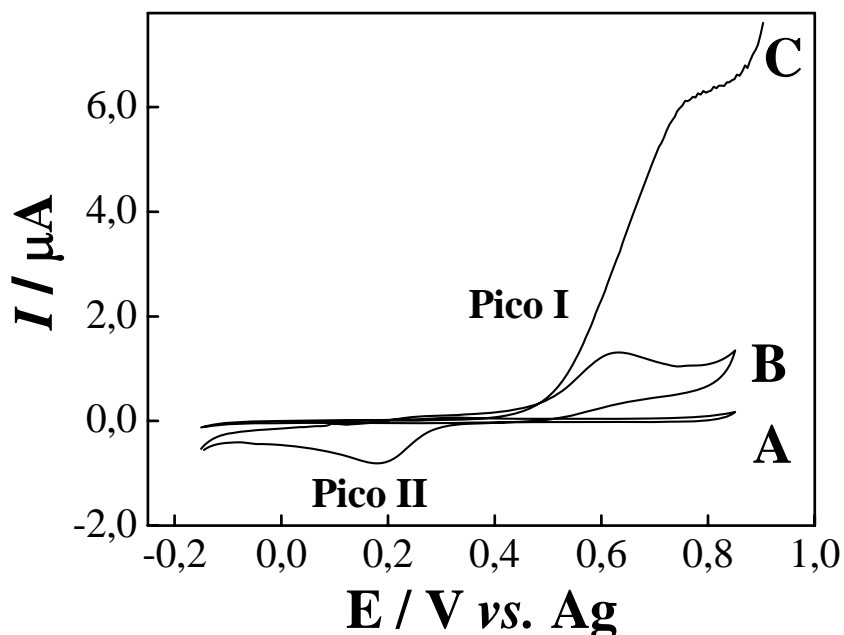


Figura 29: Voltamogramas obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato ($\text{pH} = 3,0$) na ausência (curva A) e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa (curva B e C), em condição estática (curva A e B) e dinâmica com fluxo de $7,7 \text{ mL min}^{-1}$ (curva C).

As curvas voltamétricas A e B foram obtidas em condições estáticas, e já foram apresentadas e discutidas no item anterior. A curva C corresponde a um voltamograma de varredura linear obtido em fluxo constante de $7,7 \text{ mL min}^{-1}$. Observa-se que o valor de corrente é cerca de 5 vezes maior que o obtido para o sistema em condição estática, comprovando a eficiência do transporte de massa na resposta voltamétrica do eletrodo.

Visando a otimização dos parâmetros envolvidos na determinação amperométrica de L-dopa foram estudados o efeito do potencial de trabalho e do fluxo da solução.

A influência do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho sobre a resposta amperométrica da L-dopa foi avaliada aplicando diferentes potenciais entre 0,4 e 0,9 V (vs. Au) sob um fluxo constante de $12,1 \text{ mL min}^{-1}$. Para cada potencial aplicado foram feitas sucessivas adições de $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa. A Figura 30 apresenta os resultados obtidos.

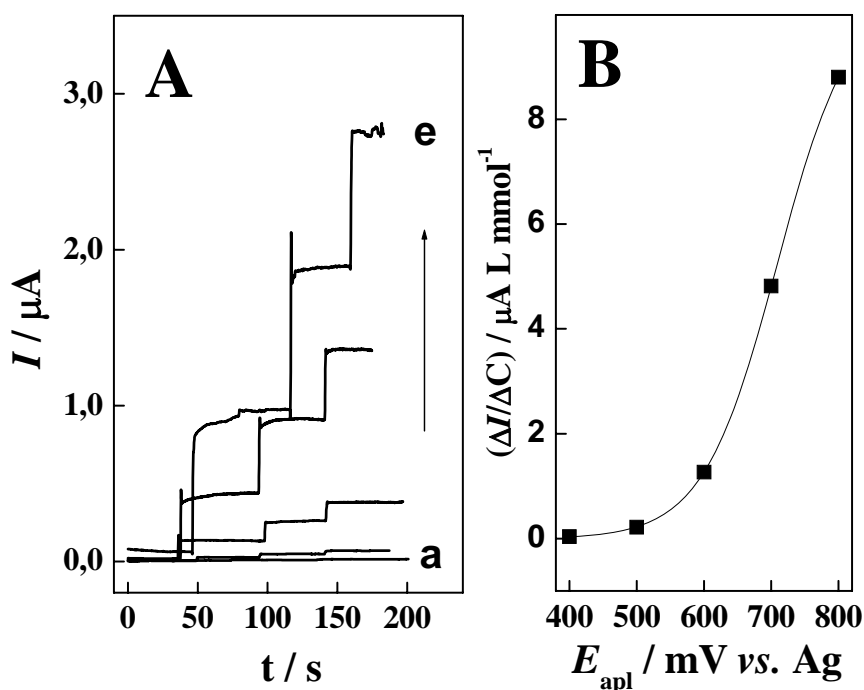


Figura 30: Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica (A) e variação da sensibilidade amperométrica em função do potencial (B) obtidas para a oxidação de $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 3,0 para potenciais de: (a) 400, (b) 500, (c) 600, (d) 700 e (e) 800 mV.

Foi observado um aumento na sensibilidade com o aumento do potencial até 800 mV (vs. Ag), o qual foi adotado nas medidas posteriores. Valores de potencial superiores a 800 mV não forneceram linhas de base estáveis, provavelmente devido à oxidação da superfície eletródica. Em valores menores de potencial não foi observado um aumento significativo da corrente com a adição do analito.

O efeito da vazão da solução sobre a resposta amperométrica do eletrodo impresso foi estudado entre $3,5$ e $16,2 \text{ mL min}^{-1}$ utilizando uma solução contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa. Os resultados estão apresentados na Figura 31.

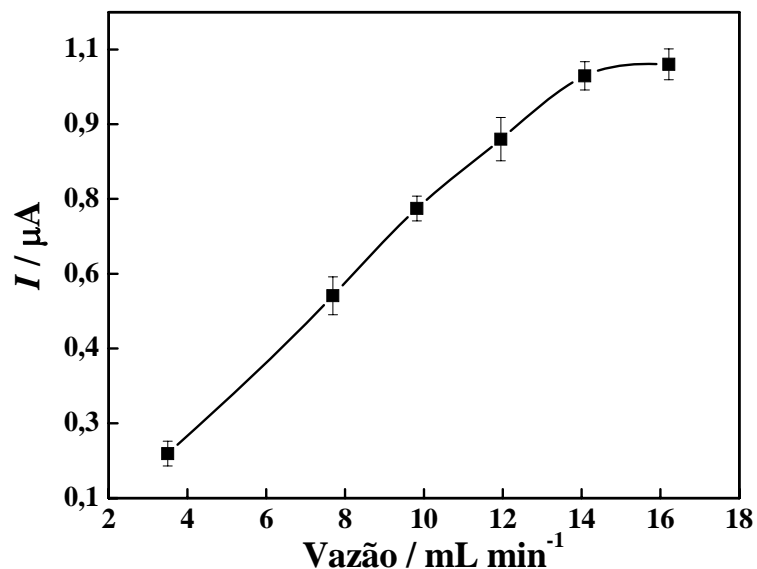


Figura 31: Influência da vazão sobre a resposta amperométrica do eletrodo impresso de ouro para a oxidação de L-dopa $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 3,0. $E_{ap} = 800 \text{ mV}$.

Observando os resultados obtidos é possível verificar que houve um aumento na corrente de oxidação com o incremento da vazão da solução entre 3,5 e 14,1 mL min⁻¹, vazões acima desse valor o sinal permanece constante. Esse comportamento deve ser atribuído ao fato de um aumento na vazão do sistema levar a um fluxo maior na superfície eletródica, o que por sua vez promove uma diminuição da camada difusional e conseqüente aumento da corrente.

IV.3.2.1. CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Empregando as condições otimizadas, pH 3,0, $E = 0,8 \text{ V vs. Ag}$ e fluxo de 14,1 mL min⁻¹; foi construída uma curva analítica. O amperograma e a curva analítica construída estão apresentados na Figura 32.

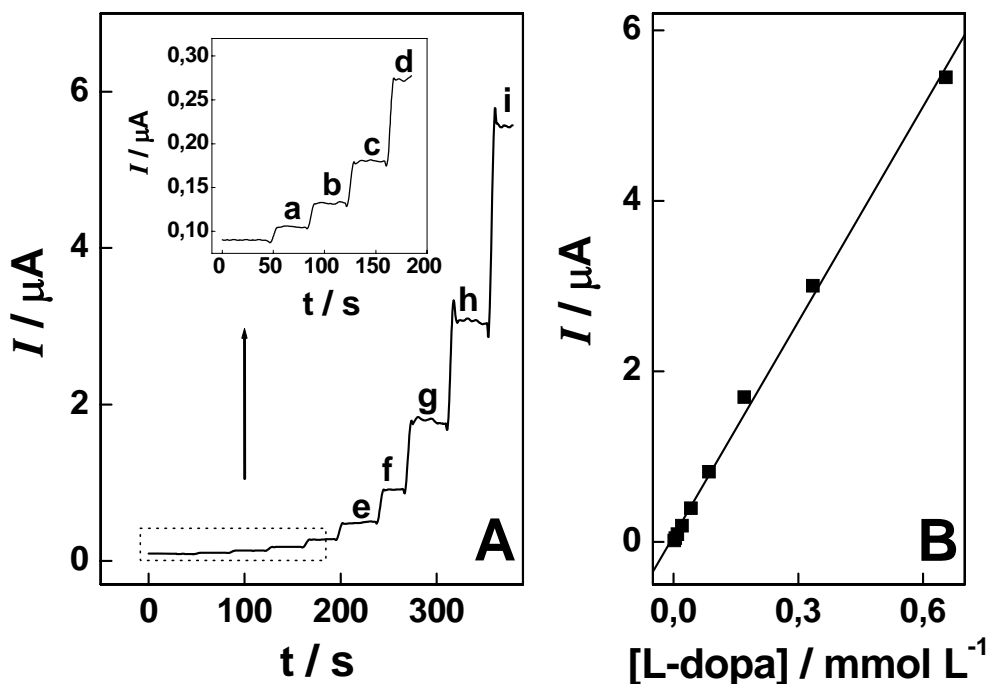


Figura 32: Resposta amperométrica (A) e curva analítica obtida para L-dopa em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 3,0$ (B), vazão = $14,1 \text{ mL min}^{-1}$. (a) $1,5 \times 10^{-6}$, (b) $4,3 \times 10^{-6}$, (c) $9,5 \times 10^{-6}$, (d) $2,0 \times 10^{-5}$, (e) $4,2 \times 10^{-5}$, (f) $8,5 \times 10^{-5}$, (g) $1,7 \times 10^{-4}$, (h) $3,4 \times 10^{-4}$, (i) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa.

O sistema exibiu uma resposta amperométrica linear no intervalo de concentração de L-dopa entre $1,5 \times 10^{-6}$ e $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, uma sensibilidade amperométrica de $8,4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ e um limite de detecção ($3 \times$ (desvio padrão do branco)/ sensibilidade) de $9,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A repetitividade da resposta amperométrica foi realizada em triplicata para o mesmo eletrodo empregando uma solução contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de L-dopa, sendo observado um desvio padrão de 3,2% para as medidas. Utilizando 3 eletrodos diferentes nas mesmas condições foi obtido um desvio padrão de 3,9% para a médias das medidas.

O método proposto foi aplicado na determinação de L-dopa em duas formulações farmacêuticas, realizadas em triplicata. A Figura 33 apresenta uma determinação realizada em uma amostra de SINEMET.

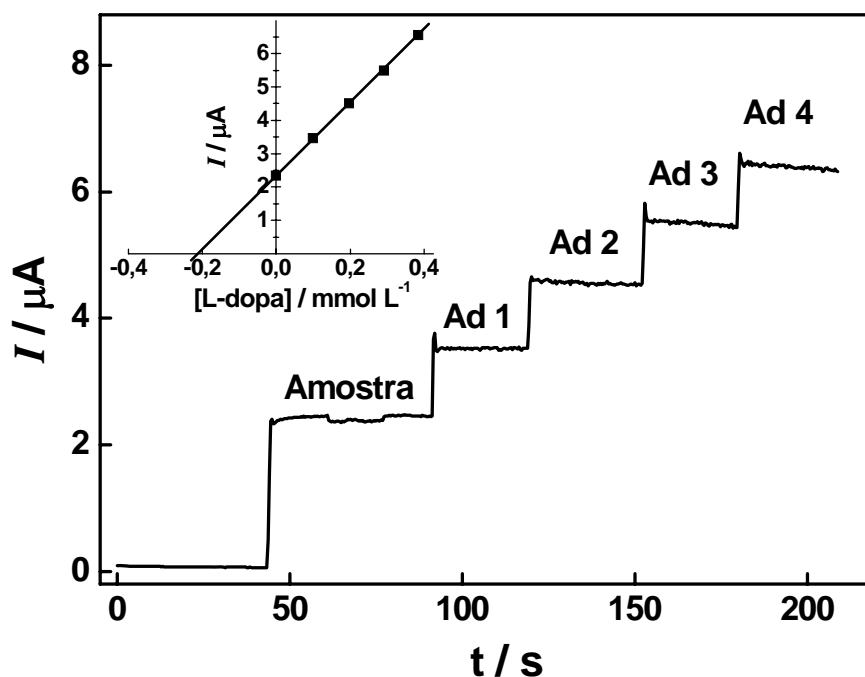


Figura 33: Resposta amperométrica e curva de adição padrão (inserida) obtida para a determinação de L-dopa na formulação farmacêutica SINEMET, $E_{ap} = 0,8 \text{ V}$; vazão = $14,1 \text{ mL min}^{-1}$.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos pelo método oficial [117] e os valores obtidos pelo método.

Tabela 6: Determinação de L-dopa em formulações farmacêuticas empregando o método proposto e o preconizado pela farmacopéia.

Amostra	Valor rotulado (mg)	L-dopa (mg/ tablete ou cápsula)		E1 (%)
		Método Oficial	Procedimento proposto	
Sinemet [®]	250	255	262	+2,7
Prolopa [®]	100	106	108	+1,9

E1 = erro relativo = procedimento amperométrico *versus* Método Oficial

Em todas as análises foram realizados teste t e teste F e os valores obtidos não excederam os valores tabelados [116] indicando uma boa concordância entre os resultados obtidos pelo método proposto e o oficial.

IV.4 - MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE OURO IMPRESSO POR FILMES DE POLI-HISTIDINA (SPGE/PH)

IV.4.1 - MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE OURO IMPRESSO PELA ADIÇÃO DIRETA DE POLI-HISTIDINA (SPGE/PH)

Paralelamente aos estudos realizados com os SPCE, foram avaliados os SPGE modificados. Para isso, um procedimento baseado na adição direta de PH na superfície eletródica foi adotado.

A resposta dos eletrodos preparados foi avaliada através do registro de voltamogramas cíclicos, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ ajustada em pH 7,0, na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de ferricianeto de potássio. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos utilizando o SPGE não modificado, nas mesmas condições experimentais. A Figura 34 apresenta os voltamogramas cíclicos para a redução do par Fe(III)/Fe(II), em KCl 0,1 mol L⁻¹, sobre eletrodos de SPGE modificados por adição direta e não recobertos.

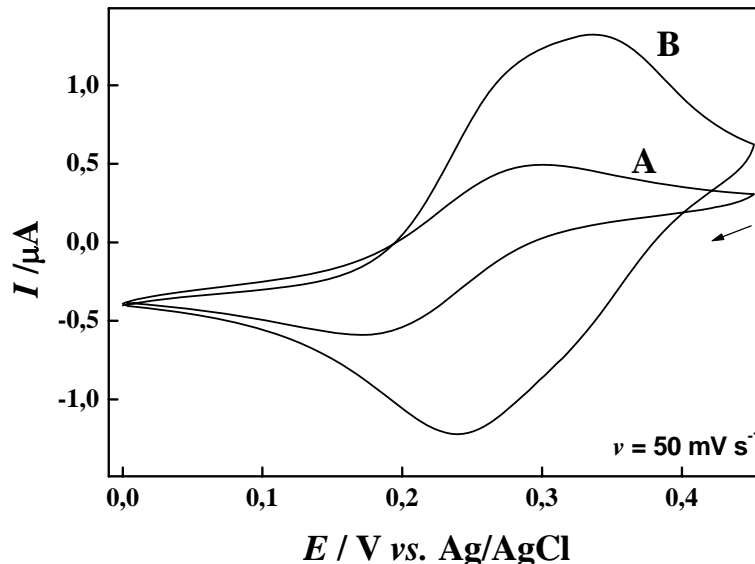


Figura 34: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (curva B).

A redução do par [Fe(CN)₆]³⁻ para [Fe(CN)₆]⁴⁻, sobre o eletrodo de ouro impresso não modificado, apresentou um pico bem definido em E_p = 0,18 V, além de um pico de oxidação na varredura reversa em 0,29 V. Este último é referente à

oxidação do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Figura 34-A). Sobre o eletrodo modificado por filmes de PH (Figura 34-B), observou-se um aumento na intensidade da corrente de pico, para ambos os processos redox, quando comparados ao eletrodo não modificado. Uma diminuição na diferença entre os potenciais de pico $E_{pa}-E_{pc}$ (120 mV para o eletrodo não modificado e 90 mV para o eletrodo modificado) também foi verificada. Um comportamento semelhante foi encontrado para outros poliaminoácidos, como poli-L-lisina [24]. Anson et al [25] verificaram que filmes de poli-L-lisina promoviam a melhor definição do sinal de oxidação do complexo $\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3^{3-}$, sobre eletrodos de carbono pirolítico. Esse efeito foi atribuído a facilidade de transferência eletrônica. A existência de um excesso de cargas positivas na camada do poliaminoácido, devido à presença dos grupamentos amínicos protonados da poli-L-lisina, promovia a atração eletrostática de íons carregados negativamente. A conseqüente incorporação do analito ao filme modificador, permitia sua em estado adsorvido à superfície eletródica e melhorava a transferência eletrônica entre as espécies incorporadas e o eletrodo.

Visando testar a retenção das espécies de ferricianeto no filme de PH, medidas ciclo voltamétricas foram realizadas, comparando o desempenho de carregamento do analito na superfície, através da transferência do eletrodo submetido à pré-concentração para uma solução de eletrólito de suporte. Os eletrodos de SPGE não modificado e modificados, foram deixados na solução de ferricianeto durante 1 min. Em seguida, foram lavados com eletrólito suporte e submetidos a condições de voltametria cíclica, em solução contendo apenas o eletrólito suporte. Os voltamogramas obtidos para o eletrodo não modificado não apresentaram processos redox, quando ciclados entre 0,45 V e 0,0 V (vs. Ag/AgCl). Isso sugere que não existe a incorporação de ferricianeto na superfície do eletrodo de ouro não modificado. Em contraste, o SPGE modificado pela adição direta de PH, apresentou um comportamento muito diferente, o qual pode ser verificado na Figura 35.

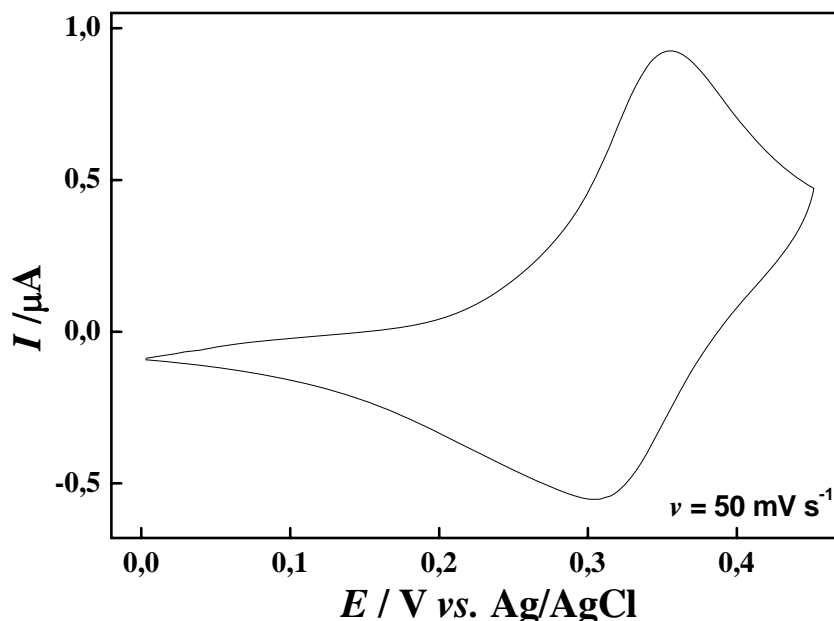


Figura 35: Voltamograma cíclico obtido para o SPGE modificado pela adição direta de PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Como pode ser verificado, ambos os sinais atribuídos ao par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ são observados com excelente repetitividade. Estes resultados suportam a existência da incorporação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no interior do filme de PH, o qual é retido na superfície. Analisando os valores de pKa, descritos na literatura para o aminoácido histidina [40], verifica-se que este apresenta três sítios que possuem equilíbrios envolvendo prótons, o grupo $\alpha\text{-COOH}$ ($\text{pKa}_1 = 1,8$), o grupo imidazol ($\text{pKa}_2 = 6,0$), e o grupo NH_2 ($\text{pKa}_3 = 9,2$), onde o grupo imidazol é maioria na molécula polimerizada de PH, que apresenta pKa de 6,0. Isto indica que os grupamentos imidazóis presentes no poliaminoácido permanecem protonados, até concentrações de H^+ próximas ao pH neutro, conferindo ao filme um excesso de carga positiva, que é responsável pela incorporação das espécies carregadas negativamente, como o ânion ferricianeto.

A Figura 36 apresenta a estabilidade da resposta voltamétrica, após a primeira varredura realizada em eletrólito suporte, sem mudança do filme ou lavagem do filme entre as medidas.

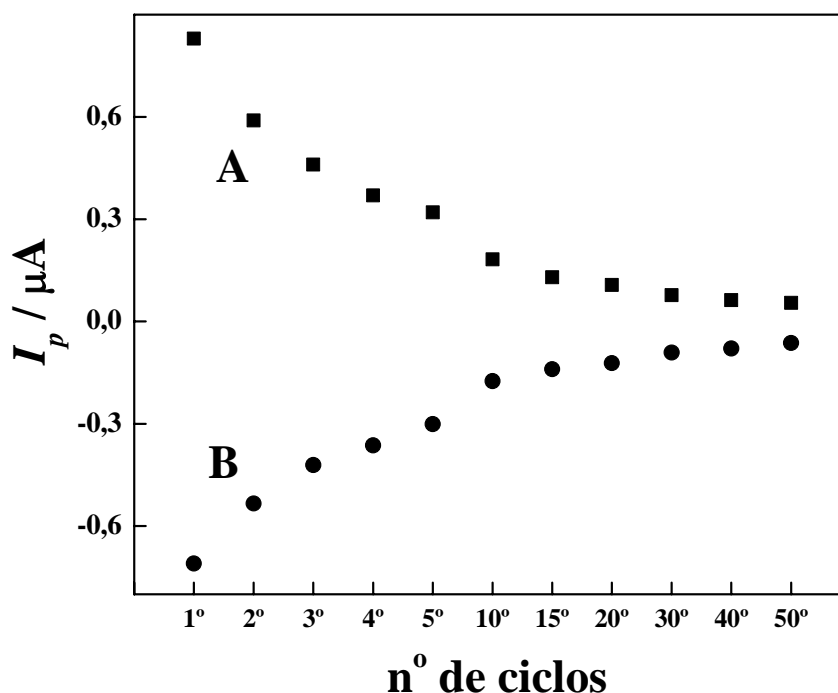


Figura 36: Variação da corrente de pico, anódica (A) e catódica (B), obtida para o SPGE/PH, em função do número de ciclos realizados.

As varreduras cíclicas de potencial, realizadas consecutivamente em eletrólito suporte (Figura 36), revelaram que existe uma diminuição nas intensidades das correntes de pico, para ambos os processos observados, com um sinal voltamétrico desprezível após 50 ciclos. Esses resultados sugerem que provavelmente durante as varreduras existe uma lixiviação sucessiva do material incorporado ao filme polimérico para o interior da solução ou a perda do próprio filme. Para investigar este comportamento, o eletrodo de SPGE/PH foi lavado e novamente submetido a condições de voltametria cíclica, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, ajustada em pH 7,0, contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de ferricianeto de potássio. O voltamograma cíclico foi registrado e comparado ao eletrodo sem modificação, nas mesmas condições experimentais, conforme pode ser visualizado na Figura 37.

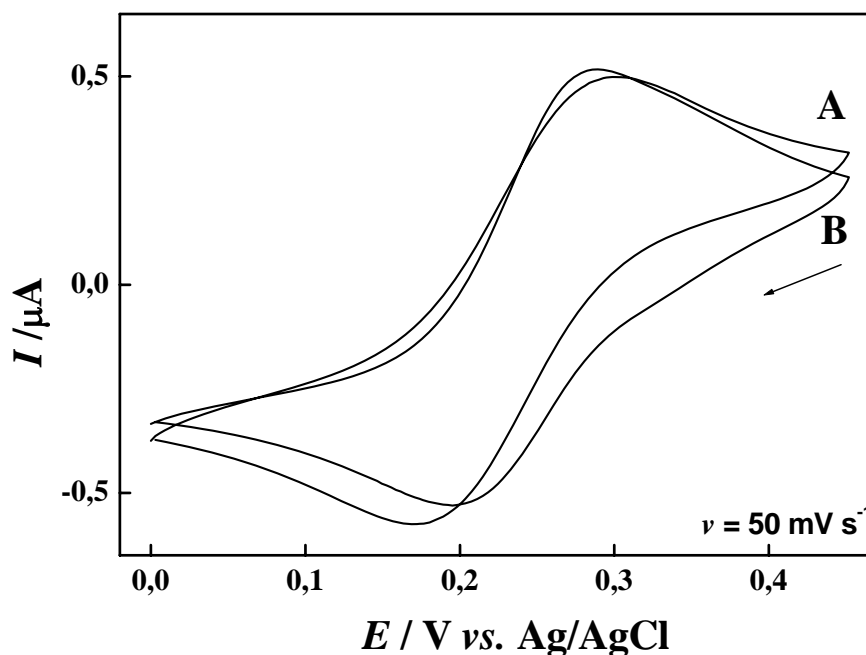


Figura 37: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (curva B).

Diferente do comportamento reportado na Figura 34, a Curva B indica que o voltamograma obtido para o SPGE/PH, após ter sido ciclado em solução de ferricianeto de potássio, lavado, ciclado em solução de eletrólito suporte e novamente ciclado em solução contendo ferricianeto, foi semelhante ao obtido para o SPGE não modificado. Isso demonstra que o SPGE/PH não apresenta estabilidade suficiente para ser utilizado repetidamente, uma vez que não se observa apenas a lixiviação do analito, mas também a perda do próprio filme modificador. Baseado nisso, pode-se concluir que o filme de PH não apresenta uma boa aderência sobre o eletrodo de ouro impresso, utilizando o procedimento de adição direta do poliaminoácido sobre a superfície eletródica.

IV.4.2- MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE OURO IMPRESSO POR FILMES DE POLI-L-HISTIDINA UTILIZANDO O ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO (SPGE/MPA-PH).

Considerando que a modificação de eletrodos de ouro impresso pela adição direta de uma solução de PH comercial não oferece a formação de um filme estável, optou-se a seguir a construção do eletrodo modificado com PH utilizando-se o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), como agente ancorante.

O MPA possui um grupamento tiol em uma extremidade, o qual é suficientemente hábil para se ligar covalentemente à superfície de ouro, esse tipo de modificação é baseada na formação de uma monocamada auto-organizada, no caso do MPA, a ligação à superfície de ouro disponibiliza o grupo carbonílico na outra extremidade da molécula, como apresentado no Figura 38.

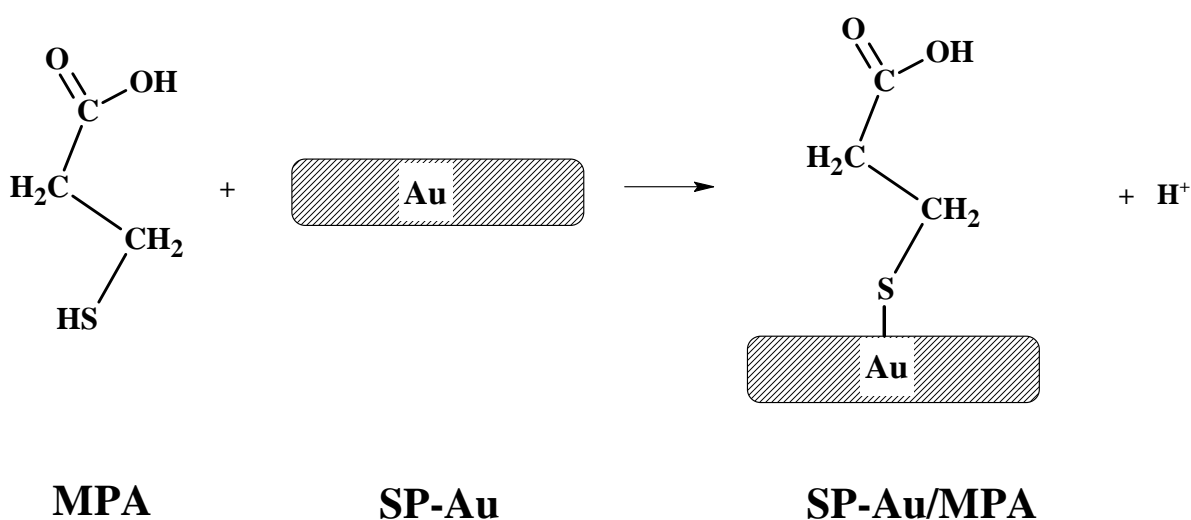


Figura 38: Representação esquemática da modificação de um eletrodo de ouro impresso (SPGE) por uma monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA).

O grupo carbonílico apresenta um pKa de 5,5, ou seja, para valores de pH maiores existe um aumento no grau de ionização do MPA, o que confere um excesso de carga negativa à superfície eletródica, como mostrado no Figura 39. Neste caso, poderia ser uma boa estratégia para tentar colocar espécies como a poli-histidina (PH) sobre o ouro.

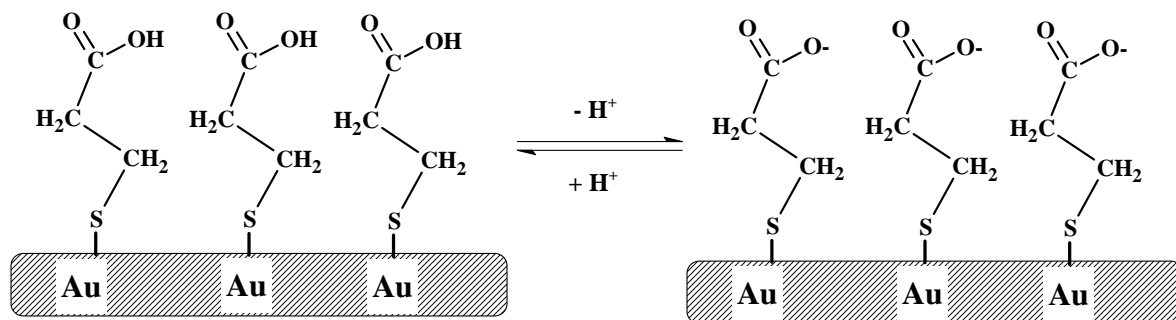


Figura 39: Representação da ionização do MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro impresso.

A avaliação do eletrodo seguiu a mesma metodologia adotada para verificar o caso anterior, porém, neste caso o SPGE contendo MPA foi avaliado primeiramente sem PH e com PH além da comparação com o eletrodo não modificado. A Figura 40 apresenta os voltamogramas obtidos para estes estudos.

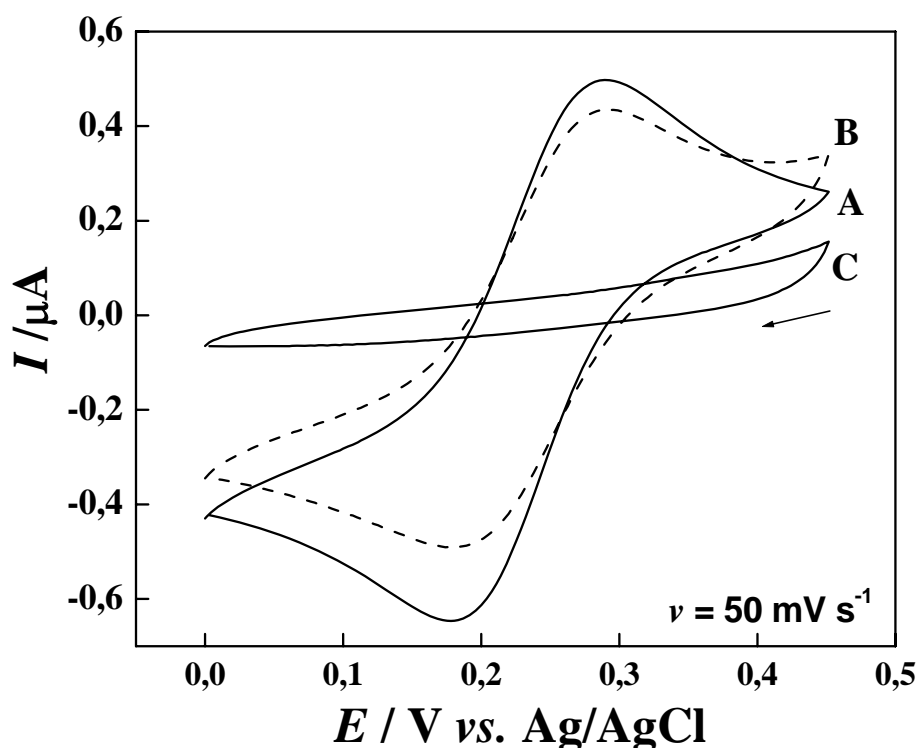


Figura 40: Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPGE não modificado (curva A), modificado com MPA (curva B) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, e para o SPGE modificado com MPA em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) após ciclado na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

O voltamograma cíclico obtido para o SPGE/MPA (Curva B) em solução contendo ferricianeto apresenta um comportamento semelhante ao observado para o SPGE não modificado (Curva A), entretanto, as correntes observadas para processos eletrodícos são menores, isso provavelmente deve estar relacionado ao fato de que nessa condição de pH o MPA encontra-se ionizado, o que pode exercer influência sobre os sinais observados para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A curva C mostra que se o eletrodo de SPGE/MPA, é colocado em solução contendo ferricianeto de potássio, lavado e transferido para uma célula contendo apenas o eletrólito suporte, quando posteriormente submetido a uma varredura cíclica de potencial (Curva C), não apresenta nenhum processo redox no intervalo avaliado. Estes resultados indicam o eletrodo SPGE modificado por MPA não permite a incorporação dos ânions ferricianeto à superfície do eletrodo.

A seguir foi construído um eletrodo de ouro impresso contendo MPA e também poli-histidina e submetido às mesmas condições experimentais. A Figura 41 apresenta os voltamogramas obtidos para redução de ferricianeto sobre o eletrodo de SPGE não modificado (A) e modificado (SPGE/MPA-PH) (B).

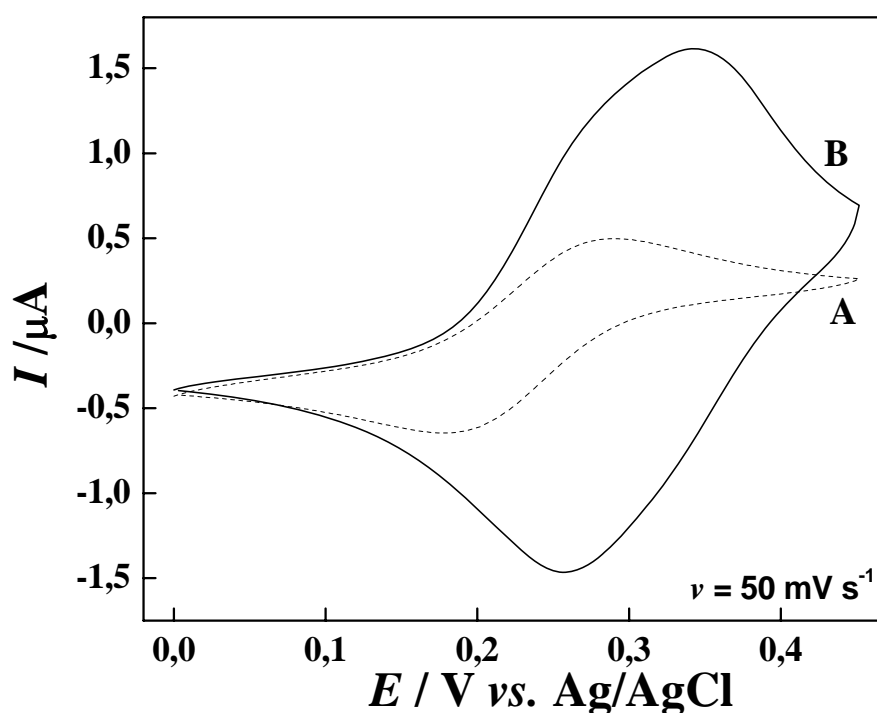


Figura 41: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (SPGE/MPA-PH) (curva B).

Para o SPGE/MPA-PH (Curva B) foi observado um comportamento voltamétrico muito semelhante ao verificado para o eletrodo de ouro impresso modificado pela adição direta da poli-histidina (SPGE/PH), ou seja, a modificação com o filme de PH aumenta a intensidade dos picos voltamétricos. E esse comportamento deve ter provavelmente o mesmo fundamento supracitado para o caso do SPGE/PH.

Depois de realizadas as medidas em solução de ferricianeto de potássio o eletrodo foi lavado, transferido para uma solução contendo apenas eletrólito suporte e submetido a ciclagem sucessivas de potencial, cujo voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 42.

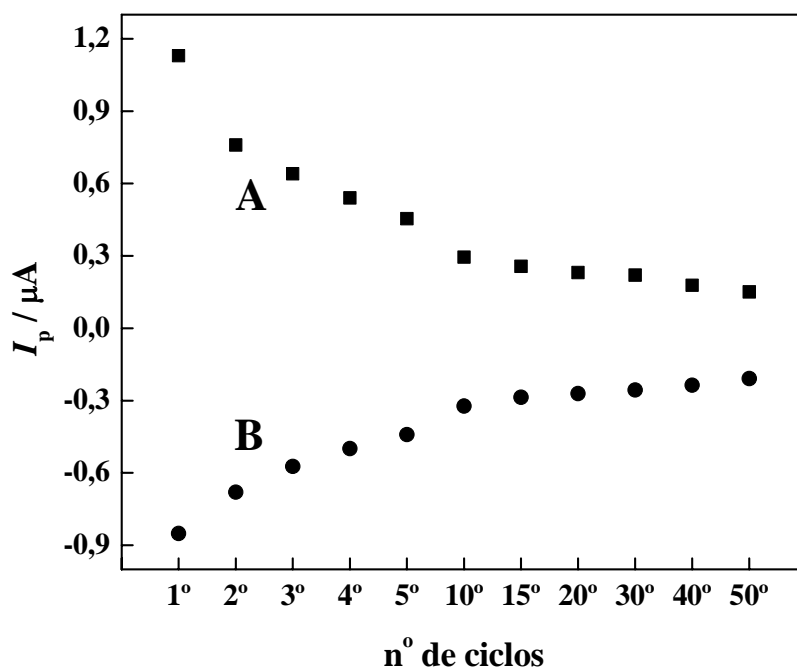


Figura 42: Variação da corrente de pico, anódica (A) e catódica (B), obtida para o SPGE/PH em função do número de ciclos realizados para o SPGE/MPA-PH.

Como pode ser observado pelos voltamogramas cíclicos, o SPGE/MPA-PH apresenta picos bem definidos para o processo redox do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, porém, esses sinais diminuem a medida que aumentam o número de ciclos, sugerindo que existe uma perda dos ânions incorporados no filme de PH. Para testar se existe apenas a perda do material incorporado no filme polimérico ou a perda do

filme de PH, o eletrodo novamente foi lavado, e transferido para uma solução contendo ferricianeto de potássio e submetido a ciclagem em eletrólito após incorporação do analito. A Figura 43 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para redução de ferricianeto sobre eletrodo de SPGE/MPA-PH na primeira varredura e após novo carregamento do analito.

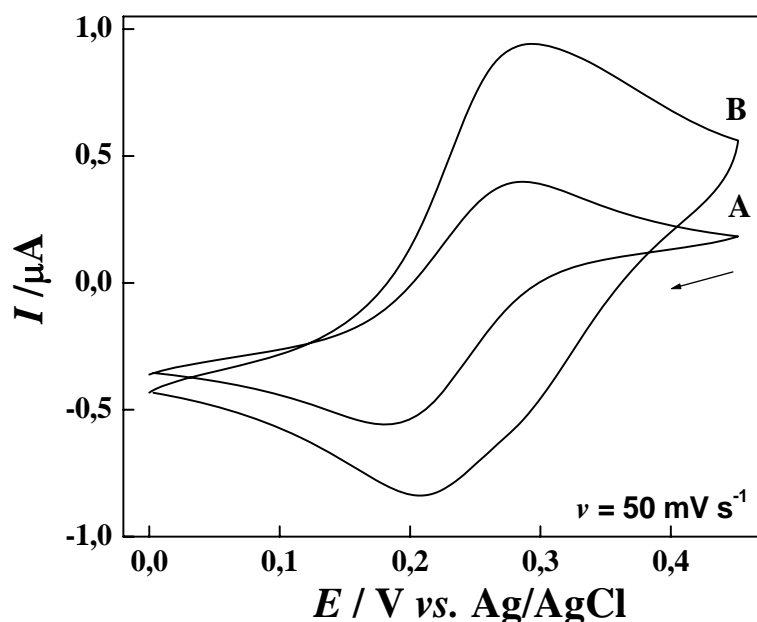


Figura 43: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ para os SPGE não modificado (curva A) e modificado (SPGE/MPA-PH) (curva B).

Os voltamogramas cíclicos obtidos para a redução de ferricianeto de potássio com o SPGE/MPA (curva B) após ter sido lavado e ciclado em solução de eletrólito suporte, apresenta um perfil voltamétrico muito semelhante ao obtido na primeira varredura. Estes resultados sugerem que o filme de PH usando MPA como agente ancorante não é perdido durante a ciclagem do material e pode ser usado para pré-concentração do analito novamente. Estes resultados indicam que o filme de PH presente no eletrodo dever estar “ancorado” eletrostaticamente ao ácido-3-mercaptopropiônico.

Estudos realizados com cinco eletrodos diferentes apresentaram um comportamento muito semelhante com desvio padrão de 6,0 %, o que reforça a proposta de funcionamento do agente ancorante. Com isso pode-se concluir que a melhor forma de modificação do eletrodo de ouro impresso por filmes de PH foi o

procedimento de modificação adotado para os demais estudos realizados com o eletrodo modificado que é a modificação SPGE/MPA-PH.

Estudos foram realizados visando verificar qual o influência do pH na resposta voltamétrica do eletrodo modificado, para isso, os SPGE não modificados e modificados com filmes de MPA-PH foram imersos por 1 minuto em solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio ajustada em diferentes valores de pH. A Figura 44 apresenta os voltamogramas obtidos utilizando os SPGE não modificados e modificados (SPGE/MPA-PH).

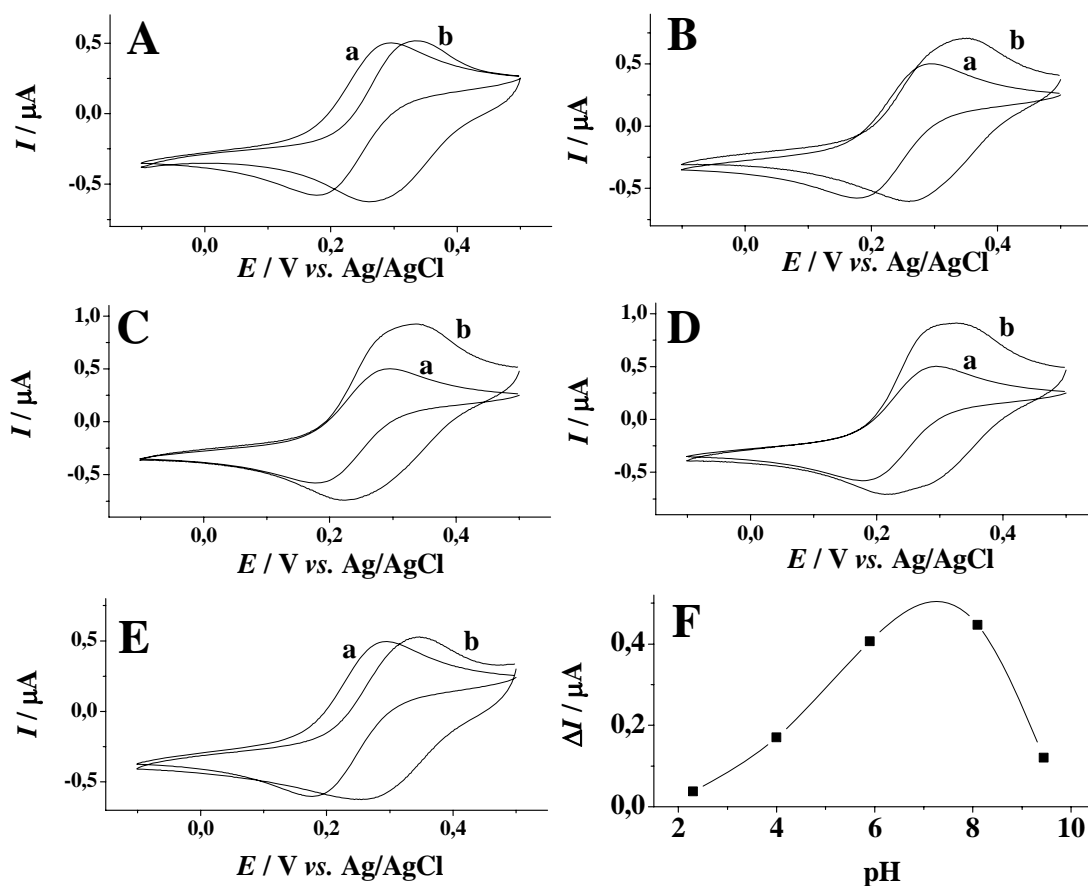


Figura 44: Voltamogramas cíclicos obtidos a 50 mV s^{-1} com SPGE não modificados (a) e SPGE/MPA-PH (b) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ajustada em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio ajustada em diferentes valores de pH: 2,3 (A), 4,0 (B), 5,9 (C), 8,1 (D) e 9,4 (E). A diferença de corrente obtida para os SPGE/MPA-PH em função do pH da solução (F).

Com base nos resultados obtidos é possível verificar que existe uma faixa de pH entre 6,0 e 8,0 onde o eletrodo modificado apresenta uma maior potencialidade na resposta voltamétrica observada para o par redox Ferri/Ferro.

Esses resultados podem ser suportados pelos valores de pKa do MPA e da PH. O MPA apresenta um pKa de 5,5, ou seja, existe uma diminuição dos grupos ionizados do MPA para valores de pH menores, esse fato por sua vez diminui a quantidade de cargas negativas presentes na superfície eletródica (Figura 45), o que prejudica a interação eletrostática entre o MPA e a PH afetando diretamente a eficiência do MPA na aderência do filme de PH. Por outro lado, valores de pH maiores que 8,0 podem fazer com que os grupos imidazólicos (pKa 6,0 para o monômero) presentes na PH percam o H⁺ tornando-se espécies não carregadas (Figura 45), e embora o MPA apresente cargas negativas nessa região de pH, a ineficiência na aderência do filme pode ser atribuída a desprotonação da poli-histidina. Portanto dessa forma, pode-se considerar que a faixa de pH adequada para a utilização do SPGE/MPA-PH encontra-se entre pH 6,0 e 8,0.

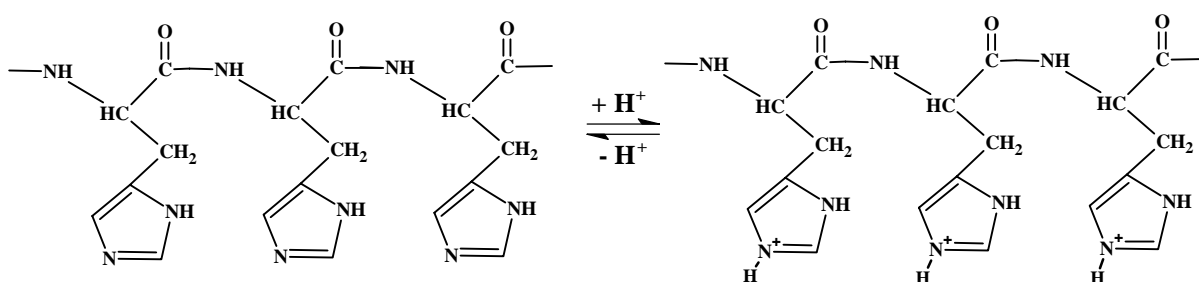


Figura 45: Representação da ionização da poli-histidina.

Verificando os resultados obtidos é possível concluir que a melhor forma de modificação do eletrodo de ouro impresso por filmes de PH é utilizando o MPA em uma faixa de pH entre 6,0 e 8,0.

IV. 5- MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO POR FILMES DE POLI-HISTIDINA

IV.5.1- CARACTERÍSTICAS DO SPCE NÃO MODIFICADO

Previamente a modificação dos eletrodos de carbono impressos (SPCE) investigou-se a resposta voltamétrica do ferricianeto de potássio como composto modelo para ser usado para testar o desempenho dos filmes de PH. Os eletrodos de carbono impresso, utilizados para efetuar as medidas, consistem de um arranjo contendo três eletrodos, sobre um suporte cerâmico (parte experimental). Deve-se salientar que o eletrodo de referência empregado nesse arranjo é um eletrodo de pseudo-referência, constituído da mesma tinta de carbono usada nos demais eletrodos. Baseado nisso, voltamogramas foram registrados para comparar o comportamento do eletrodo de pseudo-referência com um eletrodo de referência convencional, a fim de conhecer a diferença de potencial apresentada entre os dois eletrodos.

Nessas medidas utilizou-se solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 5,0, contendo $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Os eletrodos de trabalho e auxiliar usados nos procedimentos foram os eletrodos impressos de carbono, porém um eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) substituiu aquele de tinta de carbono impresso empregado como eletrodo de referência. Os respectivos voltamogramas cíclicos obtidos estão mostrados na Figura 46.

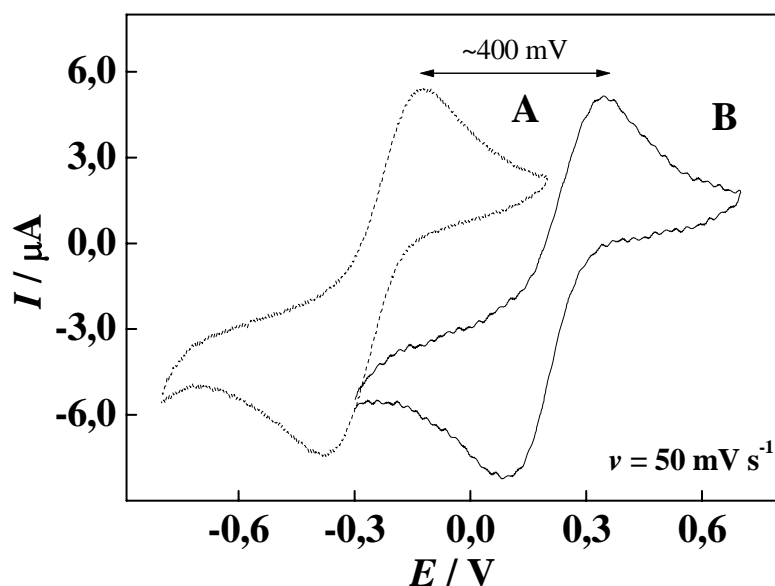


Figura 46: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl pH 5, contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, sobre eletrodos de carbono impresso, utilizando o eletrodo de pseudo-referência (curva A) e um eletrodo convencional de Ag/AgCl KCl sat. (curva B).

Observa-se nessas condições um deslocamento de aproximadamente -400 mV no voltamograma obtido com o eletrodo de carbono impresso como referência, quando comparado a um eletrodo de referência tradicional de Ag/AgCl KCl saturado. No entanto, esta diferença de potencial, nas mesmas condições experimentais, é sempre constante para diversos eletrodos, mostrando que o eletrodo de pseudo-referência pode ser usado para fins analíticos.

IV.5.2. CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS POR POLI-HISTIDINA UTILIZANDO FERRICIANETO

IV.5.2.1. MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO PELA ADIÇÃO DIRETA DE POLI-HISTIDINA

Primeiramente foi avaliada a preparação do SPCE/PH, pela adição direta de poli-histidina na superfície do eletrodo, seguida da evaporação do solvente sob duas condições: temperatura ambiente e em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, por 5 minutos. A Figura 47

apresenta os resultados obtidos para os eletrodos de carbono impresso modificados e não modificado.

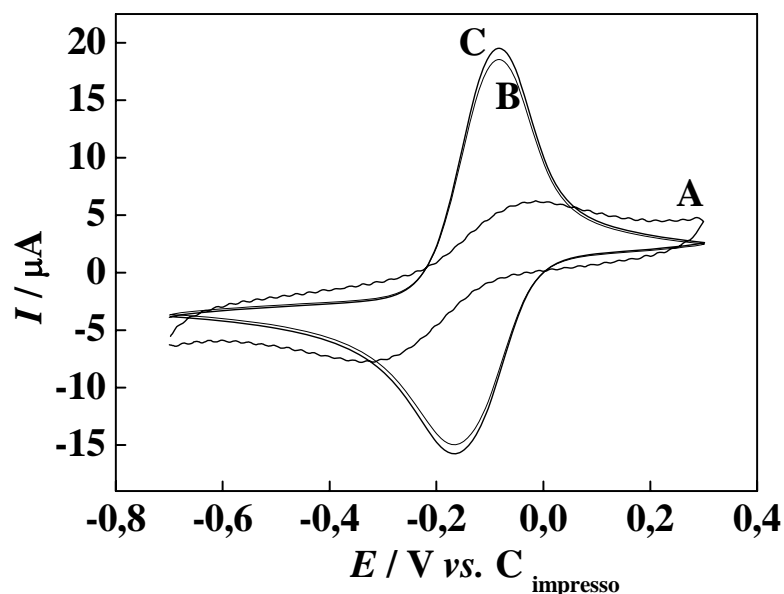


Figura 47: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl pH 5, contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], para o SPCE não modificado (curva A) e para o SPCE/PH modificado pela adição direta de poli-histidina, seco a temperatura ambiente (curva B), e em estufa a 80 °C (Curva C), $v = 50$ mVs⁻¹.

Observando a Figura 47, verifica-se para o SPCE não modificado (curva A), um par de picos redox em -0,05 V (vs. carbono impresso), referente à oxidação de ferrocianeto/ferricianeto e um pico de redução em -0,33 V (vs. carbono impresso). Em relação aos voltamogramas cíclicos obtidos para os SPCE/PH, preparados pela adição direta do polímero e evaporação do solvente, a temperatura ambiente (curva B) e em estufa (curva C), pode-se observar uma melhora significativa no sinal voltamétrico, uma vez que houve um deslocamento dos potenciais de pico para valores menos positivos e um incremento na corrente de pico, quando comparados ao eletrodo não modificado. Comparando as diferentes condições de secagem dos eletrodos, pode-se notar que apesar de haver uma melhora na corrente de pico para ambas as condições, os eletrodos preparados à temperatura ambiente apresentaram um valor ligeiramente menor que os observados para os eletrodos preparados em estufa. Em adição, observou-se que os eletrodos preparados à temperatura ambiente apresentaram uma diminuição acentuada após 4 medidas consecutivas, enquanto que os preparados em estufa demonstraram um bom

desempenho após 8 medidas consecutivas, com um desvio padrão de 6,1 % entre as medidas. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato do poli-aminoácido apresentar uma mudança na sua conformação estrutural, em função da temperatura. À temperatura ambiente, o filme polimérico apresenta uma forma enovelada denominada α -hélice; em temperaturas maiores, como a 80 °C, essa estrutura assume uma forma planar chamada de β -folha, que aparentemente apresenta uma melhor aderência à superfície eletródica [24, 25].

Comparando os resultados obtidos com o eletrodo não modificado (curva A) e com o eletrodo modificado (curvas B e C), pode-se atribuir o aumento na intensidade da corrente de pico à pré-concentração do complexo de ferro, na superfície do eletrodo modificado pelo filme. Isto ocorre possivelmente porque em valores de pH 5,0, o filme de poli-histidina apresenta o grupo imidazol protonado ($pK_a = 6,0$), assumindo uma carga positiva, o que pode proporcionar uma interação eletrostática entre o poli-aminoácido e o ferrocianeto.

Depois de verificada a melhora nos sinais voltamétricos, provavelmente devido à pré-concentração dos íons ferricianeto sobre o filme de PH presente na superfície eletródica, foram realizadas medidas para estudar a influência do tempo de pré-concentração nas correntes de pico. Voltamogramas cíclicos foram obtidos em eletrólito suporte após a imersão de 30, 60 e 300 segundos em solução de KCl pH 5 contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ferricianeto de potássio, em condições de potencial de circuito aberto estão ilustrados na Figura 48. Pode-se observar pelos resultados que não houve variações significativas nas correntes de pico, sugerindo que existe uma rápida saturação dos sítios da poli-histidina pelos íons ferricianeto.

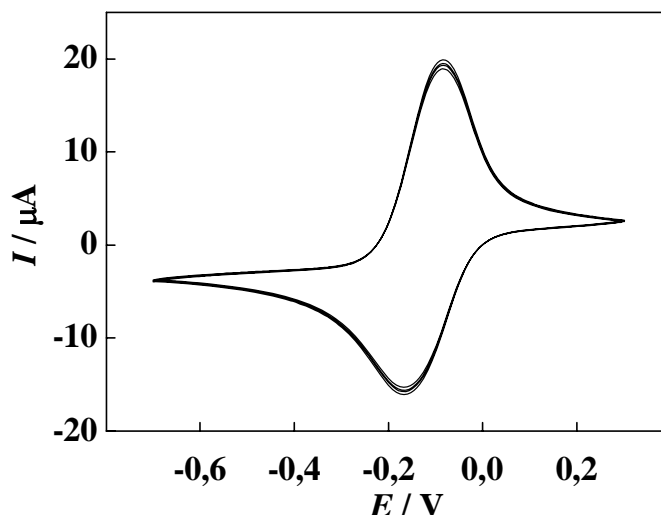


Figura 48: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE modificado pela adição direta de poli-histidina em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl pH 5 após imersão em solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio diferentes tempos de acumulação, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Após avaliado o SPCE/PH podemos concluir que o filme formado por este procedimento deva apresentar características semelhantes a outros poliaminoácidos estudados. Anson et al. [24] estudaram eletrodos formados por poli-lisina, preparados a partir de uma solução do polímero, um procedimento semelhante ao adotado para a construção dos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH. O modelo proposto por Anson é apresentado na Figura 49 [24,25].

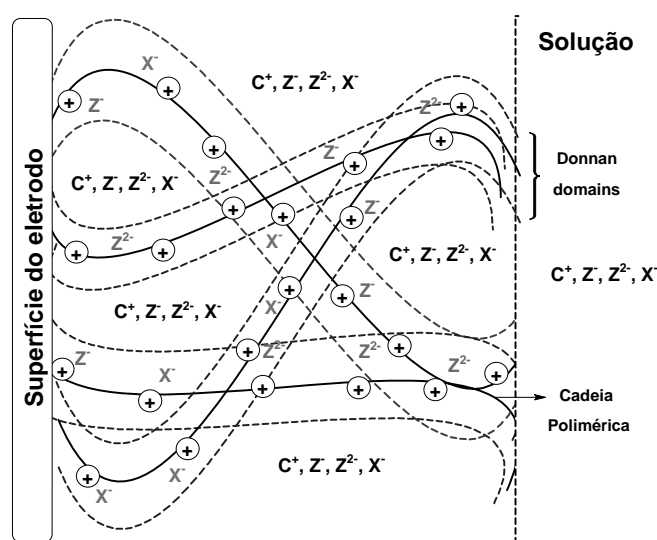
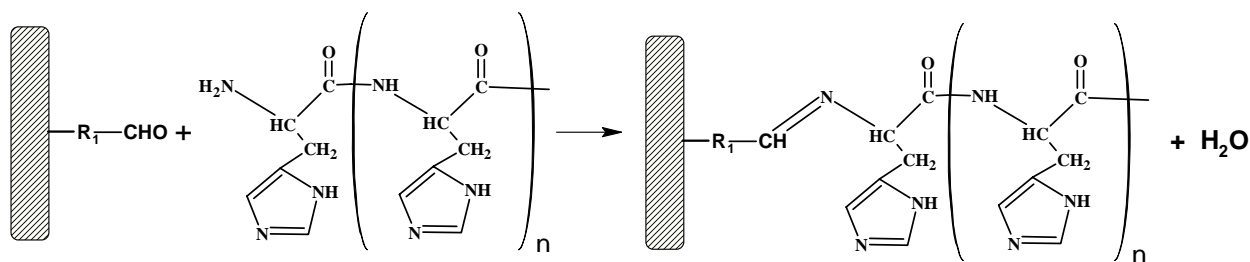


Figura 49: Modelo esquemático de um filme de polieletrólito na superfície de um eletrodo. Nesse exemplo o eletrodo está em equilíbrio em uma solução contendo um eletrólito C^+X^- não eletroativo e um par eletroativo Z/Z^{2-} [24,25].

Nesse modelo, as linhas contínuas representam as cadeias do polieletrólito que permitem a entrada da solução. As linhas pontilhadas representam uma região conhecida como “Donnan domains”, onde existe um campo eletrostático proveniente dos grupos catiônicos presentes no polieletrólito capaz de incorporar espécies carregadas com cargas negativas. O comportamento observado para os SPCE/PH e SPCE/Glu-PH apresentaram resultados muito semelhantes aos descritos na literatura para esse modelo. Assim é possível acreditar que os SPCE/PH possa ser representados por esse modelo, o qual é capaz de incorporar espécies carregadas negativamente.

IV. 5.2.2. MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO PELA ADIÇÃO DE MISTURA DE POLI-HISTIDINA E GLUTARALDEÍDO (SPCE/Glu-PH)

A adição de glutaraldeído na preparação do SPCE/Glu-PH foi também avaliada. O método de modificação é baseado na propriedade de aderência do glutaraldeído à superfície do eletrodo de carbono, deixando grupos aldeídos livres para reagir com grupos $-NH_2$ terminais presentes na poli-histidina, como sugerido pelo esquema 1:



Esquema 1: Representação da reação entre a poli-histidina e o glutaraldeído na superfície do eletrodo de carbono impresso.

Pode-se observar, pelo esquema 1, que a imobilização do poliaminoácido PH na superfície contendo o glutaraldeído deixaria os grupos imidazólicos livres, o que favorece interações com o analitos específicos.

Os eletrodos modificados foram avaliados nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Voltamogramas cíclicos obtidos para o par

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ sobre SPCE não modificado e modificado com o polímero são mostrados na Figura 50.

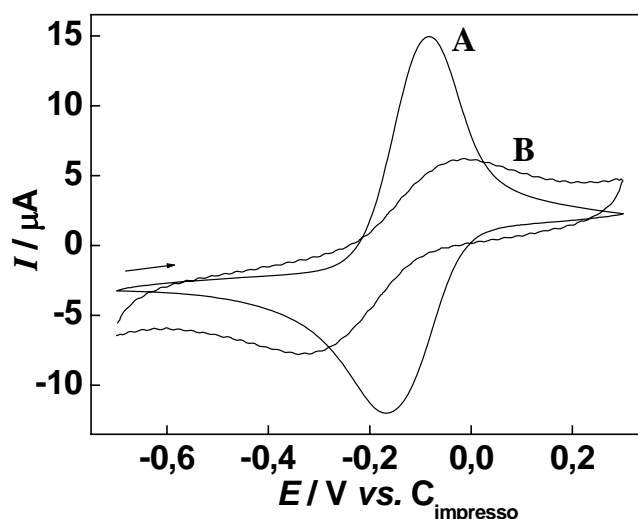


Figura 50: Voltamogramas cíclicos obtidos sobre SPCE não modificado (curva B) e SPCE/Glu-PH (curva A) modificado com a adição de glutaraldeído em solução 0,1 mol L⁻¹ de KCl, pH 5, contendo 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de ferricianeto de potássio, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O voltamograma obtido sobre o eletrodo modificado (curva A) apresentou uma diminuição na separação dos picos de corrente, quando comparado ao eletrodo não modificado (curva B). Além disso, com o eletrodo modificado, houve um aumento na intensidade da corrente de pico, em ambos os processos (oxidação e redução).

Comparando os resultados ilustrados na Figura 50, aos obtidos pela adição direta do polímero SPCE/PH (Figura 47), observa-se um comportamento muito semelhante. Os valores da intensidade de corrente, utilizando os SPCE/PH e SPCE/Glu-PH, foram respectivamente 22,1 μA e 15,8 μA , sugerindo que existe uma quantidade inferior de sítios da poli-histidina disponíveis para a pré-concentração dos íons ferricianeto, nos eletrodos recobertos por filmes de Glu-PH.

Medidas de varreduras de potencial consecutivas foram realizadas com o SPCE/Glu-PH, sendo observadas correntes de pico de oxidação com desvio padrão de 5,6% (10 medidas). Embora este valor seja menor que o obtido usando o eletrodo preparado pela adição direta do poli-aminoácido (6,1%), verifica-se uma pequena diferença entre eles. Assim, a aderência do filme de poli-histidina sobre o eletrodo de

carbono impresso, não necessita da adição de glutaraldeído, o que leva a uma simplificação do procedimento empregado.

De acordo com os resultados obtidos, o modelo para este filme formado, deve ser semelhante ao proposto para o eletrodo SPCE/PH. Porém, cabe salientar que o SPCE/Glu-PH deve diferir na região próxima ao eletrodo, pois existe o glutaraldeído como um agente ancorante, mas, esse efeito não altera o comportamento do filme como um todo, pois foi verificada que também existe a incorporação dos ânions ferricianeto.

IV.5.2.3. MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO POR FILMES DE POLI-HISTIDINA POR ELETROPOLIMERIZAÇÃO (SPCE/EPH)

A modificação do eletrodo, por eletropolimerização da histidina (oxidação do monômero), foi investigada em meio alcalino [42]. A Figura 51 apresenta os resultados obtidos durante a formação do filme, usando ciclagens voltamétricas entre -0,8 V e 2,0 V (vs. Ag/AgCl), a 100 mV s^{-1} , em solução de tampão fosfato pH 9,0.

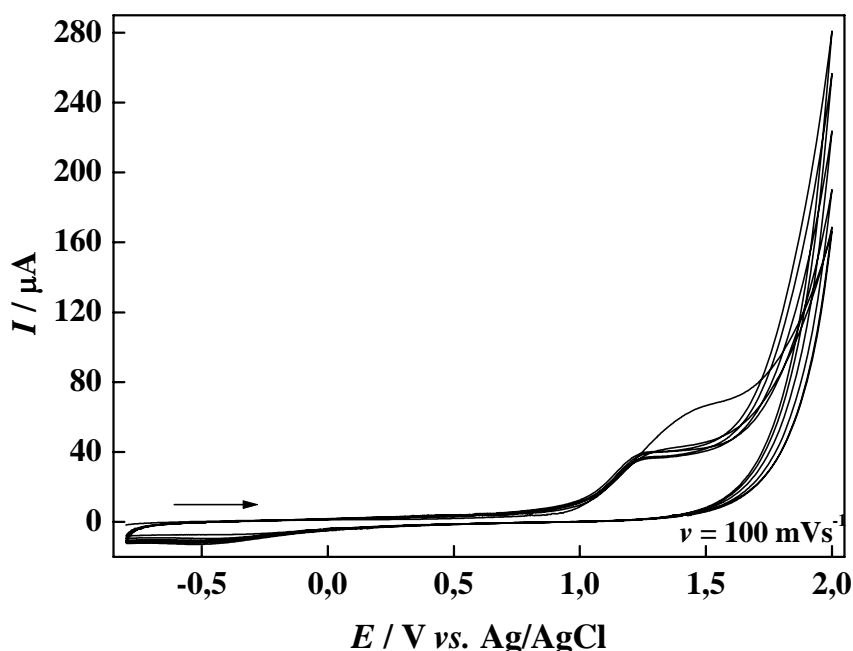


Figura 51: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato pH 9, contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de histidina, sobre SPCE, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

Cabe ressaltar que para a preparação do SPCE/PH por eletropolimerização a partir do monômero, o eletrodo de referência do circuito impresso foi substituído por um eletrodo de referência convencional de Ag/AgCl (KCl sat.), pois o eletrodo de carbono impresso pode apresentar uma variação diferente dos 400 mV observados anteriormente. No entanto, nos procedimentos posteriores adotou-se o eletrodo impresso como referência. Observando os resultados obtidos, é possível verificar um sinal de oxidação em +1,3 V referente a oxidação do grupo amina presente no monômero histidina.

Seguindo a mesma linha de avaliação empregada para os SPCE/PH e o SPCE/Glu-PH, o eletrodo construído foi avaliado na presença de ferricianeto de potássio e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 52.

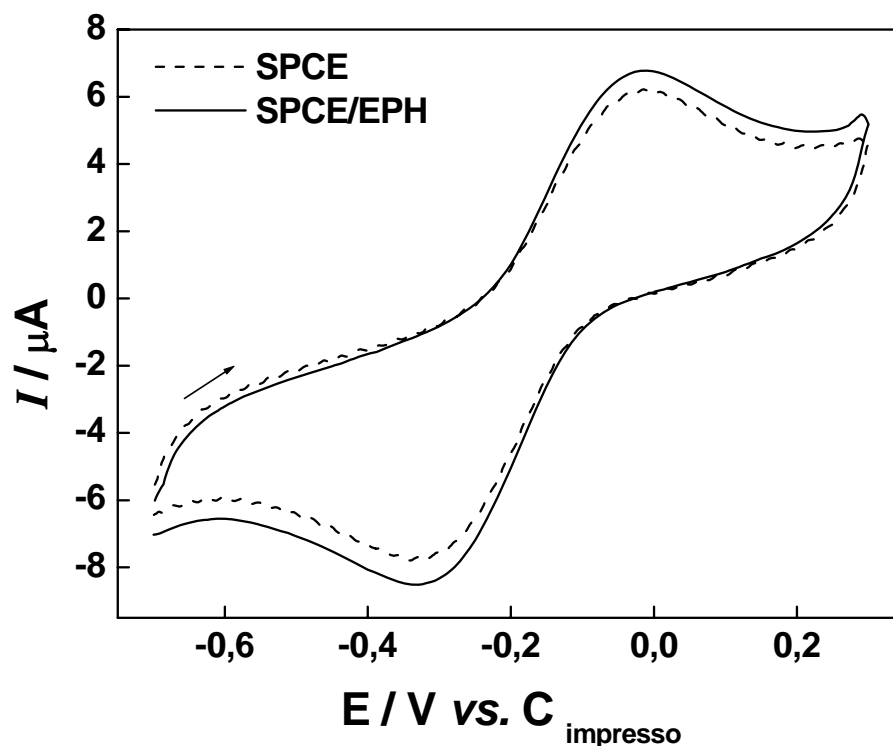


Figura 52: Voltamogramas cíclicos obtidos sobre SPCE não modificado e SPCE/EPH modificado com a adição de glutaraldeído em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, pH 5, contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Foi observado para o SPCE/EPH um comportamento voltamétrico semelhante ao obtido com o eletrodo não modificado, exceto por um pequeno

aumento nas correntes de pico anódica e catódica. Quando comparado aos eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH as correntes obtidas com o SPCE/EPH são bem menores que as observadas para os demais casos. Essa diferença entre o comportamento pode estar relacionada ao fato do eletrodo construído pela eletropolimerização da histidina ser formado por monômeros oxidados, o que leva a formação de um filme mais fino, com menos sítios disponíveis para pré-concentrar os ânions ferricianeto e com isso, apenas um pequeno aumento foi registrado. Os resultados demonstraram que o SPCE/EPH não apresentou melhora significativa nas correntes de oxidação e redução do ferricianeto de potássio, sugerindo assim, que este não é seria o modelo mais adequado para avaliar esse procedimento de modificação.

IV.5.3. CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS POR POLI-HISTIDINA UTILIZANDO ÁCIDO ASCÓRBICO

Na literatura está relatada a utilização de eletrodos modificados por poli-histidina, construídos pelo mesmo procedimento, na determinação de ácido ascórbico (AA). O eletrodo exibe uma diminuição do sobrepotencial necessário para a oxidação desse analito. A fim de verificar se as características dos eletrodos construídos, foram registrados voltamogramas cíclicos em solução de tampão fosfato na presença de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido ascórbico (AA). Como mostra a Figura 53.

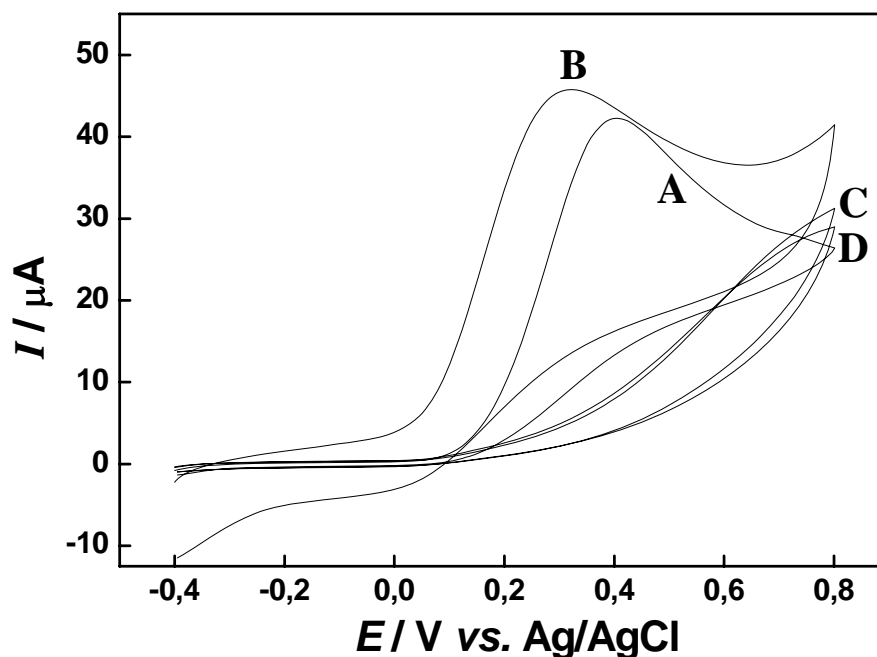


Figura 53: Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato pH = 5,0 contendo $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido ascórbico sobre diferentes eletrodos: (A) SPCE, (B) SPCE/EPH, (C) SPCE/PH e (D) SPCE/Glu-PH.

A oxidação do ácido ascórbico sobre o SPCE não modificado exibiu um máximo de corrente em +0,40 V (vs. Ag/AgCl), correspondente aos grupos hidroxilas presentes na sua estrutura. Para os SPCE/PH (curva C) e SPCE/Glu-PH (curva D) não foi observado nenhum pico de corrente, apenas um aumento sem definição em potenciais próximos a 0,8 V (vs. Ag/AgCl). Entretanto no SPCE/EPH verificou-se uma diminuição do sobrepotencial de oxidação e um pico de corrente em potencial de +0,31V com maior intensidade que no SPCE. Esse comportamento é atribuído as características dos filmes formados. Para os eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH, a construção utilizando a adição de uma solução do polímero produz um filme mais espesso com canais entre as cadeias poliméricas. O fato de o filme ser mais espesso apresenta-se como uma resistência maior para a difusão do AA até a superfície eletródica, dificultando sua oxidação. Os SPCE/EPH por serem formados por monômeros oxidados da histidina, fornecem filmes finos, e os grupos adsorvidos na superfície eletródica auxiliam a oxidação do AA. Considerando que o SPCE/EPH apresentou um efeito mais pronunciado para oxidação do AA do que para o par ferri/ferro, o AA foi escolhido como um padrão adequado para avaliar o SPCE/EPH

Medidas consecutivas para a oxidação do ácido ascórbico sobre SPCE/EPH demonstraram que o filme de poli-histidina na superfície do eletrodo apresentou boa aderência, visto que o desvio padrão foi de 4,8 %, foi obtido para corrente de pico submetida a 10 repetições.

Considerando as diferenças no comportamento voltamétrico observado para os eletrodos modificados, torna-se importante uma comparação entre eles a fim de tentar entender as características dos filmes formados.

O modelo sugerido para o SPCE/PH e para o SPCE/Glu-PH não deve ser adequado para o SPCE/EPH, visto que a formação de cadeias poliméricas, a partir da oxidação do monômero, não deve ocorrer em meio aquoso. Possivelmente, o SPCE/EPH deve possuir em sua superfície apenas uma camada formada por monômeros oxidados, o que leva a um filme mais fino e com menos sítios disponíveis para pré-concentrar espécies com carga negativa. A Figura 54 é uma tentativa de representar a superfície do SPCE/EPH.

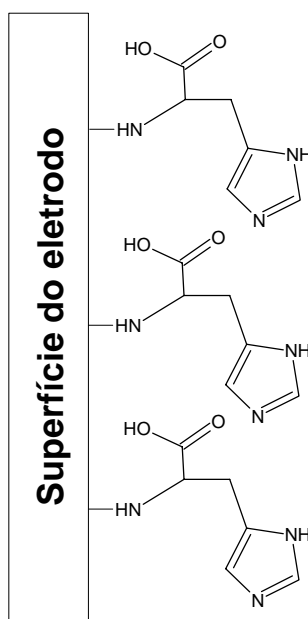


Figura 54: Representação da superfície do eletrodo SPCE construído a partir da eletropolimerização da histidina (SPCE/EPH).

Esses modelos propostos para os filmes de PH formados sobre os SPCE podem contribuir no sentido de entender a forma e as possíveis aplicações dos eletrodos modificados. Pode-se supor que os eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH que possuem filmes mais espessos, apresentam uma quantidade maior de sítios

catiônicos e funcionam bem para a incorporação de espécies com cargas negativas, como foi observado para os anions ferricianeto. Porém, com relação a efeitos eletrocatalíticos, o filme espesso atua como uma barreira para ser difundida pelo analito.

O modelo para o SPCE/EPH apresentado para esse eletrodo é proposto como sendo formado por monômeros de histidina oxidados na superfície eletródica, o que produz um filme fino e com poucos sítios disponíveis para a pré-concentração de espécies carregadas negativamente. Essa característica auxilia a entender os resultados obtidos para o comportamento voltamétrico do ferricianeto sobre este eletrodo. Por outro lado, o fato do eletrodo possuir um filme fino pode auxiliar na transferência de carga de algumas substâncias, como foi o caso do ácido ascórbico.

IV.6- APLICAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO MODIFICADOS POR FILMES DE PH NA ANÁLISE DE ISONIAZIDA

IV.6.1. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA ISONIAZIDA SOBRE SPCE NÃO MODIFICADO

O emprego de SPCE, modificados por filmes de PH, foi investigado para análise de isoniazida. Embora seu comportamento eletroquímico já tenha sido bem relatado na literatura [87, 89, 90, 93], este foi avaliado sobre eletrodos de carbono impresso, uma vez que não são encontrados relatos utilizando esse tipo de eletrodo. Posteriormente, foi estudado o efeito do filme de poli-histidina sobre a resposta voltamétrica do sistema.

A Figura 55 apresenta voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE não modificado, em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência e na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

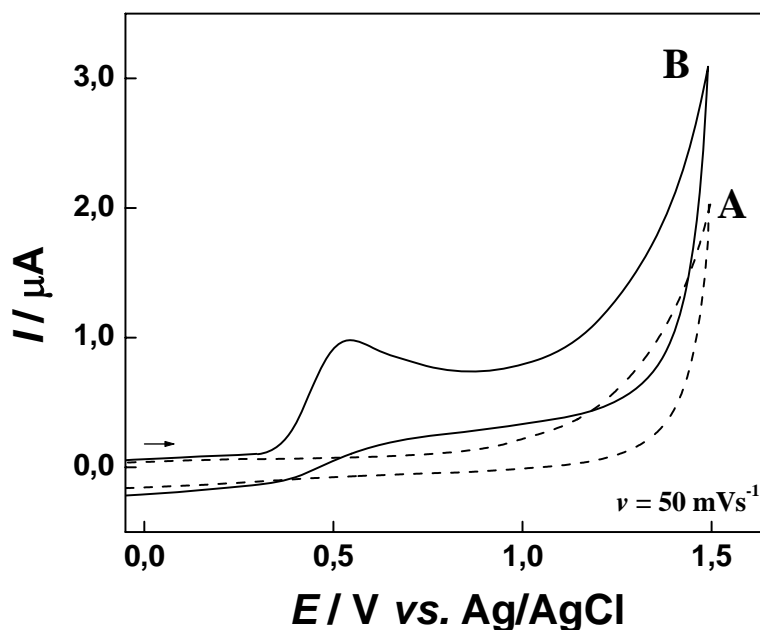


Figura 55: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência (curva A) e na presença (curva B) de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

O voltamograma cíclico obtido para a oxidação de isoniazida caracterizou-se por uma onda em + 0,51 V (vs. Ag/AgCl), sem nenhum sinal de redução na

varredura reversa. Segundo a literatura [89, 97], esse processo pode ser atribuído à oxidação da função hidrazina presente na molécula.

A redução da isoniazida também foi investigada e os voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, nas mesmas condições experimentais, estão apresentados na Figura 56.

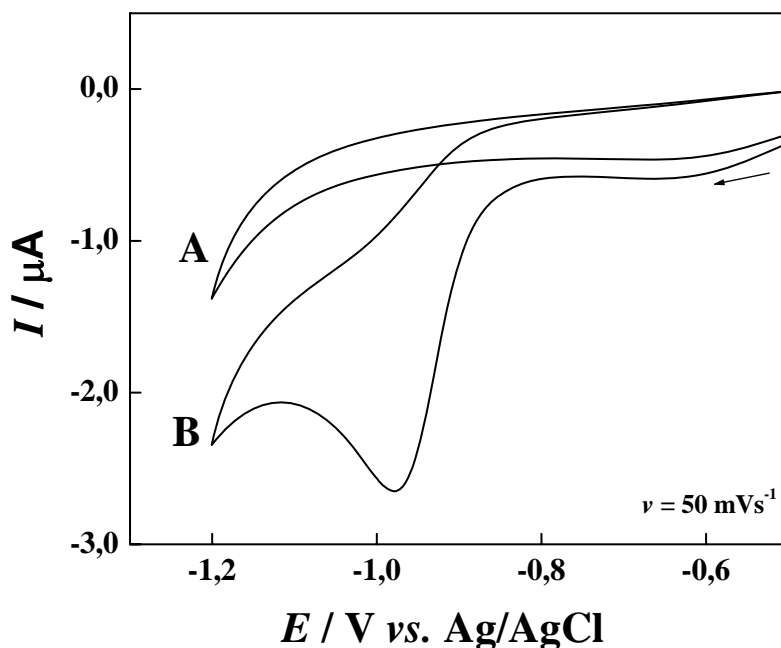


Figura 56: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência (curva A) e na presença (curva B) de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

O voltamograma cíclico obtido para redução de isoniazida caracterizou-se por um pico em $-0,98 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), sem nenhum sinal de oxidação na varredura reversa. De acordo com a literatura [87, 90, 93], essa etapa de redução pode ser atribuída à ligação C=N presente no anel piridínico da molécula de isoniazida e/ou a redução da ligação N-N do grupo hidrazina, o que leva à formação de amônia.

IV.6.2. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA ISONIAZIDA SOBRE SPCE MODIFICADO POR FILMES DE PH

Após caracterização de ambos os processos de oxidação e redução da isoniazida, sobre os SPCE não modificados, avaliou-se o desempenho dos SPCE

modificados por filmes de poli-histidina (PH). Os voltamogramas cíclicos para a oxidação de isoniazida, sobre eletrodos preparados por diferentes metodologias, estão apresentados na Figura 57.

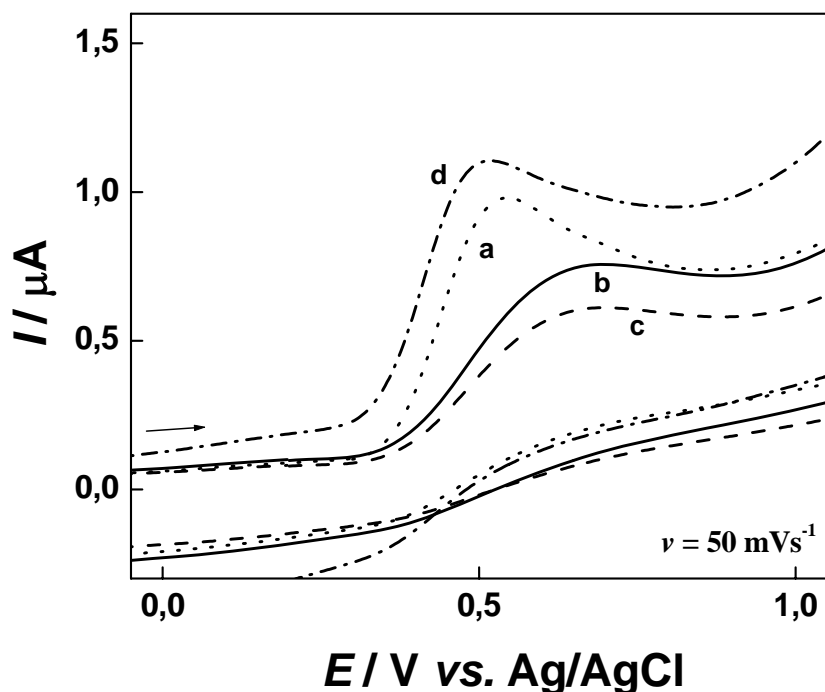


Figura 57: Voltamogramas cíclicos obtidos com os SPCE não modificado (a) e modificados SPCE/PH (b), SPCE/Glu-PH (c) e SPCE/EPH (d) em solução tampão acetato pH 5,0, na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

Como verificado previamente, enquanto no SPCE não modificado (curva a) a oxidação de isoniazida ocorreu em um potencial de +0,51 V (vs. Ag/AgCl), os voltamogramas obtidos para o SPCE/PH indicam uma leve diminuição na corrente de pico anódica e um deslocamento no potencial de pico para +0,69 V (vs. Ag/AgCl) (curva b). Para o SPCE/Glu-PH (curva c), foi observado um comportamento muito semelhante ao SPCE/PH, exceto por uma menor corrente de pico anódica. No entanto, quando se compara o eletrodo construído pela eletropolimerização do monômero (SPCE/EPH) (curva d), verifica-se um perfil voltamétrico semelhante ao do eletrodo não modificado, exceto por um pequeno deslocamento no potencial de pico para +0,50 V (vs. Ag/AgCl). Essa diferença no comportamento voltamétrico dos eletrodos modificados pode estar relacionada à quantidade de material modificador presente na superfície do eletrodo de carbono impresso, sugerindo que os eletrodos construídos pela adição direta de poli-histidina (SPCE/PH) e utilizando o

glutaraldeído (SPCE/Glu-PH) fornecem filmes mais espessos, o que dificulta a oxidação do analito. Nessas condições de pH, tanto o filme de poli-histidina ($pK_a = 6$) quanto a isoniazida ($pK_a = 11$ ($R-CO-NH_3^+$) [93]) encontram-se protonados, o que dificulta a difusão do analito até a superfície eletródica, ocasionando uma diminuição na corrente de pico e um aumento no sobrepotencial de oxidação.

No eletrodo preparado pela eletropolimerização (SPCE/EPH), filmes mais finos constituídos pelo ancoramento dos monômeros na superfície eletródica minimizam a repulsão eletrostática e, com isso, não se observa variação significativa do perfil voltamétrico, quando comparado ao eletrodo não modificado. Os estudos sobre a influência do filme modificador de poli-histidina, na resposta da oxidação de isoniazida, não demonstraram resultados promissores que justifiquem sua utilização.

A seguir, investigou-se o efeito da modificação dos eletrodos de carbono impresso (SPCE) por filmes de poli-histidina, sobre a redução da isoniazida. Voltamogramas cíclicos, obtidos nas mesmas condições experimentais utilizadas anteriormente, são apresentados na Figura 58.

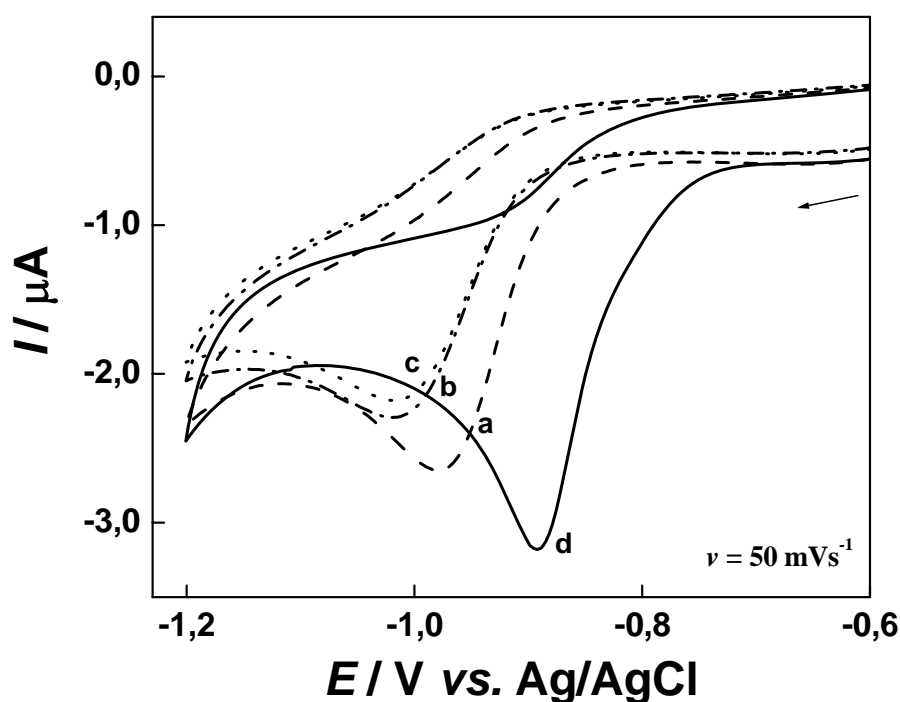


Figura 58: Voltamogramas cíclicos obtidos com os SPCE não modificado (a) e modificados SPCE/PH (b), SPCE/Glu-PH (c), SPCE/EPH (d) em solução tampão fosfato pH 5,0, na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

A redução de isoniazida em eletrodos SPCE recobertos por filmes de PH (SPCE/PH e SPCE/Glu-PH) apresentam uma variação no sobrepotencial de pico para valores mais negativos (-1,08 V(vs. Ag/AgCl)), em relação ao eletrodo não modificado e a corrente também é diminuída relativamente. No entanto, um efeito interessante é observado para o eletrodo SPCE/EPH, no qual a isoniazida é reduzida em valores menos negativos de potencial (-0,89 V (vs. Ag/AgCl)), concomitante a um relevante aumento na corrente de pico, sugerindo, assim, um efeito eletrocatalítico para este eletrodo. Dessa maneira, por apresentar menor valor de potencial e um maior valor de corrente para a redução eletroquímica da isoniazida, o eletrodo SPCE/EPH foi escolhido para a realização dos demais estudos visando o desenvolvimento de um método de análise. Esse comportamento pode ser explicado considerando-se as características dos filmes formados. Os eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH são preparados utilizando o polímero comercial, o que produz um filme mais espesso. Filmes formados por SPCE/EPH produz um filme mais fino na superfície eletródica que facilitam o alcance e a redução da isoniazida na superfície eletródica.

A influência do pH sobre a resposta voltamétrica do SPCE/EPH, para $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, foi realizada registrando-se voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato, ajustada em valores de pH entre 1,0 e 11. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 59.

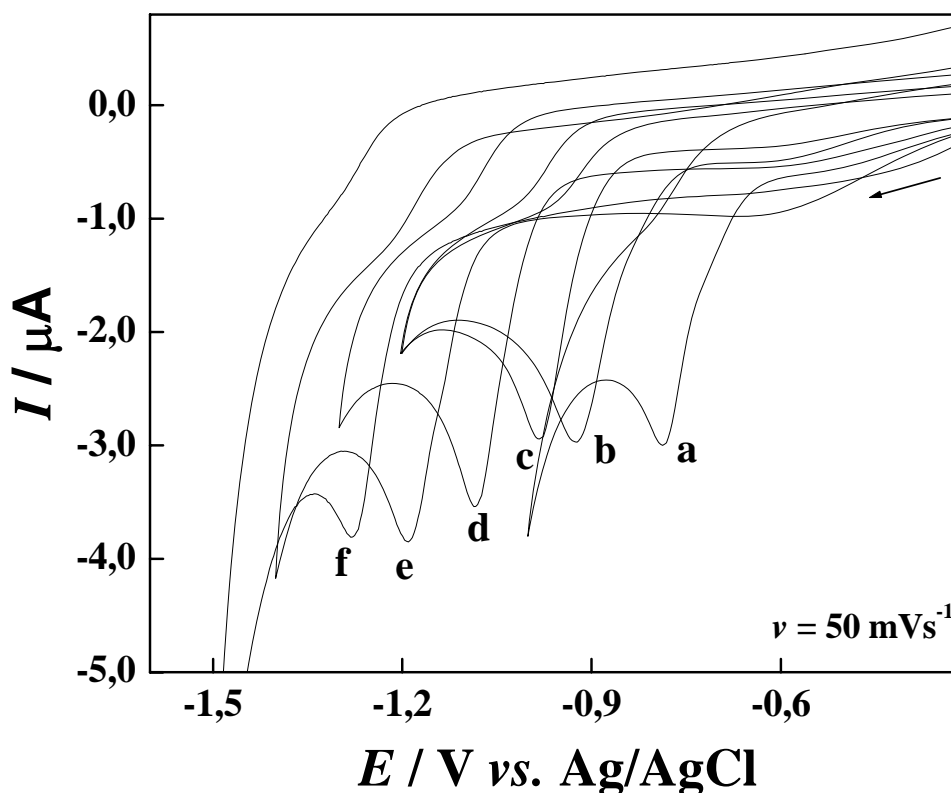


Figura 59: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SCPE/EPH, em solução tampão fosfato contendo $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 7,0 (d), 9,0 (e) e 11,0 (f).

Estes resultados indicam que o fármaco é reduzido em toda a faixa de pH 1 a 11 sobre o SPCE/EPH, porém as ondas apresentam-se melhores definidas na região de pH 5 a 7.

A representação em gráfico dos valores de potencial de pico e da corrente de pico catódica, em função do pH são mostrados na Figura 60.

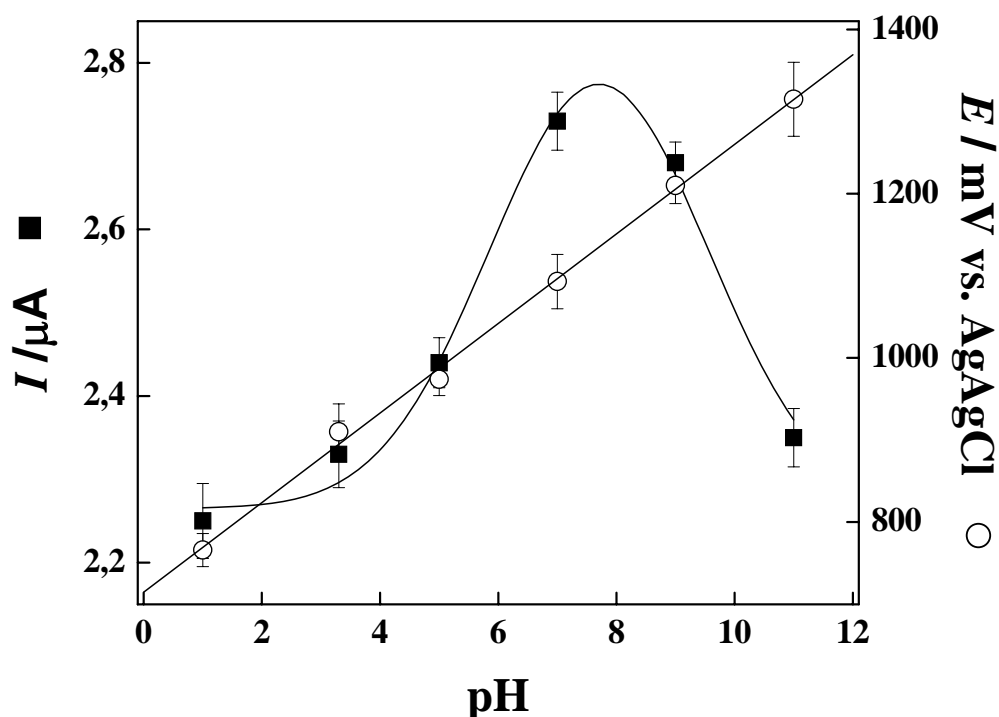


Figura 60: Variação do potencial e da corrente de pico catódica, em função do pH da solução correspondente a redução de isoniazida sobre SPCE/EPH, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os resultados obtidos mostram que o pH exerce forte influência na corrente e no potencial de pico catódico. O valor da corrente de pico apresentou um máximo em pH próximo a 7,0; em valores extremos de pH, observa-se uma ligeira diminuição da corrente de pico. Este comportamento pode estar relacionado à desprotonação da isoniazida [93] $pK_a = 11$ ou do filme de poli-histidina [40] $pK_a = 6,0$. Em valores de $\text{pH} < 5,0$, ambas as espécies estão protonadas e pode existir repulsão eletrostática entre elas, o que diminui o efeito eletrocatalítico. Na região de $6,0 < \text{pH} < 9,0$, o analito continua protonado, mas o filme de poli-histidina apresenta uma diminuição dos sítios imidazólicos protonados, o que reduz a repulsão eletrostática e conseqüentemente aumenta a corrente de pico catódica. Em $\text{pH} > 10$, tanto o analito quanto o filme de poli-histidina estão desprotonados, sugerindo que a diminuição da corrente pode estar relacionada com a desprotonação da isoniazida.

Para toda a faixa de pH investigado, o potencial de pico catódico apresentou uma variação linear, obedecendo a seguinte equação: $-E_{pc} = 722 \text{ mV} + 54 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$. A inclinação de 54 mV por unidade de pH pode fornecer um indicativo sobre o número de prótons envolvidos na etapa determinante da reação eletródica. De

acordo com a literatura, um sistema irreversível segue a relação: $\Delta E/\Delta \text{pH} = 59,1 \text{ mV} \cdot n \text{ H}^+/\alpha n$ [93], onde αn pode ser calculado a partir de $E_p - E_{p/2} = 47,7 \text{ mV}/\alpha n$ [118].

Para os voltamogramas cíclicos obtidos em $\text{pH} = 7,0$, foi observado um valor médio de $E_p - E_{p/2} = 45 \text{ mV}$, resultando em um $\alpha n = 1,06$. Assim, utilizando-se os valores de $\alpha n = 1,06$ e $\Delta E/\Delta \text{pH} = 54 \text{ mV}$, é possível deduzir que o número de prótons envolvidos no processo eletrodico é 0,97. Esse resultado concorda com o observado por Lund [87], e assim, podemos sugerir que a redução da isoniazida ocorra via a redução da ligação N-N do grupo hidrazina levando a formação de amônia. Dessa maneira, para fins analíticos, foi escolhido o valor de $\text{pH} 7,0$, visto que forneceu a melhor combinação entre corrente de pico catódica e resolução voltamétrica.

IV.6.3. MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

Na tentativa de justificar a proposta de funcionamento para o eletrodo modificado, foram realizadas medidas de impedância eletroquímica, que permite obter informações sobre aspectos capacitivos e resistivos do sistema. Assim, as medidas de impedância, para todos os eletrodos, foram realizadas em um potencial de $-0,9 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), pois se trata do menor valor de potencial onde se observou o pico de redução da isoniazida. A amplitude de potencial aplicada foi de 10 mV , em um intervalo de frequência de 10^5 a 10^{-2} Hz .

O sistema foi simulado empregando uma forma simples de um circuito elétrico. A Figura 61 apresenta o circuito equivalente empregado para todas as medidas realizadas, o qual consiste de uma resistência em série, com um capacitor paralelo a outra resistência; este circuito simples é conhecido como *circuito de Randles* [119], onde R_s representa a resistência da solução entre os eletrodos de trabalho e referência, C representa a capacitância da dupla camada elétrica formada na superfície eletrodica, R_{tc} representa a resistência à transferência de carga do analito e Z_w é a impedância de Warburg, resultante da difusão das espécies eletroativas da solução para a superfície eletrodica.

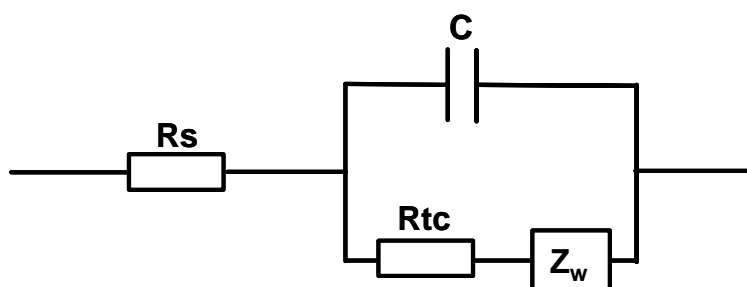


Figura 61: Circuito elétrico equivalente utilizado nas medidas de impedância eletroquímica, para os eletrodos de carbono impresso modificados e não modificados, na presença de isoniazida.

Medidas de impedância podem ser representadas graficamente de diferentes formas. Neste trabalho, optou-se por apresentar os resultados das na forma de um diagrama no plano complexo; este tipo de representação é também conhecido como diagrama de Nyquist, gráfico de Sluters ou Cole-Cole, além de outros. A Figura 62 apresenta os resultados obtidos para o eletrodo de carbono impresso não modificado, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, além de duas simulações da curva. Ambas as simulações, foram realizadas empregando o circuito supracitado, porém, diferem na parte capacitava do sistema, sendo utilizados um capacitor (C) e um elemento de fase constante (Q), para ajustar o circuito elétrico equivalente.

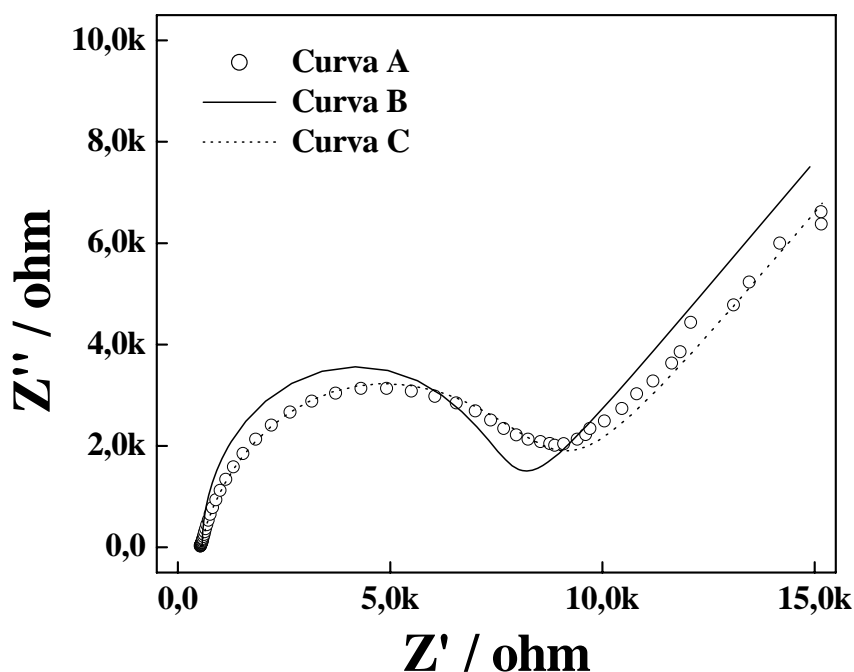


Figura 62: Gráfico de impedância no plano complexo, obtido para o eletrodo de carbono impresso não modificado, na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ de INZ, em potencial de -0,9 V (vs. Ag/AgCl) (Curva A). Simulações empregando um circuito elétrico equivalente utilizando como componentes, um capacitor (Curva B) e um elemento de fase constante (Curva C).

Observando os resultados obtidos para a medida (Curva A) e as simulações realizadas (Curvas B e C) pode-se verificar que existe uma diferença entre a aproximação das curvas. A simulação do circuito elétrico equivalente utilizando como componente um capacitor C (Curva B) não apresentou uma boa aproximação para o sistema. Este fato mostra que a utilização de um capacitor puro, para representar a superfície eletródica, não é adequada. Os resultados obtidos para a simulação utilizando o componente Q, apresentaram uma aproximação mais satisfatória, para o conjunto de pontos experimentais, sugerindo, dessa forma, que a superfície do eletrodo não apresenta um comportamento exatamente como esperado para um capacitor puro. Esse procedimento de comparação entre a utilização do capacitor C e o elemento de fase constante Q foi realizado para todos os eletrodos avaliados, sendo os resultados obtidos semelhantes ao observado para o eletrodo de carbono impresso não modificado. Assim, todos os resultados das

medidas de impedância foram obtidos utilizando o componente Q em substituição ao C, no circuito elétrico equivalente citado anteriormente.

A Figura 63 apresenta os resultados de impedância eletroquímica, realizada em potencial de -0,9 V (vs. Ag/AgCl), com uma amplitude de potencial de 10 mV, em um intervalo de frequência entre 10^5 e 10^{-2} Hz, obtidos para os eletrodos de carbono impresso não modificado e modificados por diferentes procedimentos, em solução de tampão fosfato pH 5,0, na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de isoniazida.

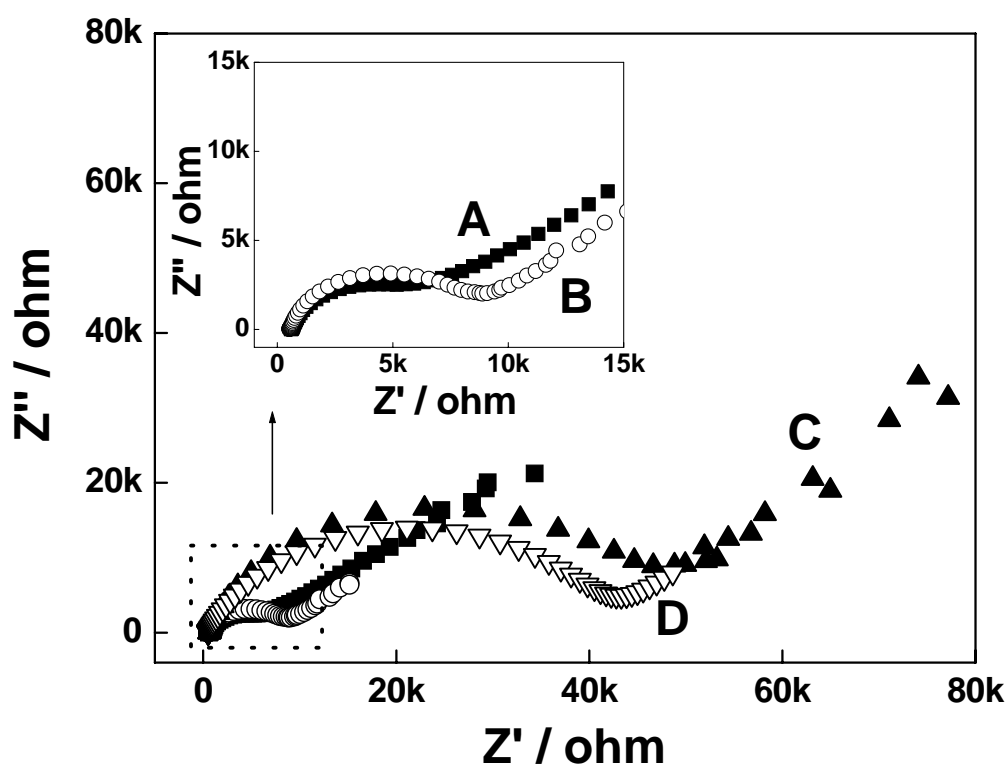


Figura 63: Gráfico de impedância no plano complexo obtido para os eletrodos de carbono impresso: não modificado (B) e modificados: pela eletropolimerização da histidina (A), pela adição direta de poli-histidina (D) e utilizando glurataldeído (C), em solução tampão acetato pH 5,0, na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de INZ, em potencial de -0,9 V (vs. Ag/AgCl).

Os resultados das medidas de impedância, para os eletrodos avaliados, apresentaram significativas diferenças no que se refere aos valores. Entretanto, o perfil deles foi muito semelhante, sendo observado, em todos os casos, um semicírculo seguido de um prolongamento linear, onde o raio do semicírculo reflete a

cinética da transferência eletrônica e a reta fornece informação sobre a difusão das espécies para a superfície eletródica.

A Curva B foi obtida para o eletrodo de carbono impresso não modificado e as curvas A, C e D da figura 63 foram obtidas para os eletrodos modificados pela eletropolimerização da histidina (Curva A), pela adição direta de poli-histidina (Curva D), e utilizando o glutaraldeído (Curva C). Os valores obtidos para a resistência à transferência de carga calculados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de resistência a transferência de carga calculada para os eletrodos de carbono impresso não modificados e modificados por filmes de PH para a redução de isoniazida.

Eletrodo	Resistência (R) / kohm
SPCE	8,07
SPCE/PH	41,2
SPCE/Glu-PH	47,5
SPCE/EPH	6,77

Pode-se observar que o SPCE/EPH difere significativamente dos demais eletrodos modificados, apresentando o menor valor de resistência para redução de isoniazida, quando comparado aos demais eletrodos. Os eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH apresentaram resultados semelhantes, pois para ambos o valor da resistência à transferência de carga foi elevado, sugerindo que esses filmes não favorecem a eletroredução da isoniazida. Porém, no SPCE/Glu-PH o efeito foi mais pronunciado, demonstrando, assim, uma dificuldade maior para a redução do fármaco sobre esse eletrodo.

Os valores de resistência encontrados pela técnica de impedância podem ser comparados com os resultados voltamétricos mostrados anteriormente (Figura 58). Em um potencial de -0,9 V (vs. Ag/AgCl), foi observado para o SPCE/EPH um pico de corrente referente a redução da isoniazida. Nesse mesmo potencial, para o eletrodo não modificado, foi observado um valor de corrente menor e para os

SPCE/PH e SPCE/Glu-PH, um valor de corrente próximo a corrente de fundo, o que concorda com os valores de resistência obtidos pelas medidas de impedância.

IV.6.4. DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA UTILIZANDO SPCE/EPH

Para a otimização do método, diversos parâmetros que podem exercer alguma influência sobre a resposta voltamétrica do sistema foram estudados. O potencial de acúmulo foi investigado seu efeito entre -0,4 V e -0,8 V, em tempos de acúmulo de 60s. Os respectivos voltamogramas estão apresentados na Figura 64.

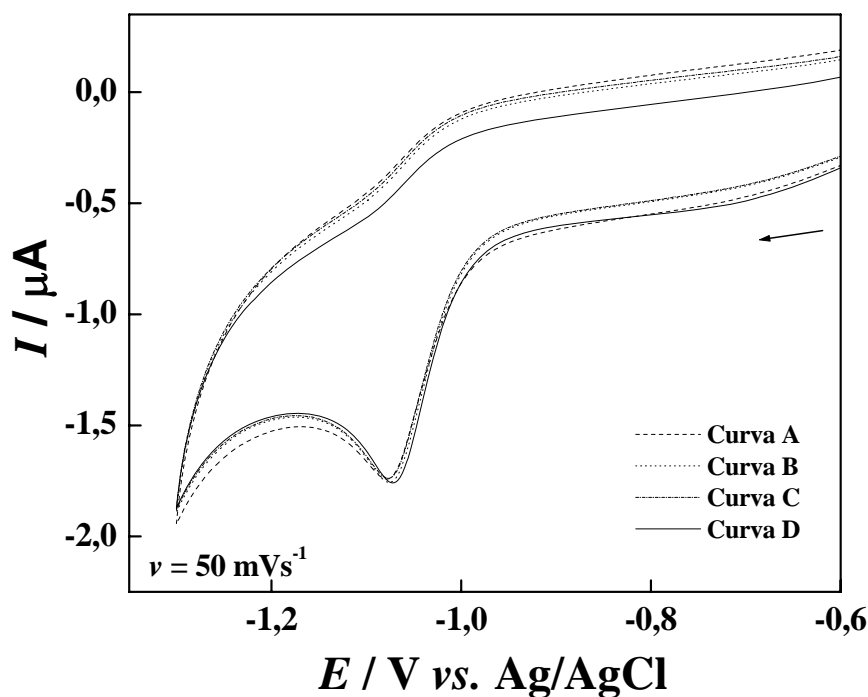


Figura 64: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, após aplicação, por 60s, de diferentes valores de potencial: -0,4V (Curva A), -0,6 V (Curva B) -0,8 V (Curva C) e potencial de circuito aberto (Curva D).

A análise dos voltamogramas indica que a variação no potencial de acúmulo não exerceu influência significativa sobre a resposta voltamétrica do eletrodo. Desta maneira, os demais estudos foram realizados empregando condições de potencial de circuito aberto.

Outro fator que pode exercer grande influência sobre a resposta voltamétrica de um sistema é o tempo de imersão do eletrodo de trabalho. Para avaliar esse parâmetro, voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um SPCE/EPH, em solução tampão acetato pH 5,0, em duas condições: imediatamente após a imersão do eletrodo e após 200 segundos de imersão, em condições de potencial de circuito aberto. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 65.

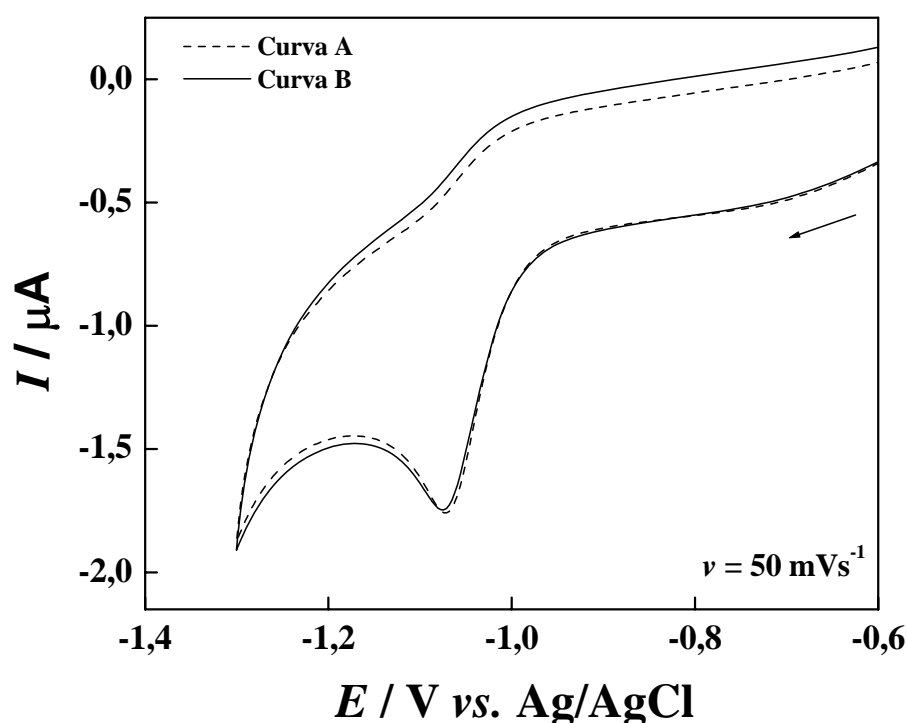


Figura 65: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão acetato pH 7,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, imediatamente após a imersão do eletrodo (Curva A) e após 200 segundos de imersão (Curva B).

Observando os voltamogramas, é possível verificar que o tempo de imersão não exerceu influência significativa sobre a resposta voltamétrica do SPCE/EPH. Os resultados obtidos para o estudo do potencial antes da etapa de varredura e para o tempo de acumulação reforçam a proposta de que a isoniazida não é retida no filme polimérico, e que o filme atua no sentido de favorecer o mecanismo de transferência eletrônica.

A incorporação do analito no filme polimérico foi testada através de dois experimentos: a) primeiramente, o eletrodo SPCE/EPH foi submetido a varreduras

cíclicas de potencial, no intervalo de -0,4 V a -1,2 V, sob velocidade de varredura de 25 mVs^{-1} , em solução tampão fosfato pH 7,0 contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida. A seguir, o eletrodo foi removido, lavado com água destilada e colocado em uma solução contendo apenas o eletrólito suporte. B) No segundo experimento, o eletrodo SPCE/EPH foi colocado em uma solução de eletrólito suporte contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida e mantido por 10 min sob agitação, em condições de potencial de circuito aberto. Após esse período, o SPCE/EPH foi removido, lavado, transferido para uma solução contendo apenas tampão fosfato pH 7,0. Os voltamogramas cíclicos obtidos para esses dois experimentos estão ilustrados na Figura 66. Na mesma figura, está apresentado, para efeito de comparação, um voltamograma obtido em solução contendo $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida

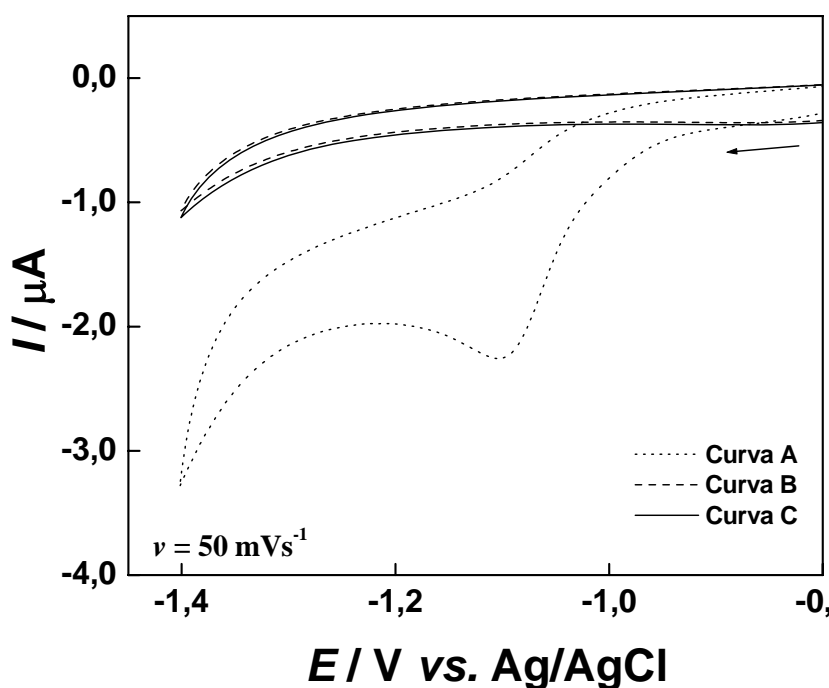


Figura 66: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE/EPH em solução tampão acetato pH 7,0, na presença de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida (Curva A), e em solução tampão acetato pH 5,0, na ausência de isoniazida, após ciclagem de potencial (Curva B) ou imersão por 10 minutos (Curva C) em solução contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida.

Para ambos os experimentos realizados, os resultados sugerem que não existe a incorporação do analito no filme polimérico formado na superfície do eletrodo impresso, o que suporta a proposta de que o efeito do filme de poli-histidina apenas facilita a redução da isoniazida, ou seja, tem um efeito eletrocatalítico.

A influência da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica da isoniazida foi investigada, em um intervalo entre 10 mV s^{-1} a 200 mV s^{-1} . O gráfico construído, a partir da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, apresentou um comportamento linear, segundo a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 1,51 + 2,42 \times 10^{-1} v^{1/2}$. Isso sugere um controle difusional, onde a isoniazida provavelmente é reduzida através do filme de poli-histidina.

Com o aumento da velocidade de varredura, o potencial de pico catódico variou para valores mais negativos. Um gráfico construído de E_{pc} versus o \ln da velocidade de varredura [118,119] apresentou um comportamento linear, segundo a equação: $-E_{pc} = 0,923 + 0,026 \cdot \ln v$. Considerando para um sistema irreversível, o coeficiente angular previsto entre E_p vs. $\ln v$ seria de $30 \text{ mV}/\alpha n$, o valor experimental encontrado para este coeficiente de 26 mV , indica valor $\alpha n = 1,15$. Pode-se verificar que o valor de αn obtido pelo estudo da velocidade de varredura apresentou uma boa concordância com aquele verificado diretamente no voltamograma ($\alpha n = 1,06$). Para fins analíticos, foi adotada a velocidade de varredura onde se observou melhor resolução voltamétrica, isto é, 50 mV s^{-1} .

Depois de otimizadas as condições experimentais para a determinação do fármaco, construiu-se uma curva analítica para a redução da isoniazida sobre o SPCE/EPH, usando voltametria de varredura linear. A Figura 67 apresenta os voltamogramas de varredura linear, obtidos em solução tampão fosfato $\text{pH} = 7,0$, contendo diferentes concentrações de isoniazida.

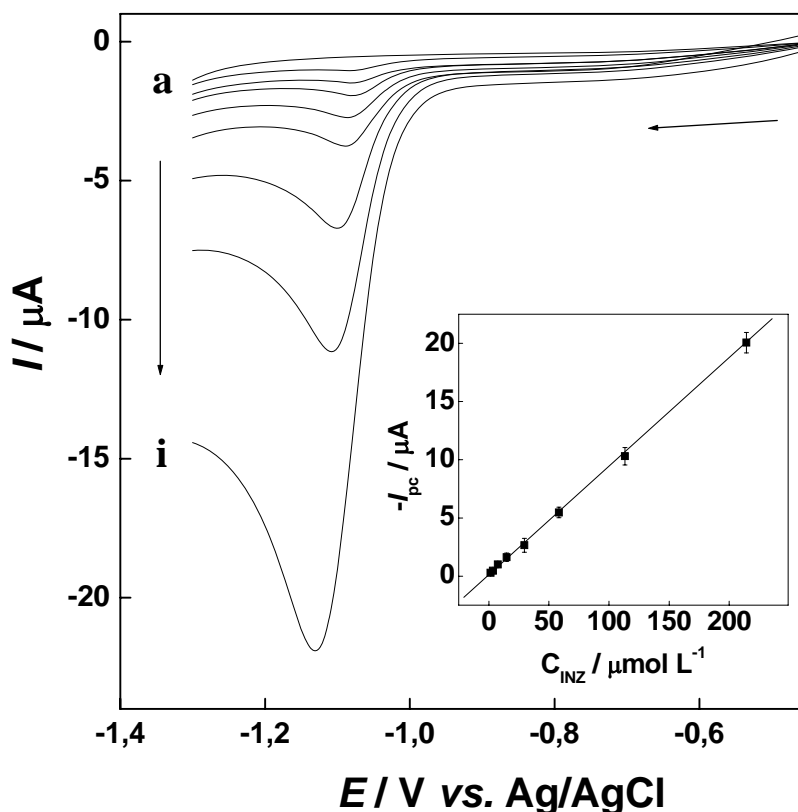


Figura 67: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/EPH em solução tampão fosfato pH 7,0, para diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $1,5 \times 10^{-6}$, (c) $3,5 \times 10^{-6}$, (d) $7,5 \times 10^{-6}$, (e) $1,5 \times 10^{-5}$, (f) $3,0 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$ e (i) $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando as condições otimizadas. Em detalhe é mostrada a curva analítica.

A resposta voltamétrica do SPCE/EPH, em função da concentração de isoniazida, foi linear no intervalo de $1,5 \times 10^{-6}$ a $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e obedeceu a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,43 + 0,93 \cdot C_{\text{INZ}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \cdot$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.6.4.1. UTILIZAÇÃO DA VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E DE ONDA QUADRADA

Visando melhorar os limites de detecção e a sensibilidade voltamétrica do método proposto para determinação de isoniazida, o eletrodo modificado foi avaliado empregando-se outras técnicas voltamétricas, tais como, voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Para ambas as técnicas

adotadas, diversos parâmetros foram avaliados e otimizados, como a variação da amplitude e do tempo de duração de pulso nos voltamogramas de pulso diferencial (Figura 68). Por apresentarem máximos valores de corrente, um tempo de duração de pulso de 5 ms e $\Delta E = 75$ mV foram escolhidos.

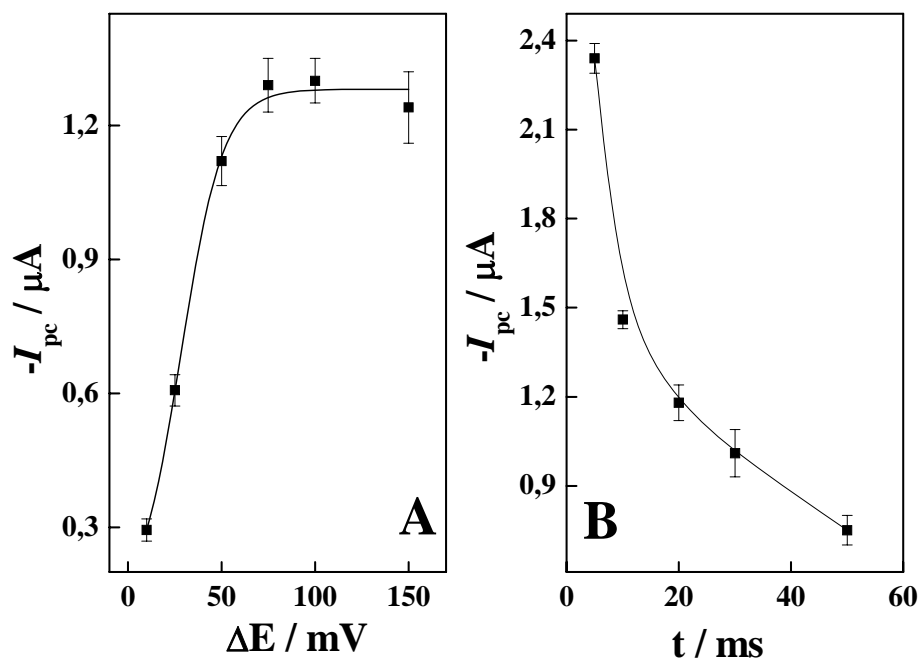


Figura 68: Variação da corrente de pico catódica, em função da amplitude de pulso (A) e do tempo de duração do pulso (B).

O efeito da velocidade de varredura (1 e 20 mV s^{-1}) foi também investigado, sendo escolhido um valor de 10 mVs^{-1} , por apresentar os melhores resultados.

Depois de otimizadas as condições experimentais para a análise de isoniazida, construiu-se uma curva analítica usando o SPCE/EPH, sobre condições de voltametria de pulso diferencial. A Figura 69 apresenta os voltamogramas obtidos em diferentes concentrações de isoniazida e a respectiva curva analítica.

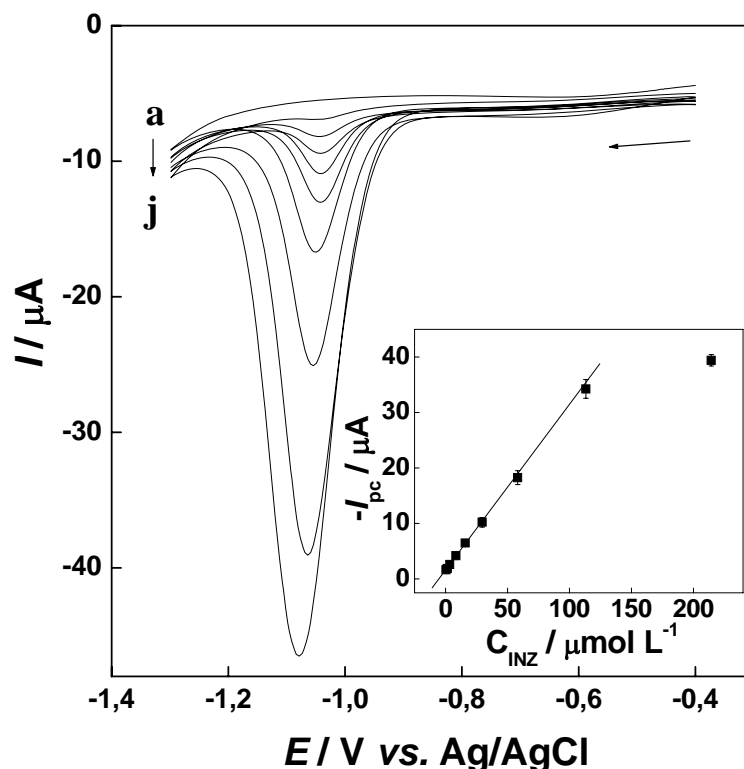


Figura 69: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $5,0 \times 10^{-7}$, (c) $1,5 \times 10^{-6}$, (d) $3,5 \times 10^{-6}$, (e) $7,5 \times 10^{-6}$, (f) $1,5 \times 10^{-5}$, (g) $3,0 \times 10^{-5}$, (h) $5,8 \times 10^{-5}$, (i) $1,1 \times 10^{-5}$ e (j) $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em detalhe é mostrada a curva analítica.

A resposta voltamétrica do SPCE/EPH, em função da concentração de isoniazida, foi linear de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, segundo a equação: $-I_{pc}$ (μA) = $1,21 + 2,99 \cdot C_{INZ}$ (μmol L⁻¹). Em valores superiores a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$, pode-se observar um aumento menos acentuado da corrente de pico, sugerindo a saturação dos sítios presentes na superfície do eletrodo. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \cdot$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Foram realizados estudos visando avaliar a potencialidade do SPCE/EPH para determinação de isoniazida, sobre condições de voltametria de onda quadrada. Para isso, três parâmetros foram investigados: amplitude de pulso de potencial (ΔE), frequência (f) e incremento de pulso. Todos esses parâmetros foram estudados em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de isoniazida. A Figura 70 apresenta a variação da corrente de pico catódica, em função da variação da frequência e da amplitude de pulso.

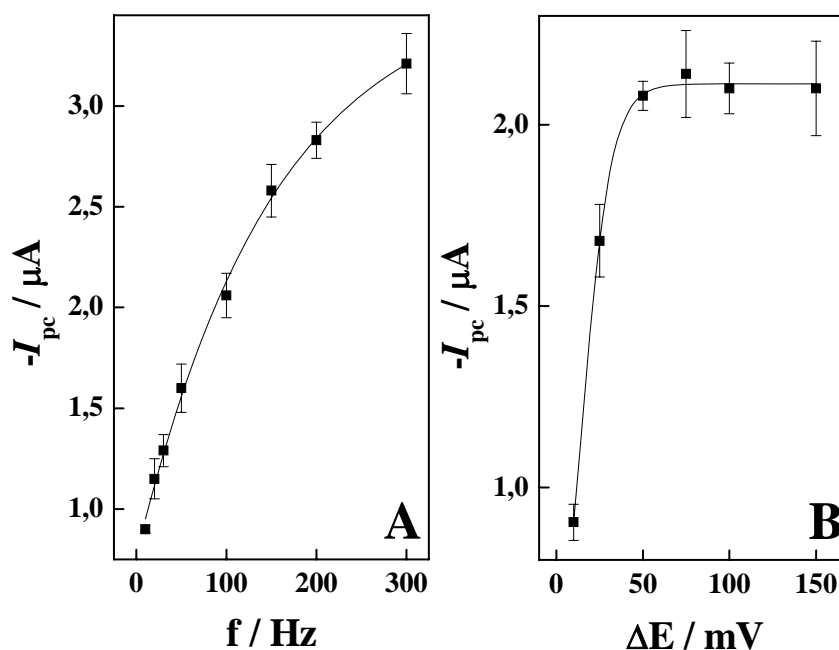


Figura 70: Variação da corrente de pico catódica, em função da frequência (A) e da amplitude de pulso (B).

Para valores de frequência de 10 a 300 Hertz (Figura 70A), pode-se visualizar um aumento da corrente de pico. Em frequências acima de 75 Hz, foi observado um aumento significativo da corrente da linha base, o que compromete o perfil e a resolução do voltamograma. Baseado nisso, uma frequência de 75 Hz foi escolhida para ser aplicada nos demais estudos.

Com relação a variação da amplitude de pulso (Figura 70B), observou-se um aumento da corrente de pico, com o aumento da amplitude de pulso para valores entre 10 e 50 mV. Em valores superiores, a corrente de pico atingiu uma região constante, culminando no alargamento do pico de corrente catódica, que levou a uma diminuição na resolução voltamétrica. Desta maneira, optou-se por realizar os demais estudos com uma amplitude de 50 mV.

Outro parâmetro avaliado foi o incremento de pulso, estudado para valores entre 1 e 15 mV. O pico de redução aumentou, porém, para valores maiores que 5 mV, observou-se a deformação dos voltamogramas. Assim, o valor de incremento de pulso de potencial de 5 mV foi adotado para a obtenção da curva analítica (Figura 71).

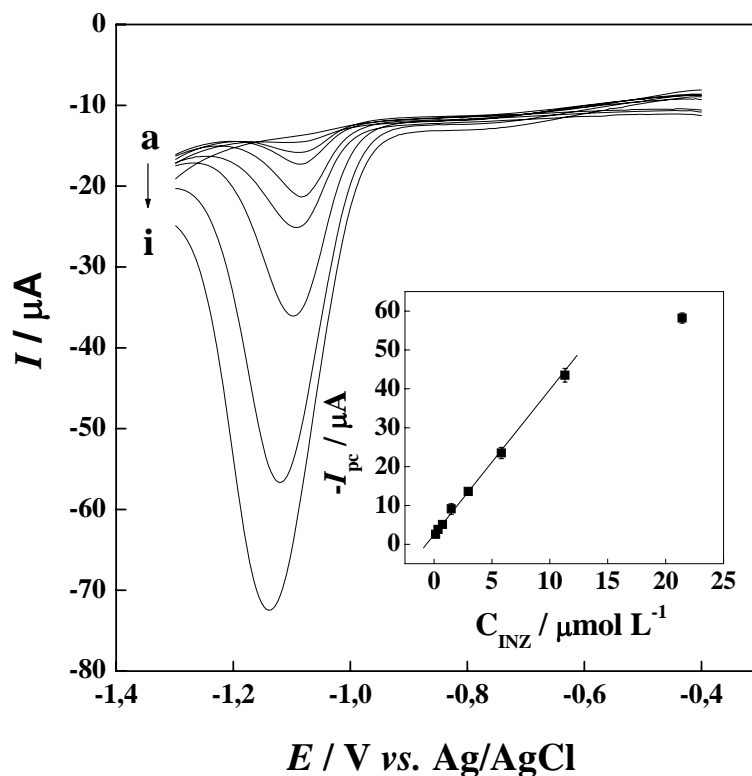


Figura 71: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 7,0, na presença de diferentes concentrações de isoniazida: (a) 0,0, (b) $1,5 \times 10^{-6}$, (c) $3,5 \times 10^{-6}$, (d) $7,5 \times 10^{-6}$, (e) $1,5 \times 10^{-5}$, (f) $3,0 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$ e (i) $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em detalhe é mostrada a curva analítica.

Observando a Figura 71, pode-se verificar uma relação linear ($1,5 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) entre a resposta voltamétrica do SPCE/EPH e a concentração de isoniazida, que obedece a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 2,31 + 3,71 \cdot C_{\text{INZ}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. Em valores superiores a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$, nota-se apenas um pequeno aumento da corrente, sugerindo a saturação dos sítios presentes na superfície do eletrodo. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \cdot \text{desvio padrão do branco/sensibilidade}$) de $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.6.4.2. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após avaliar o comportamento do SPCE/EPH, para determinação voltamétrica da isoniazida empregando diferentes técnicas, compilou-se na Tabela 8 os principais parâmetros obtidos.

Tabela 8: Parâmetros extraídos das curvas analíticas obtidas para redução de isoniazida, sobre eletrodo SPCE/EPH, em tampão fosfato pH 7,0.

Técnica	Região Linear / mol L ⁻¹	Sensibilidade/ $\mu\text{A L}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$	Limite de Detecção / mol L ⁻¹
LSV	$1,5 \times 10^{-6}$ a $2,1 \times 10^{-4}$	0,99	$5,0 \times 10^{-7}$
DPV	$5,0 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-4}$	2,99	$1,7 \times 10^{-7}$
SWV	$1,5 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4}$	3,71	$2,5 \times 10^{-7}$

Das técnicas voltamétricas avaliadas, foi observada uma maior sensibilidade para a voltametria de onda quadrada (SWV), além de uma menor faixa de resposta linear. Para a voltametria de varredura linear (LSV), foi observado o maior intervalo de linearidade na resposta, mas com elevado valor no limite de detecção, provavelmente devido à baixa sensibilidade. Quando se observa os resultados obtidos com a voltametria de pulso diferencial, são verificados valores mais satisfatórios entre os parâmetros avaliados; por essa razão, a DPV foi escolhida para ser posteriormente aplicada na determinação de isoniazida em amostras reais. Utilizando o mesmo eletrodo foram realizadas 10 medidas consecutivas em condições de DPV para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de isoniazida, onde foi verificado um desvio padrão de 2,9% para esse conjunto de medidas. Empregando 5 eletrodos diferentes, nas mesmas condições experimentais, foi observado um desvio padrão de 5,2% quando comparada a média obtidas para esse conjunto de medidas.

A quantificação de isoniazida em amostras de urina humana, usando SPCE/EPH, foi testada avaliando-se inicialmente a influência da presença da amostra sobre a resposta voltamétrica do sistema. Para isso, voltamogramas de

pulso diferencial foram obtidos em 20 mL de solução tampão fosfato pH 7,0, contendo uma concentração de isoniazida fixa em $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e na presença de diferentes volumes de urina enriquecida com a mesma concentração do analito, sem nenhum pré-tratamento. Foram adicionados a célula, volumes de 20, 100, 200, 400 e 800 μL de urina e os valores médios relativos de corrente de pico catódica, obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial, foram de 98,5, 97,3, 95,7, 92,4 e 90,4 %, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que a presença da amostra de urina contendo isoniazida promoveu uma diminuição no sinal voltamétrico, referente a redução do analito. Para soluções com mais de 200 μL de amostra de urina, os valores de recuperação foram menores que 95%. Assim, o valor de diluição de 200 μL foi adotado para a determinação de isoniazida em amostras de urina.

A determinação de isoniazida em uma amostra de urina enriquecida com $7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito foi realizada em triplicata, segundo o procedimento: diluição direta de uma alíquota de 100 μL da amostra em 10 mL de eletrólito suporte, registros de voltamogramas de pulso diferencial para a amostra e para quatro adições sucessivas de uma solução de isoniazida, resultando em concentrações finais de 0,3, 0,6, 0,9 e 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores encontrados na determinação de isoniazida utilizando SPCE/EPH.

Réplica	Valor adicionado / mmol L^{-1}	Valor recuperado / mmol L^{-1}	Recuperação / %
1	0,73	0,70	96
2	0,73	0,75	104
3	0,73	0,74	101

Valores de recuperação variando entre 96 e 103% foram obtidos, demonstrando uma boa concordância entre os valores e também a aplicabilidade do método proposto na determinação voltamétrica de isoniazida.

IV.7- APLICAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO MODIFICADOS POR FILMES DE PH NA ANÁLISE DE PIRAZINAMIDA

IV.7.1- COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA PIRAZINAMIDA SOBRE SPCE NÃO MODIFICADO

. A Figura 72 apresenta os voltamogramas obtidos para a redução de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida em tampão fosfato..

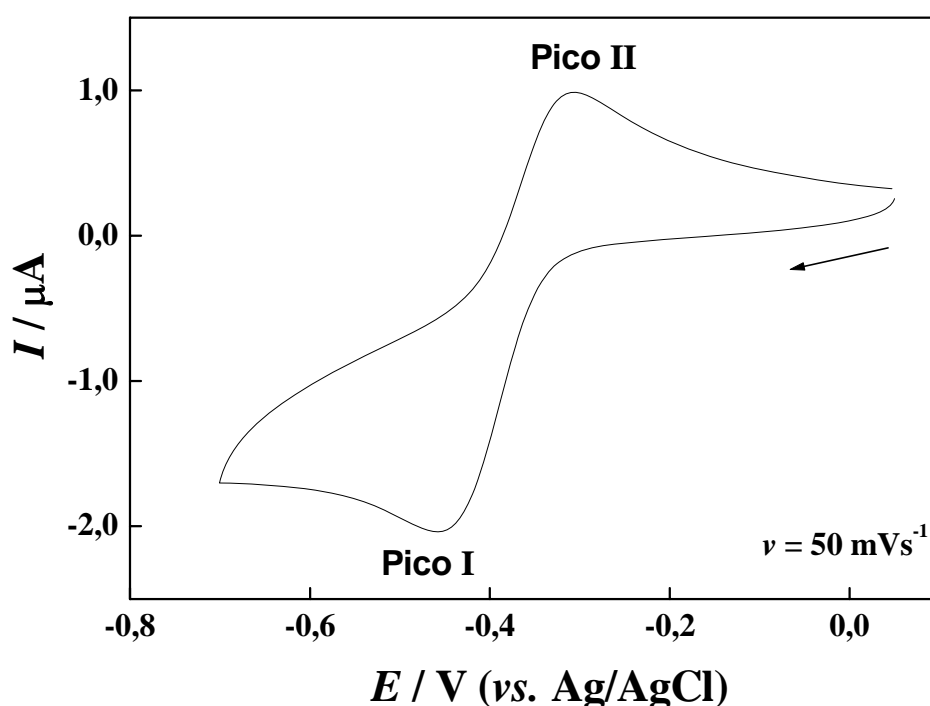


Figura 72: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nessas condições, foi verificada a existência de um pico de redução (pico I) em potencial de -0,43 V (vs. Ag/AgCl), e um sinal de oxidação do produto em potencial de -0,31 V (vs. Ag/AgCl), na varredura reversa. O processo eletródico apresenta uma razão I_{pa}/I_{pc} de 0,64, e a diferença de $E_{pc/2} - E_{pa/2}$ é igual a 33 mV. Deste modo, os resultados obtidos permitem sugerir que o sistema se comporta próximo ao esperado para o caso reversível. O fato da relação I_{pa}/I_{pc} não ser igual a 1, pode estar relacionado à alguma reação química acoplada, que consome o

produto da redução, causando conseqüentemente, uma diminuição na corrente de oxidação. A eletroatividade desse composto embora pouco estudada possa ser possivelmente atribuída à redução/oxidação da dupla ligação existente no anel aromático da molécula.

IV.7.2- COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DA PIRAZINAMIDA SOBRE SPCE MODIFICADO POR FILMES DE PH

Visando comparar o desempenho do eletrodo não modificado ao dos eletrodos modificados, foram realizadas medidas de voltametria cíclica, na presença de pirazinamida. A Figura 73 apresenta os voltamogramas registrados em solução tampão fosfato pH 1,0 na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

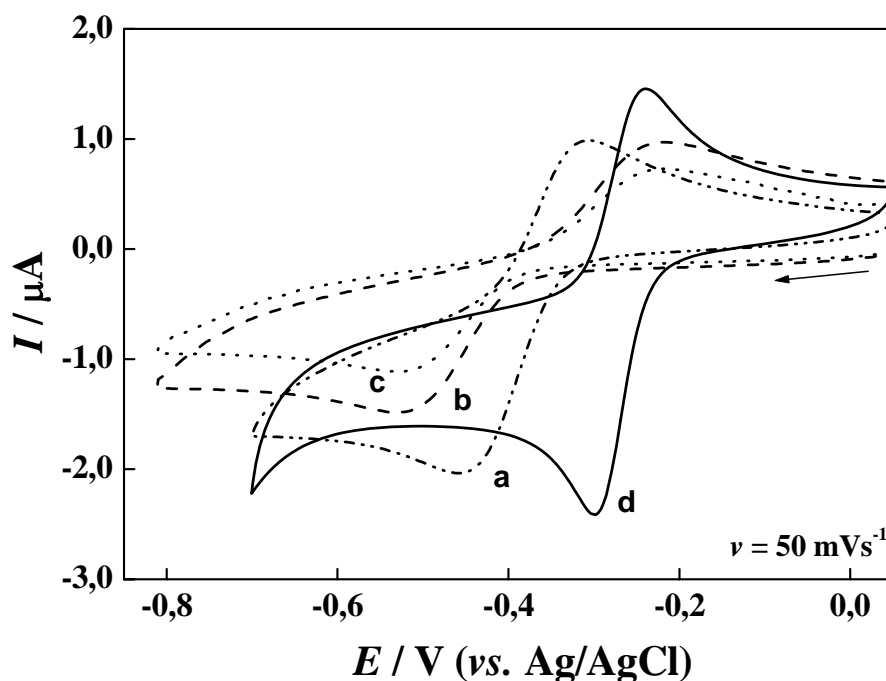


Figura 73: Voltamogramas cíclicos obtidos com o SPCE não modificado (a) e para modificados SPCE/PH (b), SPCE/Glu-PH (c) e SPCE/EPH (d), em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Foi observada uma diminuição na corrente de pico catódica e uma variação no sobrepotencial de pico para valores mais negativos (-0,53 V vs. Ag/AgCl), em relação ao eletrodo não modificado quanto utilizados os eletrodos SPCE/PH (b) e

SPCE/Glu-PH (c). Para o SPCE/EPH (d) foi verificada uma diminuição no sobrepotencial de redução (-0,3 V vs. Ag/AgCl) e um aumento na corrente de pico em relação ao eletrodo não modificado. Na varredura reversa, o sinal de oxidação foi observado para todos os voltamogramas. No eletrodo SPCE/EPH voltamogramas apresentaram valores da razão I_{pa}/I_{pc} de 0,78 e uma diferença entre $E_{pc/2} - E_{pa/2}$ igual a 16 mV. Para sistemas reversíveis simples, é esperado uma relação $I_{pa}/I_{pc} = 1$ e uma diferença de $E_{pc/2} - E_{pa/2}$ de $28/n$ (onde n é o número de elétrons), com base nos resultados obtidos é possível encontrar n de 1,75 e sugerir que o eletrodo comporta-se como esperado para um sistema reversível com transferência de 2 elétrons em pH 1,0. Comparando-se esses resultados com os obtidos com SPCE não modificado, fica notório que o filme de PH construído por eletropolimerização facilita a redução da pirazinamida e também auxilia na estabilização do produto formado, esse fato traduzido por um aumento na razão I_{pa}/I_{pc} e na diminuição de $E_{pc/2} - E_{pa/2}$.

A diferença observada no comportamento voltamétrico da pirazinamida sobre os SPCE modificados, deve ser atribuída às características dos filmes formados para cada procedimento. Assim, eletrodos que apresentam filmes mais espessos, como os SPCE/PH e SPCE/Glu-PH, atuam como uma barreira, dificultando a redução da pirazinamida, sendo esse efeito mais pronunciado para o SPCE/Glu-PH, sugerindo que o agente ancorante aumenta a resistência a transferência de carga. Já o SPCE/EPH por ser um eletrodo recoberto apenas por monômeros oxidados da histidina, que por sua vez exibe uma espessura menor e facilita a redução da pirazinamida. Dessa maneira, por apresentar resultados mais promissores para a redução eletroquímica da pirazinamida, o eletrodo SPCE/EPH foi escolhido para a realização dos demais estudos, visando o desenvolvimento de um método de análise.

Como o potencial de acúmulo poderia afetar a resposta voltamétrica do eletrodo modificado SPCE/EPH, foi investigado seu efeito entre -0,2 V e +0,2 V (vs. Ag/AgCl), usando tempos de acúmulo de 60s, para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ pirazinamida. A análise dos voltamogramas indicou que a variação no potencial de acúmulo não exerceu influência significativa sobre a resposta voltamétrica do eletrodo. Assim, os demais estudos foram realizados empregando condições de potencial de circuito aberto.

Outro fator que pode exercer grande influência sobre a resposta voltamétrica de um sistema é o tempo de imersão do eletrodo de trabalho. Para avaliar esse parâmetro, voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 5,0, em duas condições: imediatamente após a imersão do eletrodo e após 200 segundos de imersão, em condições de potencial de circuito aberto. Os resultados demonstraram que o tempo de imersão não apresentou uma influência significativa sobre a resposta voltamétrica do SPCE/EPH. Estudos do potencial antes da etapa de varredura e para o tempo de acumulação reforçaram a proposta de funcionamento, um efeito eletrocatalítico para a redução da pirazinamida.

A incorporação do analito no filme polimérico foi testada através de dois experimentos: a) primeiramente, o eletrodo SPCE/EPH foi submetido a varreduras cíclicas de potencial, no intervalo de -0,4 V a -1,2 V, sob velocidade de varredura de 25 mVs^{-1} , em solução tampão acetato pH 5,0 contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida. A seguir, o eletrodo foi removido, lavado com água destilada e colocado em uma solução contendo apenas o eletrólito suporte; b) No segundo experimento, o eletrodo SPCE/EPH foi colocado em uma solução de eletrólito suporte contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida e mantido por 10 min sob agitação, em condições de potencial de circuito aberto. Após esse período, o SPCE/EPH foi removido, lavado, transferido para uma solução contendo apenas tampão fosfato pH 1,0. Para ambos os experimentos realizados, os resultados sugeriram que não existe a incorporação do analito no filme polimérico formado na superfície do eletrodo impresso, o que suporta a proposta de que o efeito do filme de poli-histidina é de apenas facilitar a redução da isoniazida, ou seja, tem um efeito eletrocatalítico.

A influência da variação do pH sobre a resposta voltamétrica do SPCE/EPH para redução de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, foi avaliada em valores de pH entre 1,0 e 11. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 74.

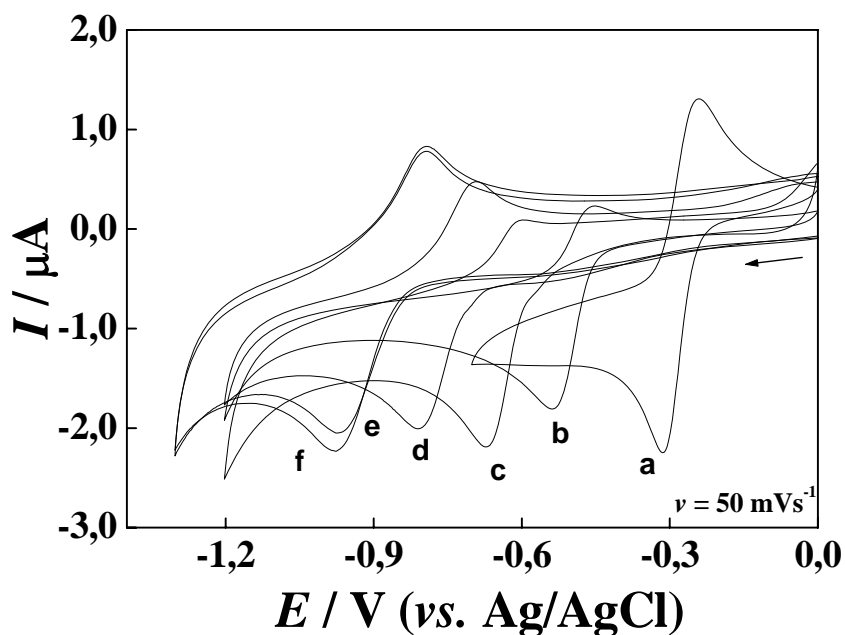


Figura 74: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SCPE/EPH, em solução tampão fosfato contendo $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 7,0 (d), 9,0 (e) e 11,0 (f).

Observando os resultados obtidos é possível verificar que a variação do pH causou significativas alterações no perfil da curva voltamétrica de redução da pirazinamida, sobre o SPCE/EPH. A Tabela 10 apresenta os valores obtidos corresponde as relativas correntes de pico anódica e catódica em função do pH.

Tabela 10: Valores da corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) e da razão I_{pa}/I_{pc} em função do pH.

pH	I_{pa} / I_{pc}
1,0	0,81
3,0	0,49
5,0	0,34
7,0	0,60
9,0	0,45
11,0	0,49

A corrente de pico catódica é máxima em pH 1 com ligeira diminuição para maiores valores de pH.. A razão entre I_{pa}/I_{pc} para todo o intervalo avaliado foi

menor que 1, porém, em $\text{pH} > 1$ foi observado um valor de 0,81, sugerindo que possivelmente reações químicas que consomem o produto são minimizadas nestas condições experimentais.

Os valores de potencial de pico catódicos, obtidos em solução contendo $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, foram colocados em um gráfico, em função do pH do eletrólito suporte, e apresentados na Figura 75.

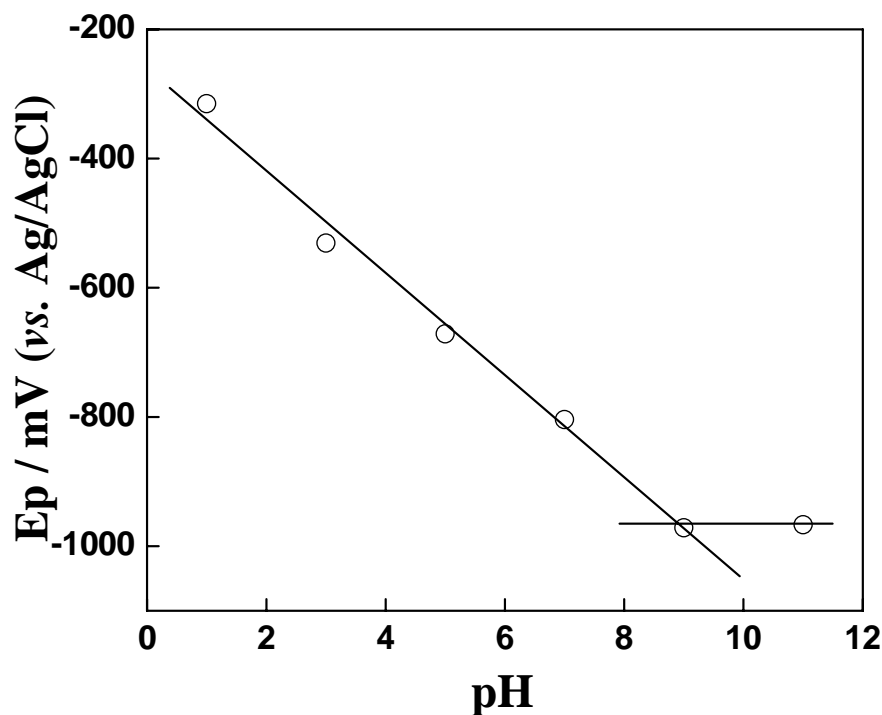
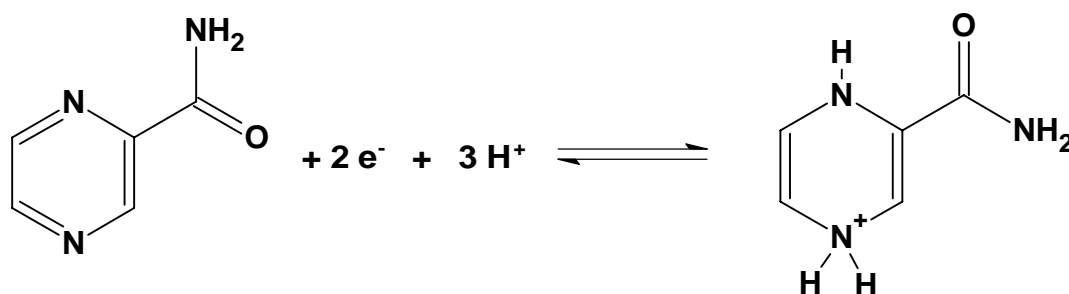


Figura 75: Variação do potencial pico catódica e anódica, para uma solução contendo $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, sobre SPCE/EPH, em função do pH da solução.

Os resultados obtidos para a variação do potencial de pico em função do pH apresentou uma relação onde se observa duas regiões. Em $\text{pH} > 9$, não há variações significativas dos potenciais de pico indicando que o mecanismo eletródico ocorre sem participação de prótons. No entanto, no intervalo de $\text{pH} < 9$, foi observada uma variação linear entre o potencial de pico e o pH, com coeficiente angular de -79 mV . Com base nos valores da variação do potencial por unidade de pH, foi possível calcular e sugerir o número de prótons envolvidos na reação de eletrodo. A relação $\Delta E / \Delta \text{pH} = (59,1 \text{ mV}/n) \cdot N_{\text{H}^+}$ é bem estabelecida para um processo eletródico reversível [118, 119], onde o produto n é o número de elétrons e N_{H^+} é o número de

prótons envolvidos. Utilizando os resultados obtidos, pode-se sugerir que para pH 1,0, o número de elétrons transferidos na redução da pirazinamida foi próximo a 2. A participação de íons H^+ , para esse valor de pH, envolve aproximadamente 3 íons H^+ . Relatos encontrados na literatura, utilizando eletrodos de mercúrio, sugerem que a redução da pirazina em $pH < 2$, gera o íon 1,4-hidropirazinium [104, 105], porém essa redução ocorre em duas etapas via a formação do cátion radical dihidropirazina [105]. Em valores de pH acima de 2 existe uma sobreposição dos processos e a redução ocorre de forma direta, levando a formação do íon 1,4-hidropirazinium, envolvendo 2 elétrons e 3 prótons. Dessa forma, baseados nos resultados obtidos, sugere-se que em $pH = 1$ sobre o eletrodo SPCE/EPH, o processo eletródico pode ser representado como no equação 2.



Equação 2: Representação da redução eletroquímica da pirazinamida.

A estabilidade do produto formado é dependente das características do substituinte, sendo observada uma reversibilidade maior para compostos pirazínicos contendo ligantes retiradores de elétrons [105]. Deve-se salientar que os valores calculados são apenas um indicativo da reação eletródica, visto que a literatura não apresenta informações significativas sobre os processos redox envolvendo a pirazinamida. A elucidação do mecanismo de redução do analito requer estudos mais detalhados. O pH 1 foi escolhido, pois apresentou a melhor concordância entre a resolução voltamétrica e os valores de corrente de pico.

A influência da velocidade de varredura sobre a corrente de pico catódica foi investigada em um intervalo entre 10 mV s^{-1} e 200 mV s^{-1} . A partir da corrente de pico, um gráfico foi construído em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, o qual apresentou um comportamento linear, para um intervalo entre 10 mVs^{-1} e 150 mVs^{-1} , segundo a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,46 + 2,89 \times 10^{-1} v^{1/2}$. Esses resultados sugerem um controle difusional, onde a pirazinamida é reduzida através

do filme de poli-histidina. Com o aumento da velocidade de varredura, o potencial de pico catódico variou para valores mais negativos. Um gráfico construído de E_{pc} versus o \ln da velocidade de varredura [118] apresentou um comportamento linear, segundo a equação: $-E_{pc} = 0,280 + 0,011 \cdot \ln v$. Para fins analíticos, foi adotada a velocidade de varredura onde se observou melhor resolução voltamétrica, isto é, 50 mV s^{-1} .

IV.7.3. MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

Medidas de impedância eletroquímica foram realizadas empregando as seguintes condições experimentais: amplitude de potencial de 10 mV, intervalo de frequência entre 10^5 e 10^{-2} Hz, em um potencial de $-0,32 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). A Figura 76 apresenta os resultados de impedância eletroquímica, na forma de um diagrama no plano complexo, obtidos para os eletrodos de carbono impresso não modificados e modificados por diferentes procedimentos, em solução de tampão fosfato pH 1,0, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida.

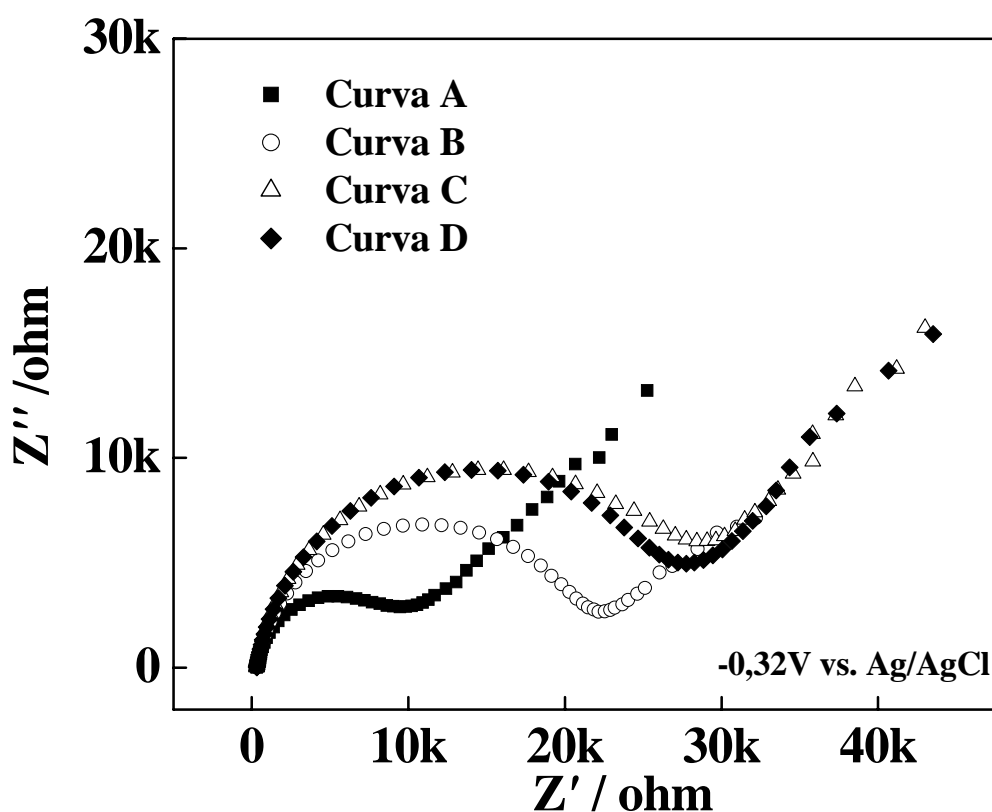


Figura 76: Gráfico de impedância no plano complexo obtido para os eletrodos de carbono impresso: não modificado (Curva B) e modificados: pela eletropolimerização da histidina (Curva A), pela adição direta de poli-histidina (Curva D) e utilizando glurataldeído (Curva C), em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de pirazinamida, em potencial de -0,32 V (vs. Ag/AgCl).

Analisando os resultados obtidos, foram determinados os valores da resistência à transferência de carga para os eletrodos avaliados, esses valores estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de resistência a transferência de carga calculada para os eletrodos de carbono impresso não modificados e modificados por filmes de PH para a redução de pirazinamida.

Eletrodo	Resistência (R) / kohm
SPCE	20,14
SPCE/PH	24,89
SPCE/Glu-PH	26,31
SPCE/EPH	9,04

Pode-se observar que o SPCE/EPH difere significativamente dos demais eletrodos modificados, sendo encontrado o menor valor de resistência à transferência de carga. Para os eletrodos SPCE/PH e SPCE/Glu-PH foram observados resultados muito semelhantes, ou seja, ambos apresentaram um elevado valor da resistência à transferência de carga, sugerindo que esses filmes não favorecem a eletrorredução da pirazinamida. Esse efeito foi mais pronunciado no SPCE/Glu-PH, demonstrando, assim, uma dificuldade maior para a redução sobre esse eletrodo.

IV.7.4 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE PIRAZINAMIDA SOBRE SPCE/EPH

Depois de otimizadas as condições experimentais para determinação do fármaco, construiu-se uma curva analítica para a redução da pirazinamida sobre o SPCE/EPH, usando voltametria cíclica. A Figura 77 apresenta os voltamogramas de varredura cíclica, obtidos em solução tampão fosfato ajustada em pH = 1,0, contendo diferentes concentrações de pirazinamida.

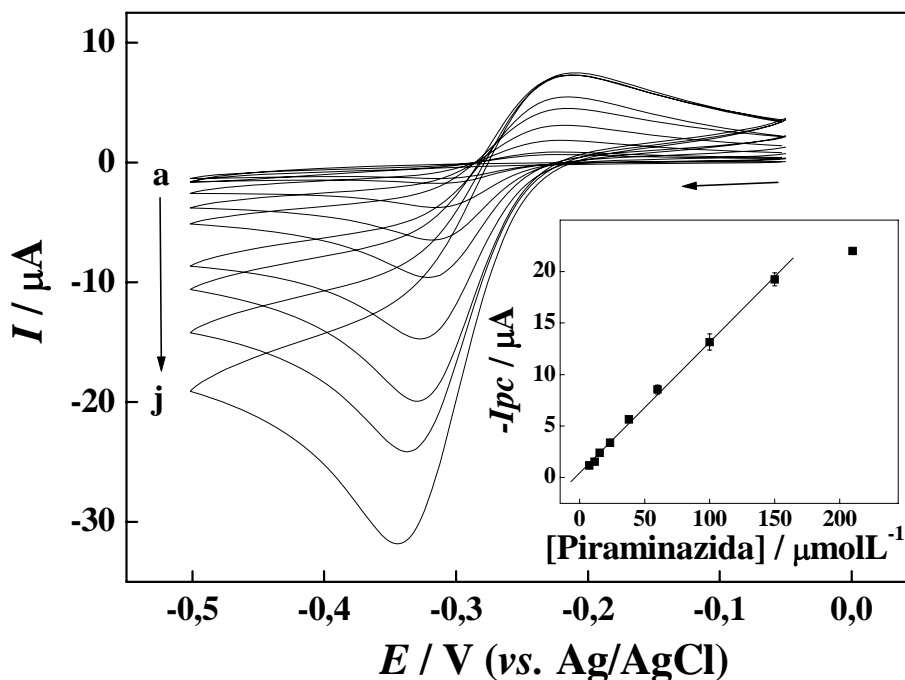


Figura 77: Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, para diferentes concentrações de pirazinamida: (a) 0,0, (b) $7,5 \times 10^{-6}$, (c) $1,1 \times 10^{-5}$, (d) $1,6 \times 10^{-5}$, (e) $2,3 \times 10^{-5}$, (f) $3,8 \times 10^{-5}$, (g) $5,8 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-4}$, (i) $1,5 \times 10^{-4}$ e (j) $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, aplicando as condições otimizadas. Em detalhe é mostrada a curva analítica.

A resposta voltamétrica do SPCE/EPH, em função da concentração de pirazinamida, apresentou um comportamento linear no intervalo entre $7,5 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ seguindo a equação da reta: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 4,3 \times 10^{-2} + 0,127 \cdot C_{\text{PIR}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. O método ofereceu um limite de detecção, calculado como $3 \cdot \text{desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica}$, de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de pirazinamida.

Além das características analíticas, pode-se verificar outras dependências a partir dos voltamogramas, como a variação da relação entre as correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}) com a concentração do analito. A Figura 78 apresenta os valores de I_{pa}/I_{pc} versus o logaritmo da concentração de pirazinamida.

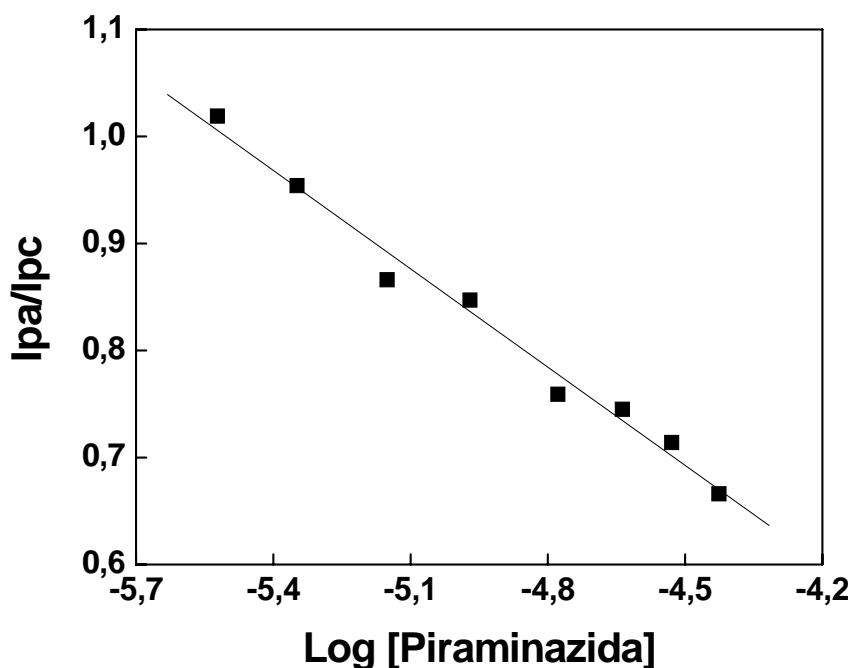


Figura 78: Gráfico da razão entre as correntes I_{pa}/I_{pc} , em função do logaritmo da concentração de pirazinamida.

É possível observar que existe uma diminuição na relação I_{pa}/I_{pc} , à medida que se aumenta a concentração do analito e um comportamento linear com o logaritmo da concentração da pirazinamida. Esses resultados são atribuídos na literatura [120, 121] a sistemas envolvendo reações químicas de segunda ordem. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a variação na relação I_{pa}/I_{pc} , em função da concentração do analito, está relacionada com a ordem da reação química acoplada. Assim, é possível sugerir que a reação química envolvendo o produto da reação eletrodica da pirazinamida poderia ser um produto dimérico, preponderante sob alta concentração do fármaco.

Em relação ao potencial de pico catódico, também foi observado um deslocamento para valores mais negativos, com o aumento da concentração da pirazinamida. A Figura 79 apresenta a variação do potencial de pico catódico, em função do logaritmo da concentração do analito.

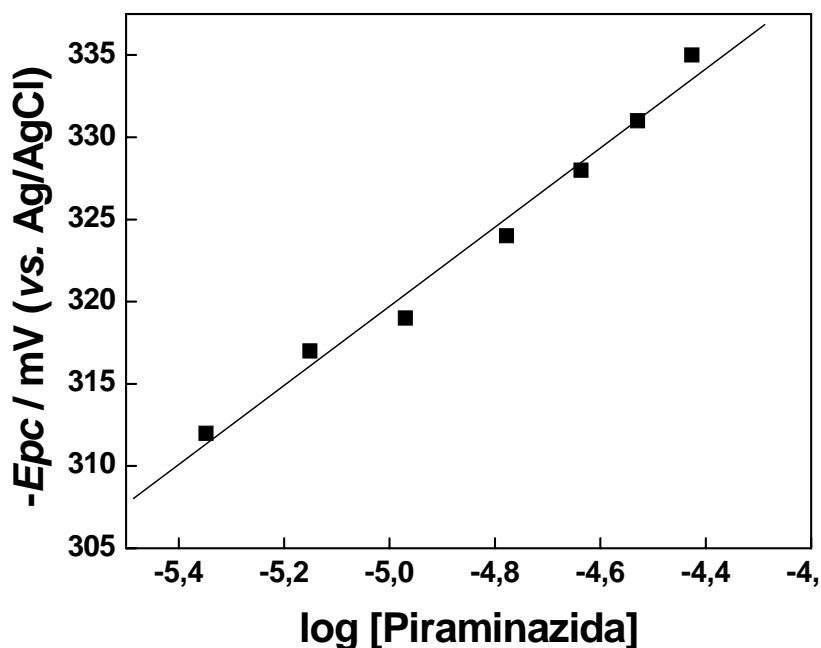


Figura 79: Gráfico do potencial de pico catódico (Epc), em função do logaritmo da concentração de pirazinamida.

Para um intervalo de concentração da curva analítica, foi observada uma variação linear do potencial de pico catódico, em função do logaritmo da concentração de pirazinamida, segundo a equação: $-E_{pc} \text{ (mV)} = 415 + 23,7 * \log [\text{Pirazinamida}]$. Para reações químicas acopladas que seguem uma cinética de segunda ordem, é esperada uma variação linear entre o potencial de pico catódico e o logaritmo da concentração da espécie eletroativa, com coeficiente angular de 19,5 mV. Os resultados obtidos apresentaram uma variação de 23,7 mV, confirmando o diagnóstico que o processo de redução do fármaco no filme poderia envolver uma reação de segunda ordem.

Em relação ao processo eletródico, pode-se inferir que a redução de pirazinamida sobre o SPCE/EPH, nas condições estudadas, não deve ocorrer como uma reação de eletrodo simples, e sim envolver um mecanismo EC, com uma reação química de segunda ordem, cujo diagnóstico exige investigações futuras.

IV.7.5. DETERMINAÇÃO DE PIRAZINAMIDA EMPREGANDO SPCE/EPH POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E ONDA QUADRADA

Visando melhorar os limites de detecção e a sensibilidade voltamétrica do método proposto, utilizando SPCE/EPH, para determinação de pirazinamida, o eletrodo modificado foi avaliado empregando-se outras técnicas voltamétricas, tais como, voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Para ambas as técnicas adotadas, diversos parâmetros foram avaliados e otimizados, visando a construção das curvas analíticas, utilizando como eletrólito suporte solução tampão fosfato ajustada em pH 1,0.

Primeiramente, testou-se os efeitos da variação da amplitude e do tempo de duração de pulso nos voltamogramas de pulso diferencial. Por apresentarem a melhor concordância entre a resolução voltamétrica e os valores de corrente de pico, foram escolhidos um tempo de duração de pulso de 5 ms e uma amplitude de pulso de 75 mV. O efeito da velocidade de varredura (1 e 20 mV s⁻¹) foi também investigado, sendo escolhido um valor de 10 mVs⁻¹, por apresentar os melhores resultados.

Depois de otimizadas as condições experimentais para análise de pirazinamida, construiu-se uma curva analítica empregando o SPCE/EPH, sobre condições de voltametria de pulso diferencial. A Figura 80 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de pirazinamida e a respectiva curva analítica.

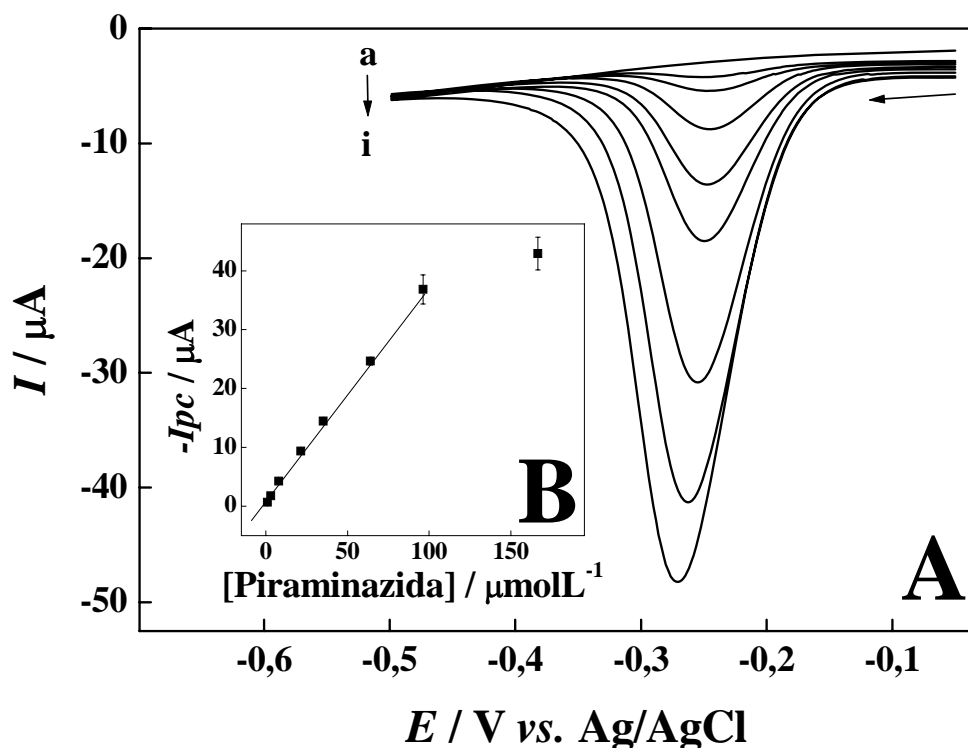


Figura 80: Voltamogramas de pulso diferencial (A) obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de diferentes concentrações de pirazinamida: (a) 0,0, (b) $9,0 \times 10^{-7}$, (c) $3,0 \times 10^{-6}$, (d) $8,0 \times 10^{-6}$, (e) $2,1 \times 10^{-5}$, (f) $3,5 \times 10^{-5}$, (g) $6,4 \times 10^{-5}$, (h) $9,6 \times 10^{-5}$ e (i) $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em detalhe é mostrada a curva analítica (B).

A resposta voltamétrica do SPCE/EPH, em função da concentração de pirazinamida, foi linear de $9,0 \times 10^{-7}$ a $9,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, segundo a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 1,35 + 0,37 \cdot C_{\text{PIR}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. Em valores superiores a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, pode-se observar apenas um pequeno aumento da corrente de pico, sugerindo a saturação dos sítios presentes na superfície do eletrodo. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \cdot \text{desvio padrão do branco/sensibilidade}$) de $5,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de pirazinamida.

Na tentativa de melhorar a potencialidade do SPCE/EPH, para determinação de pirazinamida, foram realizados estudos sobre condições de voltametria de onda quadrada. Para isso, três parâmetros foram investigados: amplitude de pulso de potencial (ΔE), frequência (f) e incremento de pulso. Todos esses parâmetros foram estudados em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de pirazinamida. Para valores de frequência entre 10 e 300 Hz, foi observado um aumento da corrente de pico com o aumento da frequência. Em

freqüências acima de 75 Hz, foi observado um aumento significativo da corrente da linha base, o que compromete o perfil e a resolução do voltamograma. Baseado nisso, uma freqüência de 75 Hz foi escolhida para ser aplicada nos demais estudos. Com relação a variação da amplitude de pulso, esta foi avaliada entre 5 e 150 mV, sendo observado um aumento da corrente de pico com o aumento da amplitude de pulso, para todo o intervalo investigado. Porém, para valores maiores que 50mV foi verificado um alargamento do pico de corrente catódica, o que levou a uma diminuição na resolução voltamétrica. Desta maneira, optou-se por realizar os demais estudos aplicando-se uma amplitude de 50 mV. O incremento de pulso foi estudado para valores entre 1 e 15 mV e os resultados demonstraram que o pico de redução aumentou, com o aumento do incremento de pulso. Porém, para valores maiores que 5 mV, observou-se a deformação dos voltamogramas. Assim, o valor de incremento de pulso de potencial de 5 mV foi adotado para a obtenção da curva analítica. A curva analítica está apresentada na Figura 81.

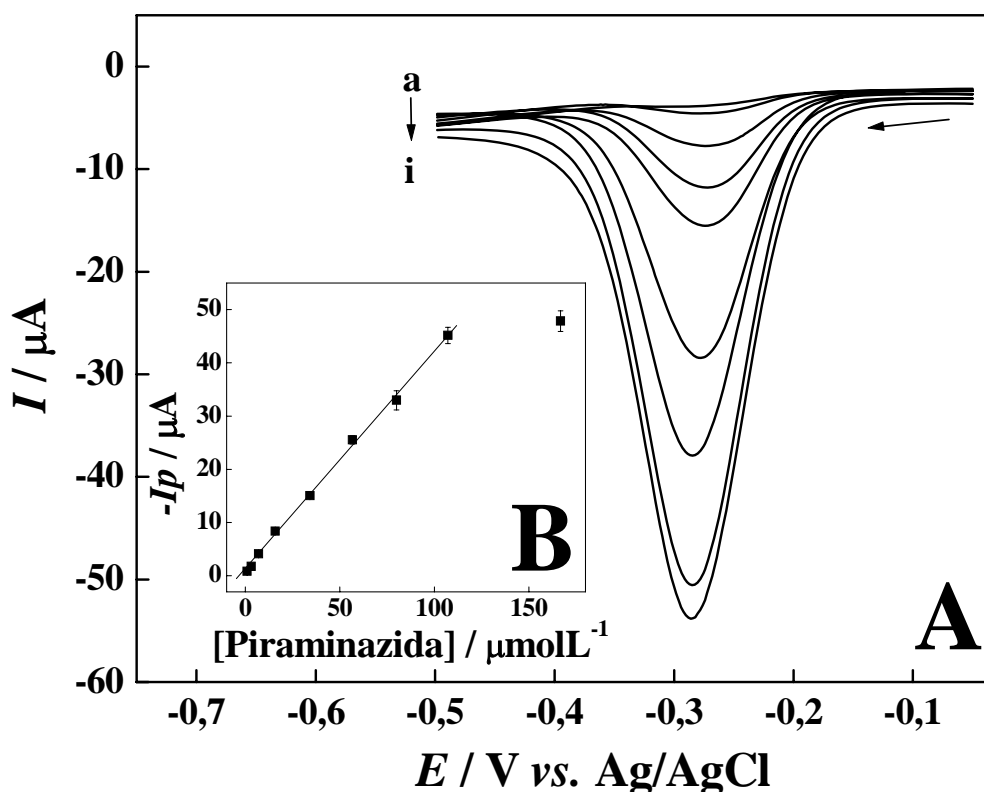


Figura 81: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/EPH, em solução tampão fosfato pH 1,0, na presença de diferentes concentrações de

pirazinamida: (a) 0,0, (b) $3,0 \times 10^{-6}$, (c) $7,0 \times 10^{-6}$, (d) $1,6 \times 10^{-5}$, (e) $3,4 \times 10^{-5}$, (f) $5,7 \times 10^{-5}$, (g) $8,0 \times 10^{-5}$, (h) $1,1 \times 10^{-5}$ e (i) $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em detalhe é mostrada a curva analítica.

A resposta voltamétrica do SPCE/EPH, em função da concentração de pirazinamida, foi linear de $3,0 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, segundo a equação: $-I_{pc}$ (μ A) = 1,21 + 2,99 * C_{PIR} (μ mol L⁻¹). Em valores superiores a 110 μ mol L⁻¹, pode-se observar um menor aumento da corrente de pico, sugerindo a saturação dos sítios presentes na superfície do eletrodo. O método ofereceu um limite de detecção (3*desvio padrão do branco/sensibilidade) de $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de pirazinamida.

IV.7.6 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PIRAZINAMIDA

Das técnicas voltamétricas avaliadas, foi observada uma maior sensibilidade para a voltametria de onda quadrada (SWV), além de uma menor faixa de resposta linear. Para a voltametria de varredura linear (LSV), foi observado o maior intervalo de linearidade na resposta, mas com elevado valor no limite de detecção, provavelmente devido à baixa sensibilidade. Quando se observou os resultados obtidos com a voltametria de pulso diferencial, foram verificados valores mais satisfatórios entre os parâmetros avaliados; por essa razão, a DPV foi escolhida para ser posteriormente aplicada na determinação de pirazinamida em amostras reais. Utilizando o mesmo eletrodo foram realizadas 10 medidas consecutivas em condições de DPV para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pirazinamida, onde foi verificado um desvio padrão de 3,8% para esse conjunto de medidas. Empregando 5 eletrodos diferentes, nas mesmas condições experimentais, foi observado um desvio padrão de 5,5% quando comparada a média obtidas para esse conjunto de medidas.

A quantificação de pirazinamida em amostras de urina humana sobre SPCE/EPH foi testada adotando a mesma metodologia aplicada para a isoniazida, ou seja, primeiramente foi avaliada a influência da presença da amostra sobre a

resposta voltamétrica do sistema. Para isso, voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em 20 mL de solução tampão fosfato pH 1,0, contendo uma concentração de pirazinamida fixa em $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e na presença de diferentes volumes de urina enriquecida com a mesma concentração do analito, sem nenhum pré-tratamento. Foram adicionados a célula, volumes de 20, 100, 200, 300, 500 e 1000 μL de urina e os valores médios relativos de corrente de pico catódica, obtidos dos voltamogramas de pulso diferencial, foram de 98,7, 97,5, 97,1, 96,3, 92,7 e 89,4 %, respectivamente. Os resultados demonstraram que a presença de urina contendo pirazinamida promoveu uma diminuição no sinal voltamétrico, referente a redução do analito. Para soluções contendo mais de 300 μL de amostra de urina, os valores de recuperação foram menores que 95%. Assim, o valor de diluição de 300 μL foi adotado para a determinação de pirazinamida em amostras de urina.

A determinação de pirazinamida em uma amostra de urina enriquecida com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito foi realizada em triplicata, pela diluição direta de uma alíquota de 100 μL da amostra em 10 mL de eletrólito suporte, seguida de quatro adições de uma solução de pirazinamida, resultando em concentrações finais de 2,5, 5, 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores encontrados na determinação de pirazinamida utilizando SPCE/EPH.

Réplica	Valor adicionado / mmol L^{-1}	Valor recuperado / mmol L^{-1}	Recuperação / %
1	0,50	0,52	104
2	0,50	0,51	102
3	0,50	0,48	96

Valores de recuperação próximos foram obtidos, demonstrando a aplicabilidade do método proposto na determinação pirazinamida.

IV.8- AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO, MODIFICADOS POR FILMES DE PH, NA PRESENÇA DE AuTM

IV.8.1- ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DO AuTM SOBRE SPCE POR REDISSOLUÇÃO ANÓDICA

Os eletrodos modificados com filmes de poli-histidina, pela adição direta do poli-aminoácido e pela polimerização eletroquímica a partir da histidina, foram avaliados, utilizando procedimento semelhante ao empregado para os eletrodos não modificados. Os resultados estão apresentados na Figura 82.

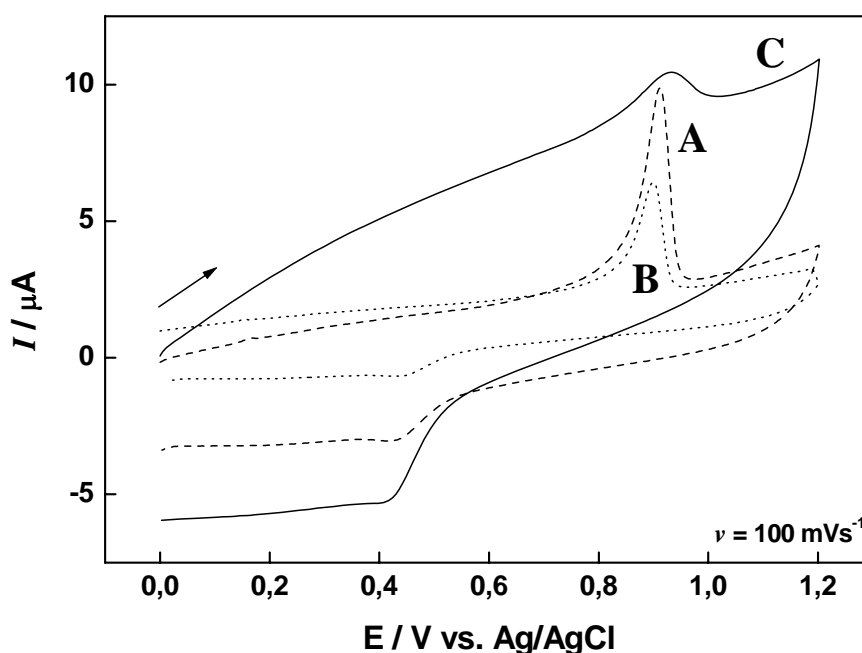


Figura 82: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE não modificado (curva A), para os SPCE modificados pela adição direta da poli-histidina (curva B) e pela polimerização eletroquímica (curva C), em solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após a aplicação de $-1,1 \text{ V}$, por 60 s.

Os voltamogramas demonstraram que, em ambos os casos avaliados, os eletrodos de carbono impresso modificados por poli-histidina não apresentaram resultados melhores que os obtidos para o eletrodo não modificado (curva A). Embora o SPCE/PH, preparado pela adição direta do polímero, tenha apresentado

um perfil voltamétrico muito semelhante ao SPCE não modificado, as intensidades de corrente observadas para os processos de redução e oxidação apresentaram sempre valores menores; para o SPCE/EPH preparado pela eletropolimerização eletroquímica, esse efeito é mais pronunciado, indicando que o filme na superfície do eletrodo não apresenta potencialidade analítica maior que o eletrodo não modificado. No entanto, a prévia pré-concentração do AuTM poderia ser usada para melhorar a resposta do AuTM sobre eletrodos modificados por filmes de PH.

IV.8.2-ESTUDO DO COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DO AUTM SOBRE SPCE POR REDISSOLUÇÃO CATÓDICA

IV.8.2.1- REDUÇÃO VOLTAMÉTRICA DE AUROTIONALATO SOBRE SPCE NÃO MODIFICADO E MODIFICADO POR FILMES DE PH

A possibilidade de pré-concentrar e monitorar o fármaco AuTM, sobre eletrodos de carbono impresso modificados por PH (SPCE/PH) e não modificado (SPCE), foi avaliada comparando-se o comportamento voltamétrico de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} AuTM, em KCl $0,1$ mol L^{-1} , sobre ambos os eletrodos. A redução do fármaco sobre SPCE não modificado apresentou apenas um pico de redução com baixa intensidade de corrente, em potenciais de $-0,07$ V, como mostra a Figura 83a.

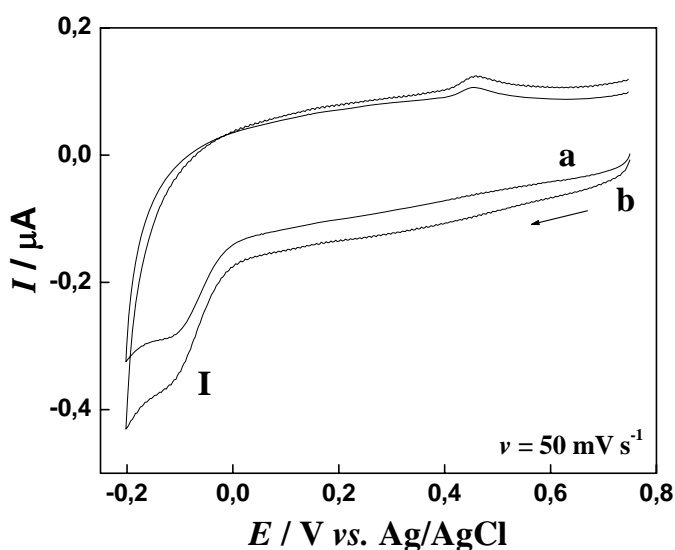


Figura 83: Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE não modificado (curva A) e SPCE/PH (curva B), em solução de KCl $0,1$ mol L^{-1} (pH = 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de AuTM.

Para ambos os eletrodos avaliados, é possível verificar um pico de redução em -0,12 V (pico I), que pode estar relacionado com a redução direta do Au(I) presente no fármaco para Au(0). Posteriormente, foi observado que o potencial apresentou uma grande influência sobre o perfil voltamétrico do AuTM.

Considerando que o AuTM é um complexo de Au (I), investigou-se a seguir a possibilidade de monitoramento do sinal da redução do produto de oxidação do fármaco.

A Figura 84 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos modificados (curva a) e não modificados (curva b), nas mesmas condições experimentais realizadas anteriormente, após eletrólise prévia durante 90 s sob de 0,9 V.

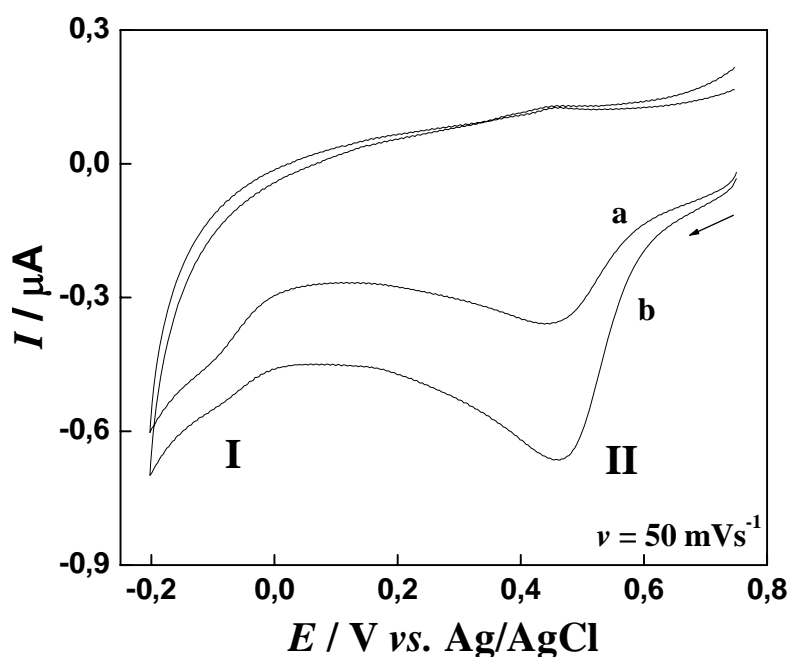


Figura 84: Voltamogramas de varredura cíclica obtidos para o SPCE não modificado (curva a) e SPCE/PH (curva b), em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH = 1,0) contendo 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM, após condicionamento em potencial de 0,9 V, por 90 s .

Em ambas as condições experimentais, observou-se a ocorrência de dois picos de redução nos voltamogramas, que provavelmente podem ser atribuídos à redução dos pares Au³⁺/Au⁺, em 0,48 V (pico II), e um pico de pequena intensidade

em $-0,12$ V, atribuído à redução de Au^+/Au^0 (pico I). Estes picos apresentaram acentuado aumento de corrente sobre o eletrodo modificado por filmes de PH, como mostra a Figura 84b. Este comportamento deve-se a uma possível interação entre o ouro contido no fármaco e o grupo imidazol presente no polímero.

Os parâmetros visando a otimização do método foram investigados, como a influência da aplicação de um potencial na etapa de pré-concentração. Para isso, um potencial foi aplicado por 90s, antes da etapa de varredura. Foram investigados valores de potencial entre 600 mV e 1100 mV (vs. Ag/AgCl) e os resultados estão apresentados na Figura 85.

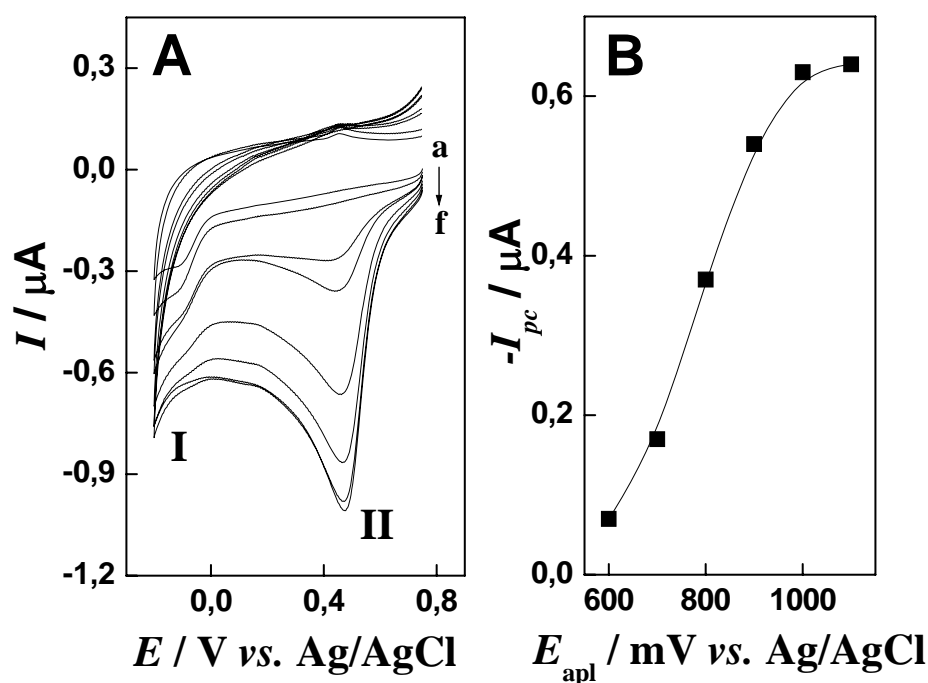


Figura 85: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 90 s de condicionamento, em diferentes valores de potencial: 600 (a), 700 (b), 800 (c), 900, (d), 1000 (e) e 1100 mV (f).

É possível verificar que o potencial apresentou uma grande influência na redução voltamétrica do AuTM, sobre os SPCE/PH. Em valores de potencial menores que 800 mV, foi observado apenas um pico de corrente em $-0,07$ V, provavelmente devido a redução do Au(I) (pico I) presente no complexo AuTM. Para valores de potencial maiores, verificou-se o desaparecimento do pico supracitado e

o surgimento de um pico de redução em $E = 0,43$ V (pico II). A corrente de pico catódica aumentou para valores de potencial entre 800 e 1000 mV; acima deste valor, não apresentou variação significativa.

Visando um melhor entendimento do efeito do potencial sobre a resposta voltamétrica do eletrodo, foram registrados voltamogramas cíclicos do AuTM, iniciando a varredura em diferentes valores de potencial. A Figura 86 apresenta os voltamogramas obtidos.

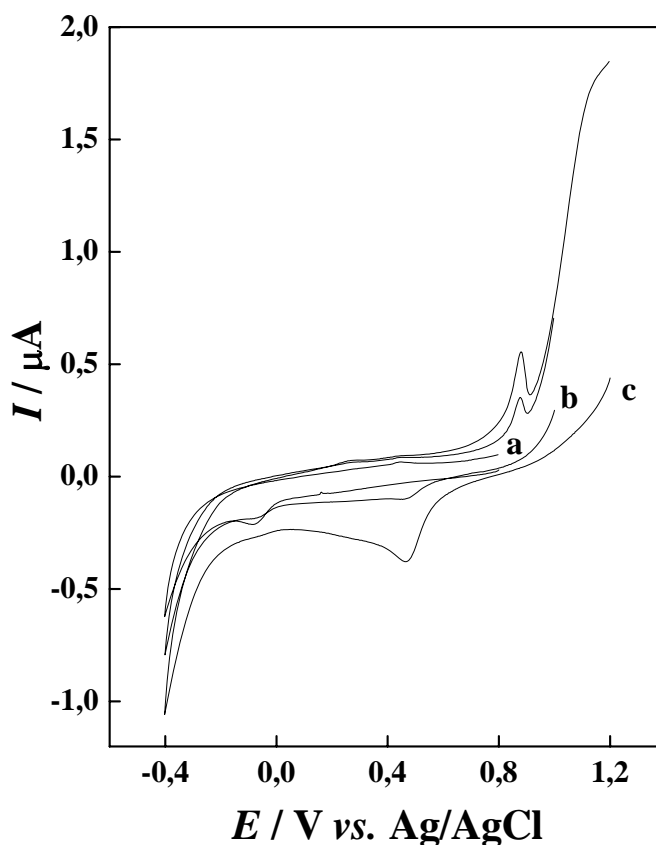


Figura 86: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, modificado pela adição direta do polímero, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,0$) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, iniciando a varredura em diferentes valores de potencial: 800 (a), 1000 (b) e 1200 mV (c).

Observando a Figura 86, verifica-se que o comportamento voltamétrico do AuTM, sobre o eletrodo modificado, variou de acordo com o potencial de início da varredura. Para varreduras iniciadas em $E \leq 800$ mV, foi verificado apenas um pico de redução em $-0,07$ V, que pode estar relacionado com a redução direta de

Au(I)/Au(0) no fármaco. Nenhum pico de oxidação na varredura reversa foi observado. No entanto, para varreduras iniciadas em $E \geq 800$ V, foi observado o surgimento de um novo pico de redução em 0,43 V, com concomitante desaparecimento do pico de redução em -0,07 V, o qual pode estar relacionado a redução do Au(III)/Au(I), após prévia oxidação do complexo. Na varredura reversa, foi observado um sinal de oxidação em 0,81 V, atribuído a formação de Au(III); em potenciais mais positivos que 1000 mV, foi observado um sinal de oxidação mal definido, que além de estar relacionado com a oxidação do ligante do complexo de Au(I), pode ser atribuído também a oxidação do solvente.

Visando um melhor entendimento dos processos redox, foram realizadas varreduras cíclicas de potencial, em soluções de AuTM e de Au(III), utilizando o SPCE/PH pré-concentração em valores de potencial de 800 e 1000 mV. Os resultados estão apresentados na Figura 87.

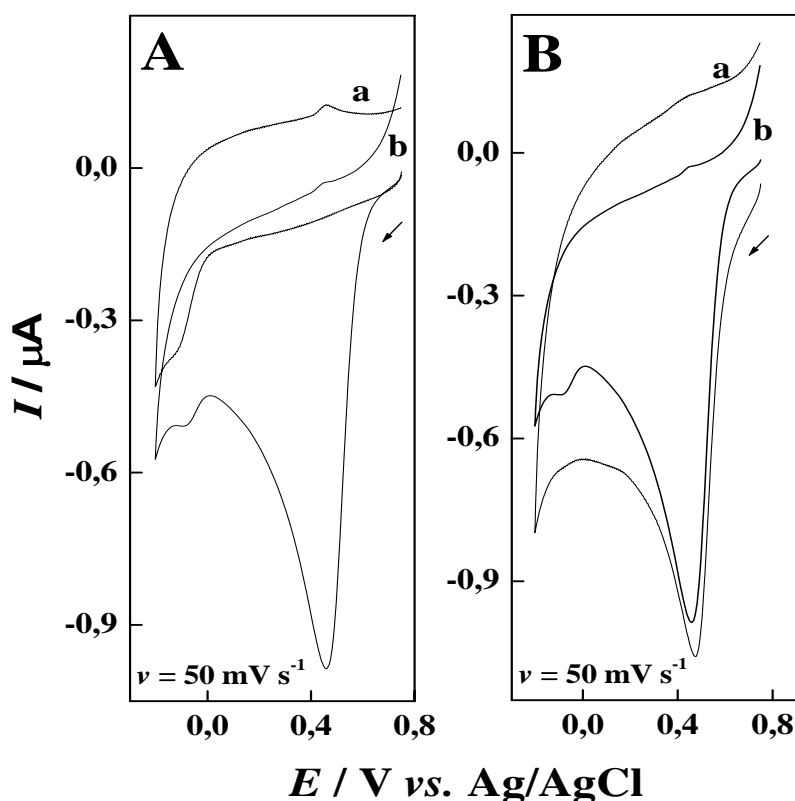


Figura 87: Voltamogramas cíclicos obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH = 1,0), contendo 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM (a), e 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de Au³⁺ (b), pré-acumulado por 90 s, em potencial de 800 (A) e 1000 mV (B).

Para a redução do AuTM, sobre o eletrodo modificado e submetido a pré-concentração em 800 mV (A), foi verificado um comportamento voltamétrico semelhante ao observado anteriormente, ou seja, apenas um pico de redução em -0,07 V. Já para o Au(III), foram observados dois picos de redução, um em 0,43 V e outro em -0,07 V. Quando o eletrodo foi submetido a pré-concentração em um potencial de 1000 mV (B), foi verificado que o AuTM exibiu um comportamento voltamétrico muito parecido ao observado para os íons Au(III), apresentando um pico de redução em 0,43 V, com intensidade de corrente de pico catódica similar (variação menor que 9%). Esses resultados sugerem que o efeito de potencial está relacionado com a oxidação do Au(I) presente na molécula do fármaco AuTM, com conseqüente formação de Au(III). Estudos realizados com a solução contendo Au(III), demonstraram que a corrente pico de redução, observada em 0,43 V, não apresentou grande influência do potencial de pré-acumulação, pois em solução já existe Au(III). Em contrapartida, para o AuTM, foi necessária a aplicação de um potencial, a fim de promover a formação de Au(III). Desta forma, é possível propor um método capaz de ser utilizado para a determinação de ambas as espécies. Para fins analíticos, o potencial de 1000 mV foi usado nos demais experimentos.

Experimentos foram conduzidos utilizando soluções contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de íons Au(III), na presença e na ausência de íons cloreto. Em soluções contendo 0,1 mol L⁻¹ de KNO₃ como eletrólito suporte, ajustadas em pH 1,0, foi observado apenas um pequeno aumento da corrente de redução para o SPCE/PH, quando comparado ao eletrodo não modificado. Para os voltamogramas obtidos na presença de 0,1 mol L⁻¹ de íons cloreto (KCl), o aumento na corrente de pico catódico é muito mais significativo. Esse efeito provavelmente deve estar relacionado com a formação de espécies complexas entre os cátions Au³⁺ e os ânions Cl⁻. Os íons Au³⁺ podem se coordenar por quatro pontos; na literatura estão relatados os valores das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os íons Cl⁻ e Au³⁺, onde os logaritmos das constantes são $k_1 = 9,26$, $k_2 = 8,31$, $k_3 = 7,31$, $k_4 = 6,16$ [122]. Utilizando esses valores, foi possível construir um diagrama de distribuição de espécies, relacionando os complexos de ouro e as concentrações de íons cloreto. A Figura 88 apresenta o diagrama construído.

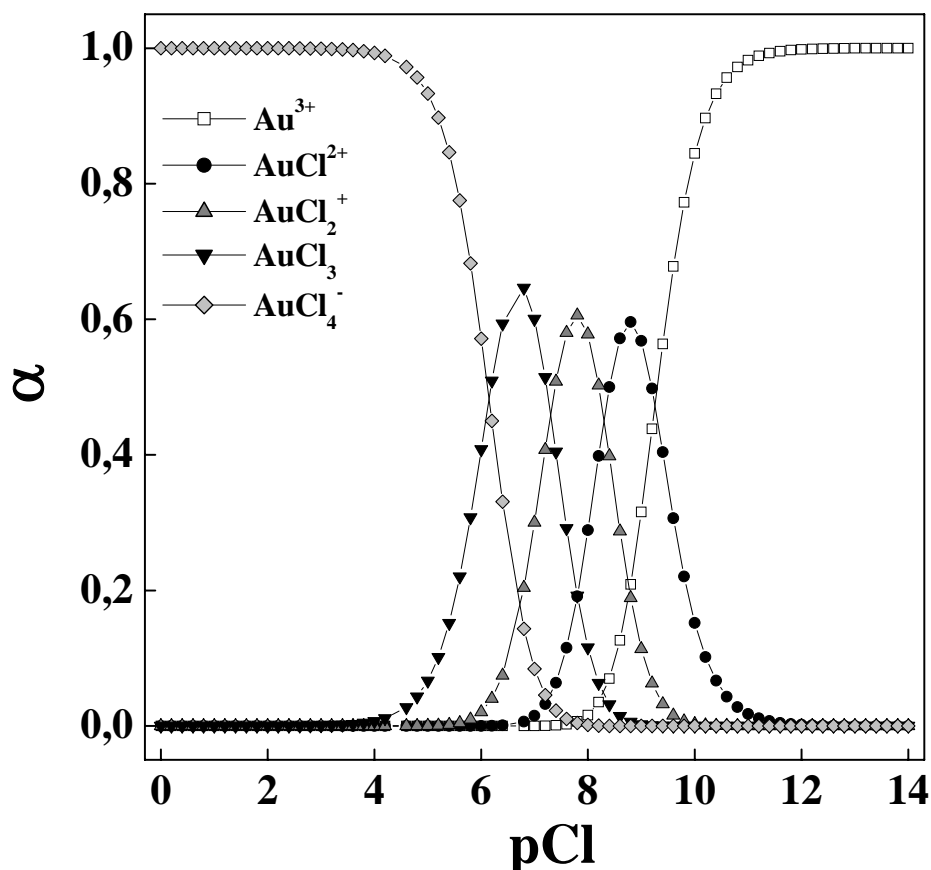
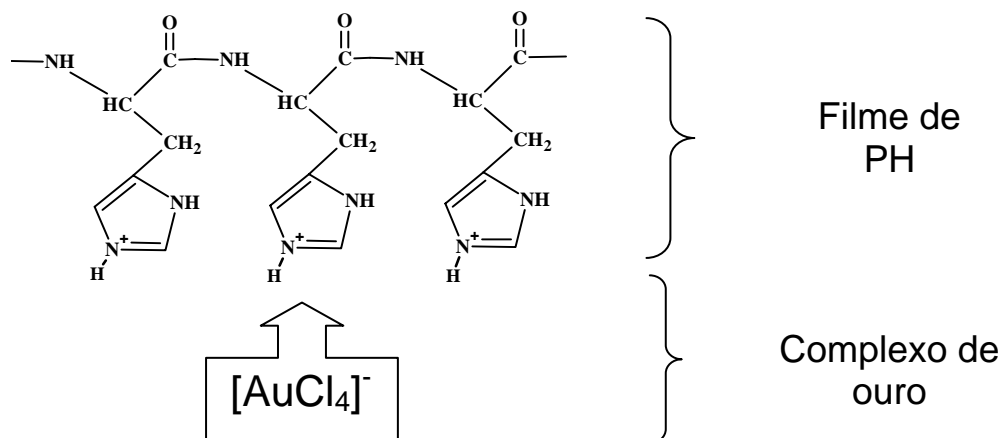


Figura 88: Diagrama de distribuição de espécies complexas formadas entre os íons Au^{3+} e Cl^- , em função do logaritmo da concentração de íons cloreto.

Observando o diagrama ilustrado na Figura 88, é possível verificar que a presença de espécies complexas formadas entre os íons ouro, contendo menos que quatro íons cloreto como ligantes, é mais pronunciada para concentrações menores que 10^{-4} mol L^{-1} do ligante. Para a concentração de íons cloreto avaliada ($0,1$ mol L^{-1}), é possível concluir que existe majoritariamente a espécie tetra coordenada $[AuCl_4]^-$. Embora trabalhos relatados na literatura demonstrem que é possível a formação de complexos entre a histidina e os íons $Au(III)$ [123], sugere-se que o eletrodo de carbono impresso, modificado por filme de poli-histidina, apresenta seu mecanismo de funcionamento baseado em uma interação eletrostática entre o filme de PH protonado e a espécie $[AuCl_4]^-$ como é ilustrado no Esquema 2.



Esquema 2: Representação da interação entre o filme de PH e o complexo de ouro.

A influência do pH na resposta voltamétrica do sistema foi estudada entre valores de 1,0 e 4,0, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de AuTM, sendo os resultados apresentados na Figura 89.

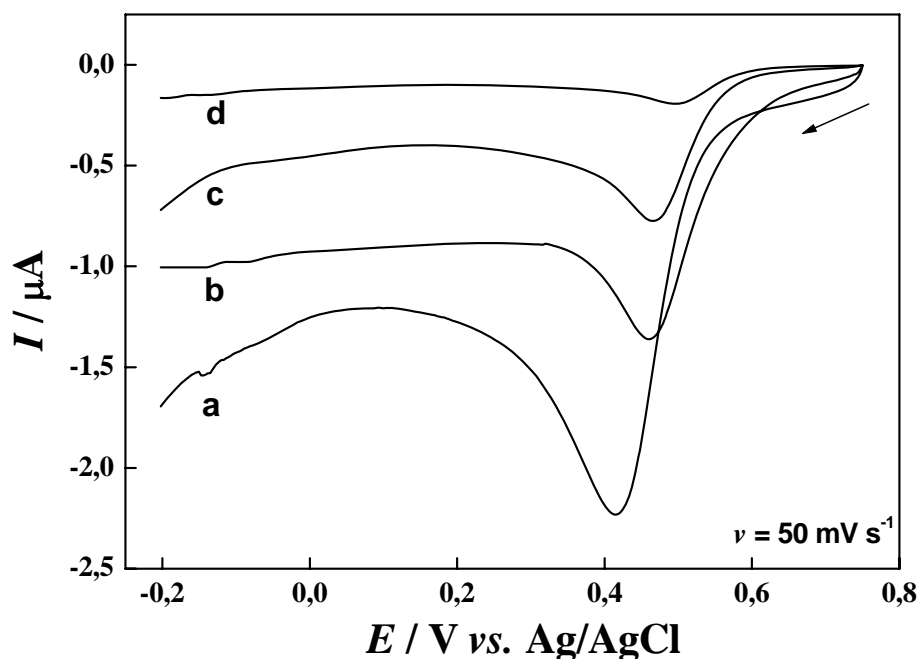


Figura 89: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 4,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM, ajustada em diferentes valores de pH: 1,0 (a), 2,0 (b), 3,0 (c) e 4,0 (d), após 60 s de pré-concentração, em 1,0 V.

Verificou-se uma diminuição do valor da corrente de pico catódica com o aumento do pH até 4,0. Como valores de pH menores que 1,0 podem ser danosos ao material de construção dos eletrodos de carbono impresso, optou-se em realizar os demais estudos em solução de KCl, ajustada para pH 1,0.

IV.8.2.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ANÁLISE

Para a etapa de pré-concentração, o tempo de aplicação do potencial escolhido foi avaliado, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM, em tempos entre 0 e 90 s. Os resultados estão mostrados na Figura 90.

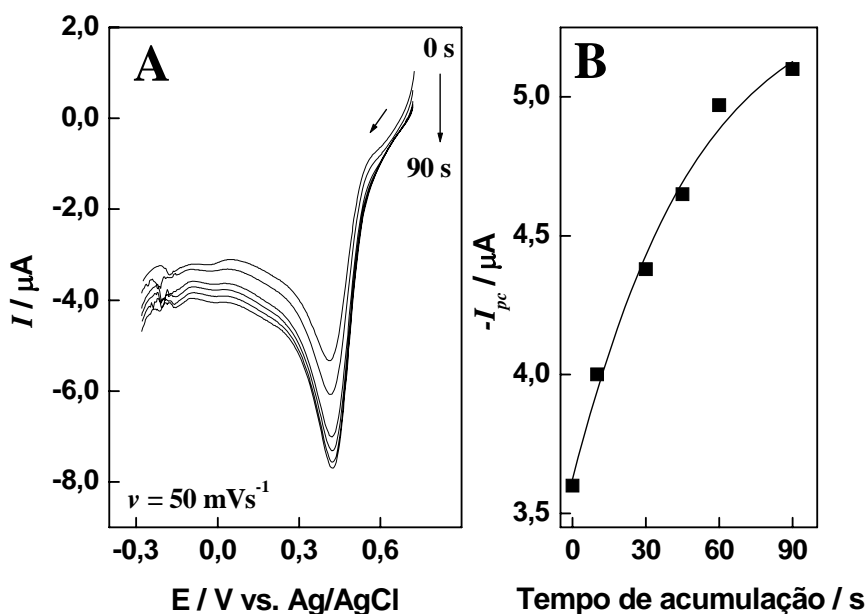


Figura 90: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH = 1,0) contendo 8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de AuTM, após diferentes tempos de acúmulo, sob aplicação de 0,8 V (vs. Ag/AgCl), a 50 mVs⁻¹ (curva A) e os resultados obtidos (curva B).

Conforme pode ser visualizado pela Figura 90, houve um incremento da corrente de pico com o aumento do tempo de pré-acumulação, indicando uma rápida saturação após 60 s; em tempos maiores, a corrente não apresentou variações significativas, o que permitiu a escolha do tempo de 60 s.

A influência da velocidade de varredura, sobre a corrente de pico catódica, foi investigada no intervalo entre 5 mV s^{-1} e 150 mV s^{-1} . Os resultados estão apresentados na Figura 91.

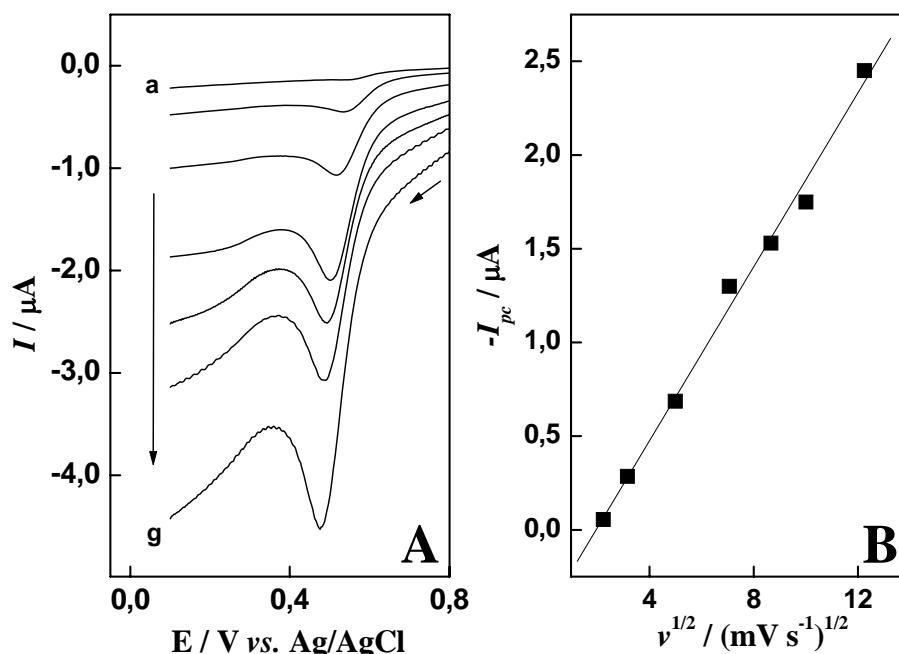


Figura 91: Voltamogramas de varredura linear para o SPCE/PH, modificado pela adição direta do polímero, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 60 s de condicionamento, sob aplicação de $0,8 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl KCl sat.), em diferentes velocidades de varredura (curva A). Variação da corrente de pico catódica em função de $v^{1/2}$ (curva B).

Pode-se observar um aumento da corrente de pico catódica com o aumento da velocidade de varredura, como mostra os voltamogramas da curva A. A partir dos resultados, foi construído um gráfico da corrente de pico catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, onde foi verificado um comportamento linear entre elas, segundo a equação $I_{pc} (\mu\text{A}) = -4,55 \times 10^{-2} + 2,32 \times 10^{-2} v^{1/2}$. O comportamento observado para o sistema sugere um controle difusional. Para fins analíticos, foi adotada a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Embora velocidades superiores apresentem valores maiores de corrente, foi observado um aumento da corrente da linha base após o pico, o que diminui a resolução do voltamograma.

Depois de estudados tempo e potencial de acumulo e velocidade de varredura, foram avaliados os diferentes procedimentos para a preparação do filme

de PH. A Figura 92 apresenta voltamogramas de varredura linear correspondentes a redução de $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0, sobre eletrodos de carbono impresso.

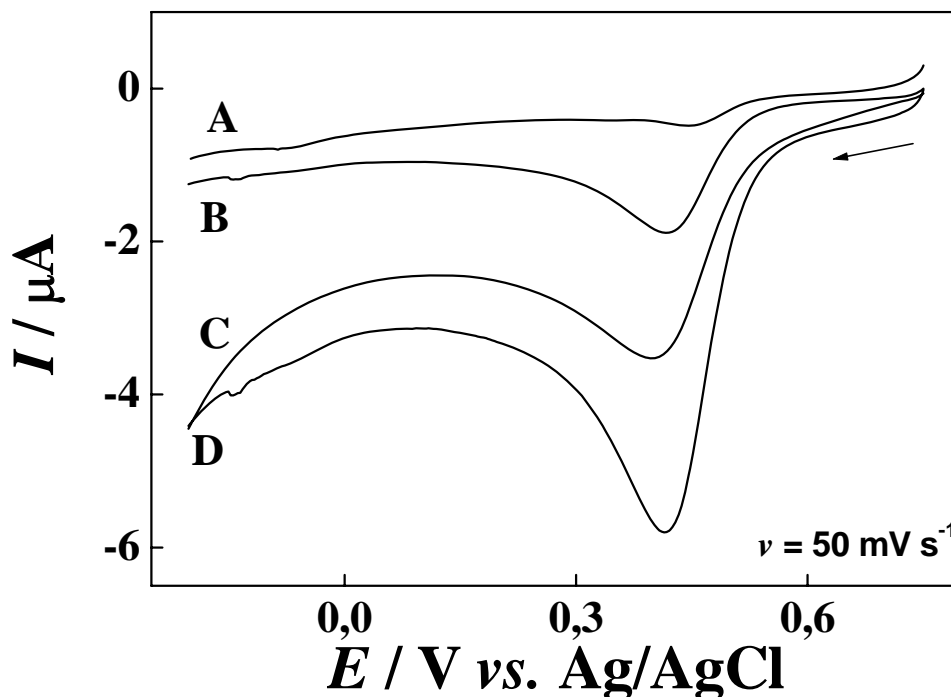


Figura 92: Voltamogramas de varredura linear, obtidos para eletrodos de carbono impresso não modificado (A) e modificados SPCE/EPH (B), SPCE/GLU-PH (C) e SPCE/PH (D), em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, após 60 s de pré-concentração, em 1,0 V.

O AuTM foi reduzido sobre o eletrodo de carbono impresso modificado por filmes de PH exibiu um pico de redução em 0,45 V (vs. Ag/AgCl). Observou-se o mesmo perfil voltamétrico para os três procedimentos de modificação dos eletrodos. O eletrodo preparado pela polimerização eletroquímica não forneceu um filme com a mesma quantidade de sítios disponíveis para a interação com o analito, quando comparado aos outros procedimentos de modificação. Observou-se que a modificação da superfície pela adição direta do poliaminoácido levou a uma maior eficiência na pré-concentração do AuTM, enquanto que a modificação utilizando o glutaraldeído apresentou um valor intermediário. A utilização do glutaraldeído como agente ancorante está ligada a uma melhora na aderência da poli-histidina à superfície eletródica. No entanto, parte dos grupos $-\text{NH}_2$ presentes no poliaminoácido são utilizados durante a ligação entre o polímero e o glutaraldeído.

Assim, essa reação diminuiu o número de sítios disponíveis para a interação com o AuTM, levando a uma menor disposição dos sítios e conseqüente diminuição da corrente correspondente do AuTM. Baseado nisso, o eletrodo construído pela adição direta do poli-aminoácido foi empregado para os demais estudos.

A Tabela 13 apresenta os resultados correspondentes aos parâmetros estudados e os respectivos valores otimizados para a determinação de AuTM, por voltametria de varredura linear.

Tabela 13: Parâmetros utilizados na obtenção da curva analítica para o AuTM empregando um SPCE/PH.

Parâmetro estudado	Intervalo avaliado	Valor escolhido
Tempo de pré-concentração	0 s a 90 s	60 s
Potencial de acumulação	0,6 V a 1,1 V	1,0 V
pH	1,0 a 4,0	1,0
Velocidade da varredura	5 mV s ⁻¹ a 150 mV s ⁻¹	50 mV s ⁻¹

Empregando as melhores condições de análise, foi construída uma curva analítica em triplicata, no intervalo de concentração entre $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AuTM. Os voltamogramas lineares representativos são mostrados na Figura 93-A e a curva analítica na Figura 93-B.

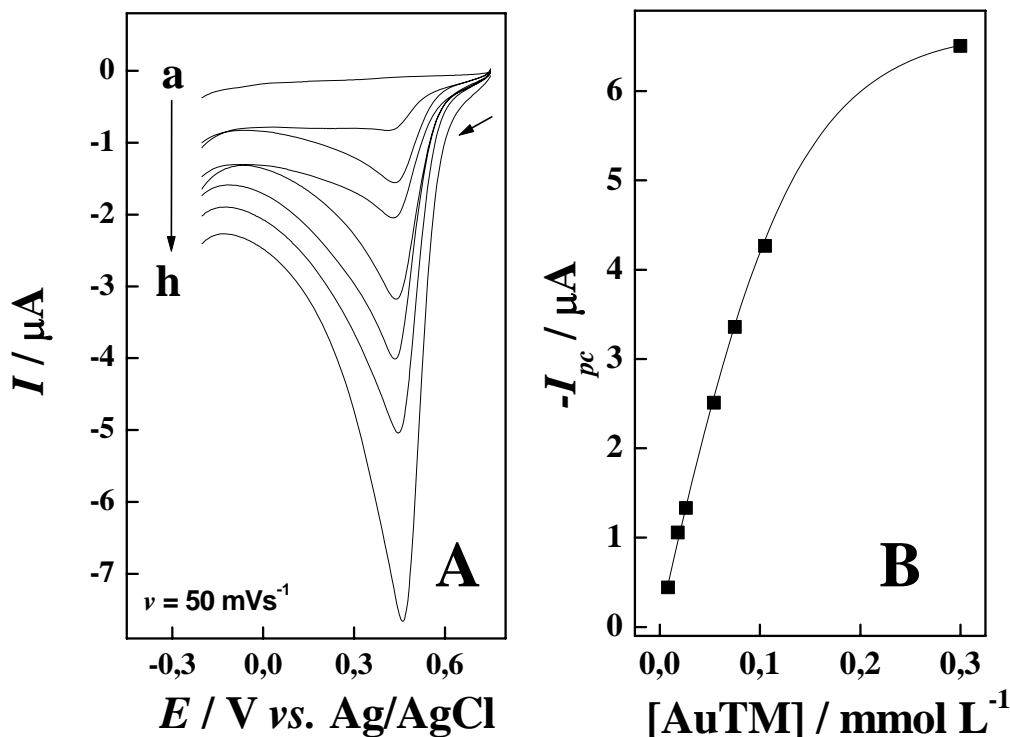


Figura 93: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl ($\text{pH} = 1,0$), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) $0,0$, (b) $8,0 \times 10^{-6}$, (c) $1,8 \times 10^{-5}$, (d) $2,6 \times 10^{-5}$, (e) $5,4 \times 10^{-5}$, (f) $7,5 \times 10^{-5}$, (g) $1,1 \times 10^{-4}$ e (h) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando as condições otimizadas.

A curva analítica apresentou (Figura 93-B) um intervalo de linearidade entre a resposta voltamétrica do SPCE/PH e a concentração de AuTM de $8,0 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,28 + 39,2 C_{\text{AuTM}} (\text{mmol L}^{-1})$. Em valores superiores a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, observou-se uma pequena variação na corrente de pico catódica, sugerindo a saturação dos sítios. O método ofereceu uma sensibilidade de $39,2 \mu\text{A L mmol}^{-1}$ e um limite de detecção ($3 \times$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.8.2.3. UTILIZAÇÃO DAS VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL E DE ONDA QUADRADA

Visando melhorar os limites de detecção e a sensibilidade voltamétrica obtidos com o SPCE/PH, para determinação de AuTM, o eletrodo modificado foi avaliado empregando outras técnicas voltamétricas, como a voltametria de pulso

diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV). Algumas condições experimentais estudadas anteriormente foram adotadas, como pH 1,0, tempo de pré-concentração de 60 s e potencial de acumulação de 1,0 V. Para ambas as técnicas adotadas, diversos parâmetros foram avaliados e otimizados.

A Figura 94 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial, obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em valores de amplitudes de pulso variando entre 5 e 100 mV.

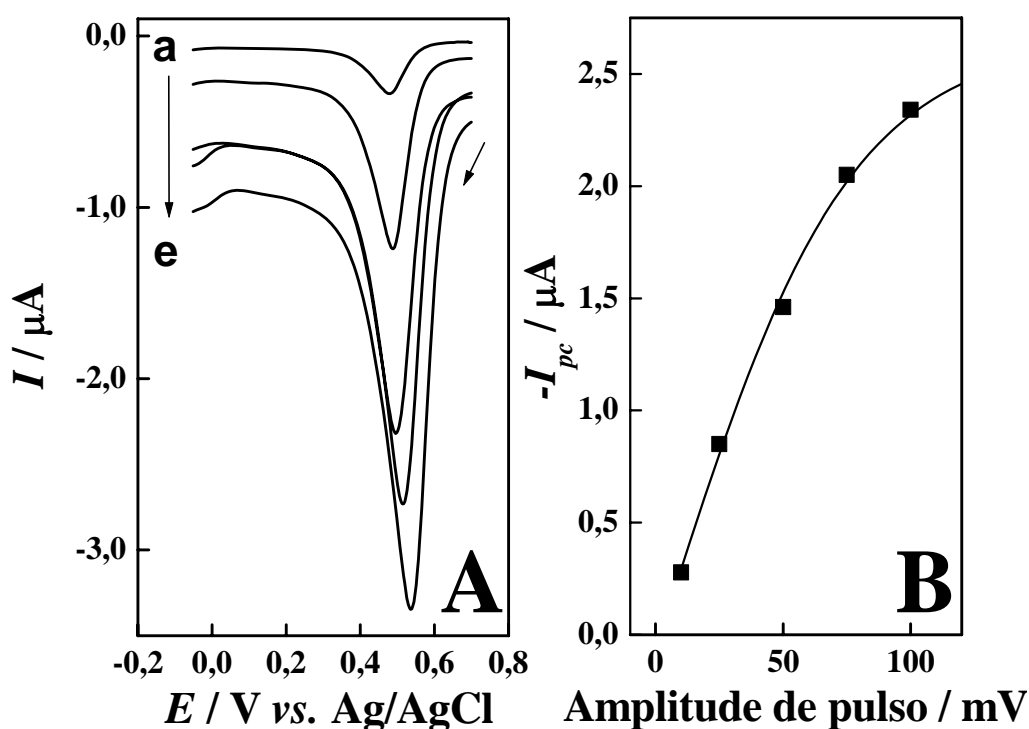


Figura 94: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes valores de amplitude de pulso: (a) 5, (b) 25, (c) 50, (d) 75 e (e) 100 mV.

Observou-se um aumento significativo da corrente de pico catódica com o aumento da amplitude de pulso, entre 5 e 100 mV; para amplitudes de pulso maiores houve uma diminuição na resolução voltamétrica. Assim, escolheu-se a amplitude de pulso de 50 mV, a qual apresentou melhor resolução voltamétrica e um valor satisfatório de corrente.

O estudo sobre a influência do tempo de duração do pulso de potencial foi realizado entre 5 a 100 ms, nas mesmas condições adotadas para o estudo anterior. A Figura 95-A apresenta os voltamogramas obtidos, para os diferentes tempos

avaliados. Os respectivos valores de corrente catódica, em função do tempo, foram colocados em um gráfico na Figura 95-B.

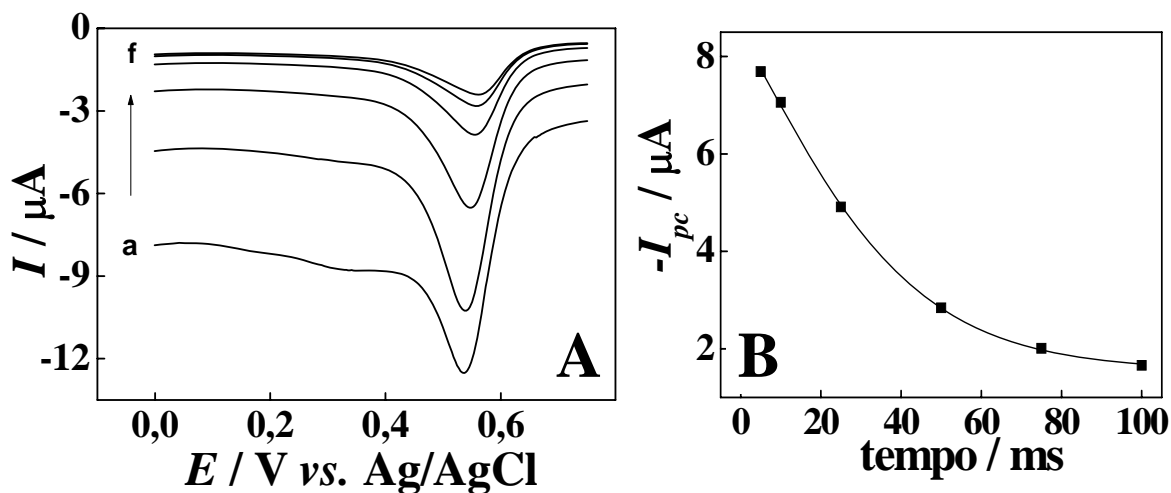


Figura 95: Voltamogramas de pulsos diferencial (A) obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes valores de amplitude de pulso: (a) 5, (b) 10, (c) 25, (d) 50, (e) 75 e (f) 100 ms. Variação da corrente de pico catódica com o tempo de pulso (B).

Sob amplitude de pulso de 50 mV, é possível verificar que existe uma queda no valor da corrente de pico à medida que se aumenta o tempo de duração do pulso. De acordo com a literatura [118], com o aumento do tempo de pulso existe uma diminuição da corrente difusional, o que pode levar a diminuição do sinal amostrado. Deste modo, embora o tempo de duração do pulso de 5 ms tenha fornecido a maior corrente de pico catódica, o perfil voltamétrico obtido apresenta uma leve ondulação entre 0,4 e 0,2 V, prejudicando, assim, a resolução voltamétrica. Por isso, escolheu-se um tempo de 10 ms para os demais estudos.

A velocidade de varredura foi avaliada entre 5 e 30 mV s^{-1} , sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 96.

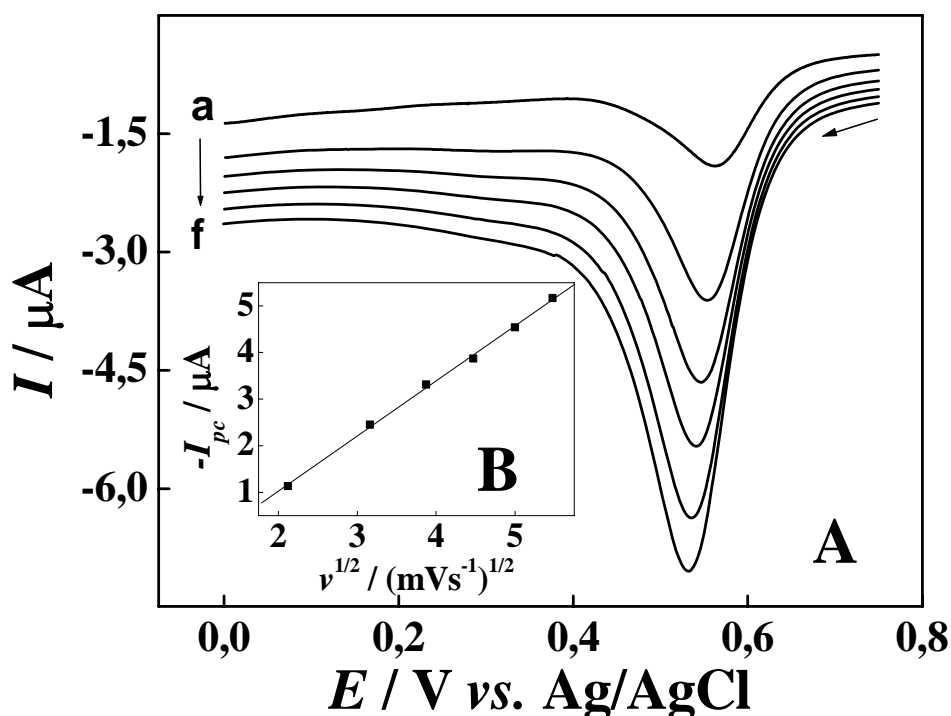


Figura 96: Voltamogramas de pulso diferencial (A) obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes velocidades de varredura: (a) 5, (b) 10, (c) 15, (d) 20, (e) 25 e (f) 30 mVs^{-1} . Variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura (B).

Como pode ser verificado pela Figura 96, com a variação da velocidade de varredura verificou-se um aumento da corrente de pico catódica, proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 96-B). Para os demais estudos, uma velocidade de 20 mVs^{-1} foi escolhida adequada, pois foi obtida a melhor concordância entre o perfil voltamétrico e a corrente de pico catódica.

Depois de estudadas e otimizadas as condições experimentais, as quais estão sumarizadas na Tabela 14, foi construída uma curva analítica para o SPCE/PH, utilizando a voltametria de pulso diferencial. A Figura 97 apresenta os voltamogramas obtidos em diferentes concentrações de AuTM.

Tabela 14: Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH por voltametria de pulso diferencial.

Parâmetro estudado	Intervalo avaliado	Valor escolhido
Amplitude de pulso	5 mV a 150 mV	50 mV
Tempo de pulso	5 ms a 100 ms	10 ms
Velocidade de varredura	5 mVs ⁻¹ a 30 mV s ⁻¹	20 mV s ⁻¹
Potencial de acumulação	0,6 V a 1,1 V	1,0 V
Tempo de pré-concentração	0s a 90 s	60 s
pH	1,0 a 4,0	1,0

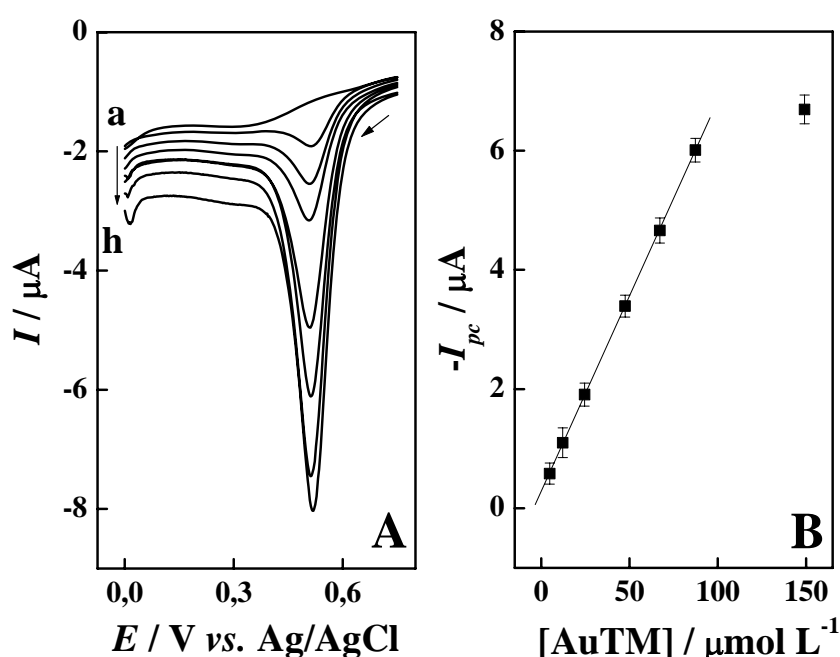


Figura 97: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o SPCE/PH, em solução de 0,1 de KCl (pH = 1,0), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) 0,0, (b) $4,8 \times 10^{-6}$, (c) $1,2 \times 10^{-5}$, (d) $2,5 \times 10^{-5}$, (e) $4,8 \times 10^{-6}$, (f) $6,7 \times 10^{-5}$, (g) $8,7 \times 10^{-5}$ e (h) $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Curva analítica B.

A curva analítica apresentou um intervalo de linearidade entre a resposta voltamétrica do SPCE/PH e a concentração de AuTM de $4,9 \times 10^{-6}$ a $8,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, segundo a equação: $-I_{pc} (\mu A) = 2,99 \times 10^{-1} + 6,5 \times 10^{-2} C_{AuTM} (\mu mol L^{-1})$. Em valores superiores a $90 \mu mol L^{-1}$, observa-se uma estagnação da corrente, sugerindo a saturação dos sítios presentes na superfície do eletrodo. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \times$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $1,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Estudos foram realizados visando avaliar a potencialidade do SPCE/PH, para determinação de AuTM, sobre condições de voltametria de onda quadrada. Para isso, dois parâmetros foram investigados e otimizados: amplitude de pulso de potencial e frequência. A Figura 98 apresenta a variação dos valores de corrente de pico obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, empregando diferentes amplitudes de pulso.

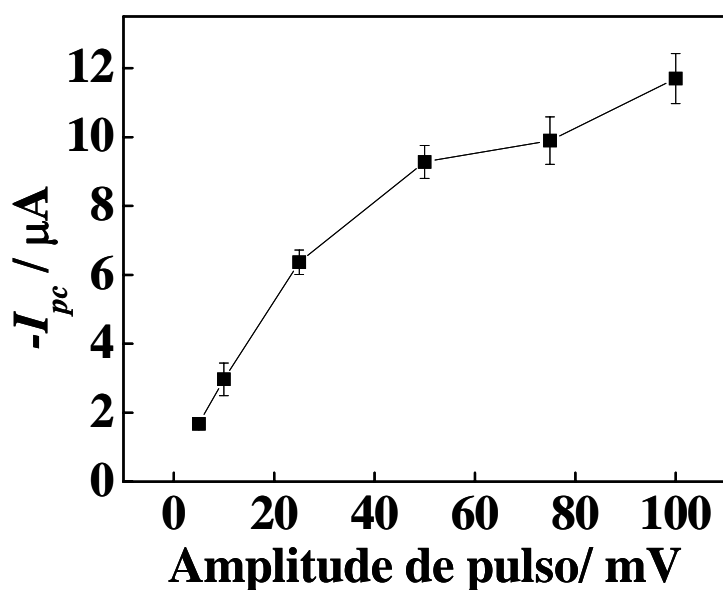


Figura 98: Variação da corrente de pico catódica em função das diferentes amplitudes empregadas (B).

Pode ser observado um aumento da corrente de pico com o aumento da amplitude de pulso. Porém, para valores acima de 75 mV, foi verificado o aparecimento de uma onda mal definida, entre 0,45 V e 0,17 V, o prejudica a resolução do pico de redução de interesse. Desta maneira, optou-se por realizar os demais estudos aplicando uma amplitude de 50 mV.

A frequência foi estudada entre 10 e 150 Hertz, nas mesmas condições supracitadas, sendo os resultados ilustrados na Figura 99.

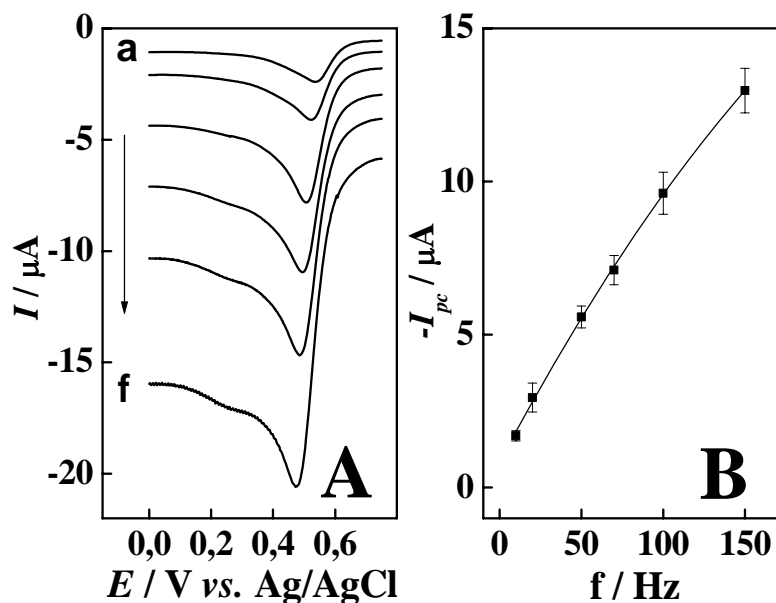


Figura 99: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 1,0) contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, em diferentes valores de freqüência: (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100 e (f) 150 Hz. Variação da corrente de pico catódica em função das diferentes freqüências estudadas (B).

Analisando os voltamogramas mostrados na Figura 99A, pode-se observar um aumento da corrente de pico catódica, à medida que se aumenta a freqüência. Porém, para valores de freqüência acima de 75 Hz, houve um acréscimo significativo da corrente da linha base, o que compromete o perfil e a resolução do voltamograma. Assim, uma freqüência de 75 Hz foi escolhida adequada e aplicada para os demais estudos.

Depois de otimizadas amplitude de pulso e freqüência, além de outras condições experimentais, descritas na Tabela 15, foi obtida uma curva analítica para o SPCE/PH, em solução contendo diferentes concentrações de AuTM. Os voltamogramas estão apresentados na Figura 100.

Tabela 15: Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH por voltametria de onda quadrada.

Parâmetro estudado	Intervalo avaliado	Valor escolhido
Amplitude de pulso	5 mV a 150 mV	50 mV
Frequência	10 Hz a 150 Hz	10 Hz
Potencial de acumulação	0,6 V a 1,1 V	1,0 V
Tempo de pré-concentração	0s a 90 s	60 s
pH	1,0 a 4,0	1,0

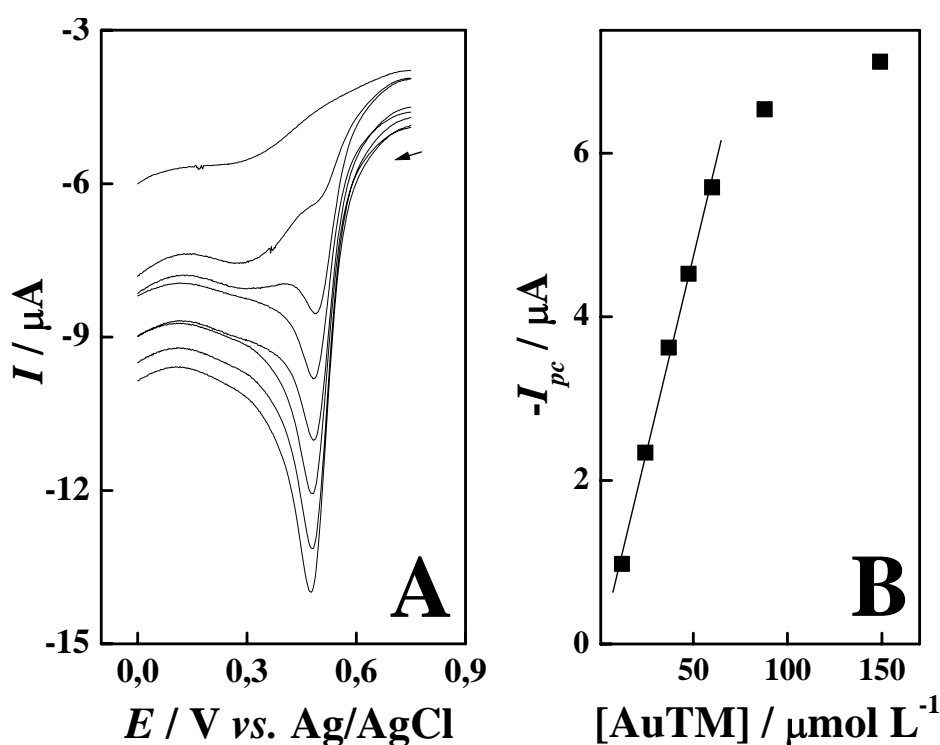


Figura 100: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o SPCE/PH, em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl ($\text{pH} = 1,0$), na presença de diferentes concentrações de AuTM: (a) $0,0$, (b) $1,2 \times 10^{-5}$, (c) $2,5 \times 10^{-5}$, (d) $3,7 \times 10^{-5}$, (e) $4,7 \times 10^{-5}$, (f) $6,0 \times 10^{-5}$, (g) $8,8 \times 10^{-5}$ e (h) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando as condições otimizadas.

A curva analítica apresentou um intervalo de linearidade entre a resposta voltamétrica do SPCE e a concentração de AuTM de $1,2 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a equação: $-I_{pc} (\mu\text{A}) = 8,2 \times 10^{-2} + 9,62 \times 10^{-2} C_{\text{AuTM}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. Em valores

superiores a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se uma menor variação da corrente, indicando a saturação da superfície eletródica. O método ofereceu um limite de detecção ($3 \times$ desvio padrão do branco/sensibilidade) de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.8.2.4 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E APLICAÇÃO DO MÉTODO

As características analíticas de cada técnica empregada, para determinação de AuTM utilizando eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH, estão sumarizadas na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados obtidos por diferentes técnicas, utilizando SPCE/PH, para a determinação de AuTM.

Técnica	Região Linear / mol L^{-1}	Limite de Detecção
LSV	$8,0 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
DPV	$4,9 \times 10^{-6} - 8,7 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
SWV	$1,2 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

Das técnicas voltamétricas avaliadas, observou-se uma maior sensibilidade para a voltametria de onda quadrada, porém, uma pequena faixa de resposta linear. Em contraste, a voltametria de varredura linear apresentou um razoável intervalo de linearidade, mas com limite de detecção mais elevado do que o verificado com a voltametria de pulso diferencial. Esta última, por sua vez, apresentou os valores mais satisfatórios, sendo, assim, escolhida para que ser posteriormente aplicada na determinação de AuTM em amostras reais.

A influência dos componentes endógenos presentes na urina humana, sobre o método para determinação de AuTM, foi avaliada. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os eletrodos SPCE/PH, em 10 mL de solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH = 1,0), contendo uma concentração de AuTM fixa em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, foram obtidos na ausência e na presença de diferentes volumes de urina, enriquecida com a mesma concentração do analito, sem nenhum pré-tratamento. Os voltamogramas de pulso diferencial e os respectivos valores de corrente estão apresentados na Figura 101.

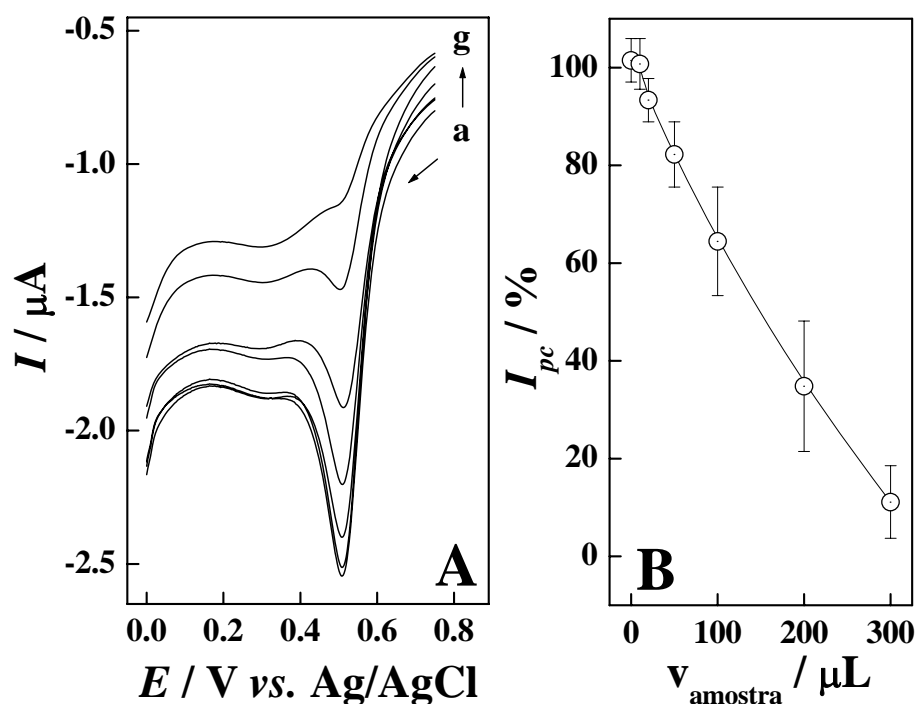


Figura 101: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,0), contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, na presença de diferentes volumes de urina: 0 (a), 10 (b), 20 (c), 50 (d), 100 (e), 200 (f) e 300 μL (g). (B) Variação percentual da corrente de pico catódica em função do volume de urina adicionado.

Os voltamogramas indicam que a adição de urina humana, sem qualquer tratamento prévio, na célula contendo aurotiomalato promoveu uma diminuição acentuada do sinal voltamétrico, correspondente a corrente de redução de Au(III)/Au(I) no fármaco. Estes resultados podem ser melhor evidenciados pela Fig 101B, onde a diminuição da corrente pode ser atribuída a uma possível interação entre analito e grupos contendo enxofre e nitrogênio presentes em compostos comumente encontrados na urina, tais como soro albumina e uréia, o que resulta em uma diminuição na disponibilidade do analito para interagir com o filme de PH presente na superfície do eletrodo de carbono impresso. Baseado nisso, pode-se constatar que utilizando o método proposto, não é possível realizar a determinação direta de AuTM presente em urina, sem a realização de uma etapa de pré-tratamento da amostra.

A etapa de pré-tratamento da amostra consistiu na adição de 1,0 mL de HCl concentrado em 10 mL da amostra enriquecida, seguida por aquecimento a 80 °C, durante 20 minutos [124]. A Figura 102 apresenta a porcentagem de variação da corrente de pico catódica, promovida pela quantidade crescente de urina antes (B) e após (A) pré-tratamento da amostra.

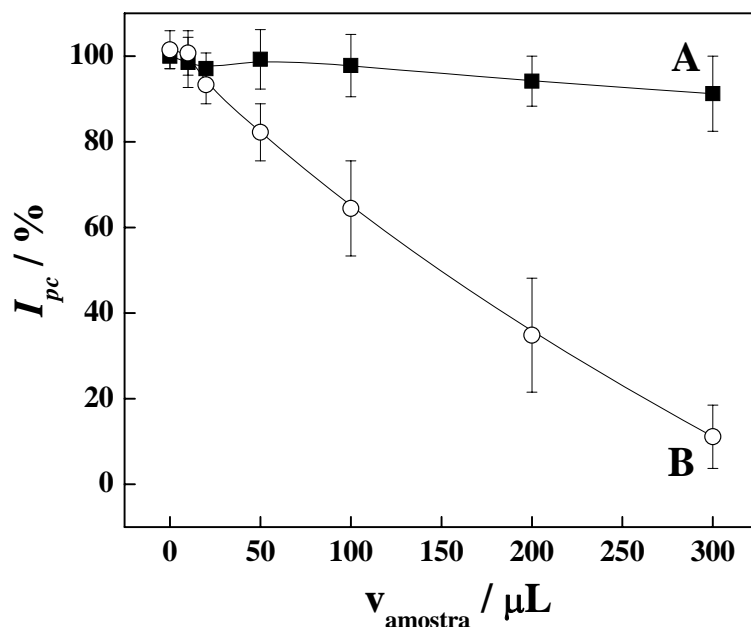


Figura 102: Variação percentual da corrente de pico catódica, em função do volume de urina adicionado: com pré-tratamento (A) e sem pré-tratamento (B).

A aplicação do método na determinação de AuTM em urina humana foi realizada, usando o seguinte procedimento: uma amostra de 10 mL de urina humana de uma pessoa saudável foi enriquecida com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de AuTM, submetida ao procedimento de pré-tratamento (seção experimental). Posteriormente, uma alíquota de 200 μL dessa amostra foi diluída com KCl (pH = 1,0), até um volume final de 10 mL. Em seguida, foi feita a análise voltamétrica usando eletrodo SPCE/PH. A determinação foi realizada em triplicata, pelo método de adição de solução padrão de AuTM ($n = 4$), fornecendo concentrações finais na célula eletroquímica de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 μmol L⁻¹, com valores de recuperação entre 97 e 104 %. Estes resultados demonstram a aplicabilidade do método proposto na determinação de AuTM amostras de urina.

IV.9 - APLICAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO MODIFICADOS POR FILMES DE PH NA ANÁLISE DE CRÔMIO

IV.9.1- COMPORTAMENTO VOLTAMÉTICO DO CRÔMIO SOBRE SPCE NÃO MODIFICADO E MODIFICADO POR FILMES DE PH

Os eletrodos de carbono impresso, modificados por filmes de poli-histidina, foram avaliados para análise de crômio VI, em solução tampão acetato (pH 4,4) contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dicromato de potássio (Cr₂O₇²⁻). Os voltamogramas cíclicos obtidos após 1 minuto de pré-concentração para o SPCE, antes e após a modificação por filmes de poli-histidina (SPCE/PH), estão apresentados na Figura 103.

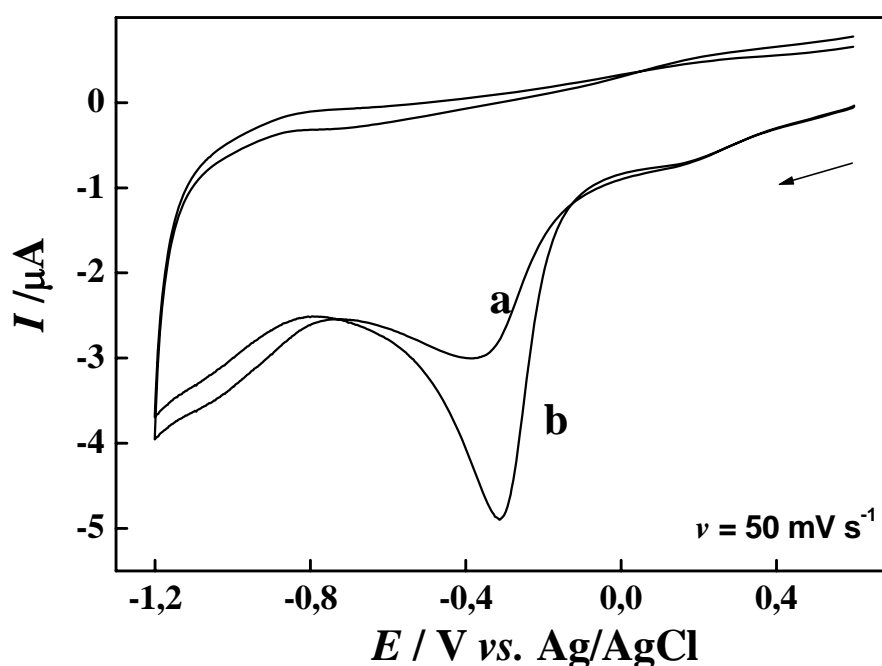


Figura 103: Voltamogramas cíclicos obtidos para SPCE não modificado (curva a) e SPCE/PH (curva b), em solução de tampão acetato pH 4,4 contendo $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cr (VI), após 1 minuto de imersão.

O voltamograma cíclico para a redução de Cr (VI), sobre o SPCE não modificado, caracteriza-se por um pico de redução com baixa intensidade de corrente em -0,38 V (vs. Ag/AgCl) e nenhum sinal na varredura reversa. De acordo com a literatura [109], esse processo pode estar relacionado à redução da espécie

Cr(VI)/Cr(III). No eletrodo modificado por filmes de PH, embora a redução ocorra em potencial próximo (-0,32 V), há um aumento significativo no valor da corrente de pico. Este comportamento indica que na presença do filme provavelmente ocorre a pré-concentração da espécie Cr (VI), o que demonstra a potencialidade analítica do eletrodo modificado.

Os voltamogramas de varredura linear, obtidos para redução de Cr (VI), foram comparados utilizando os SPCE modificados por PH, construídos por diferentes procedimentos de formação dos filmes poliméricos, como descrito na parte experimental (Figura 104).

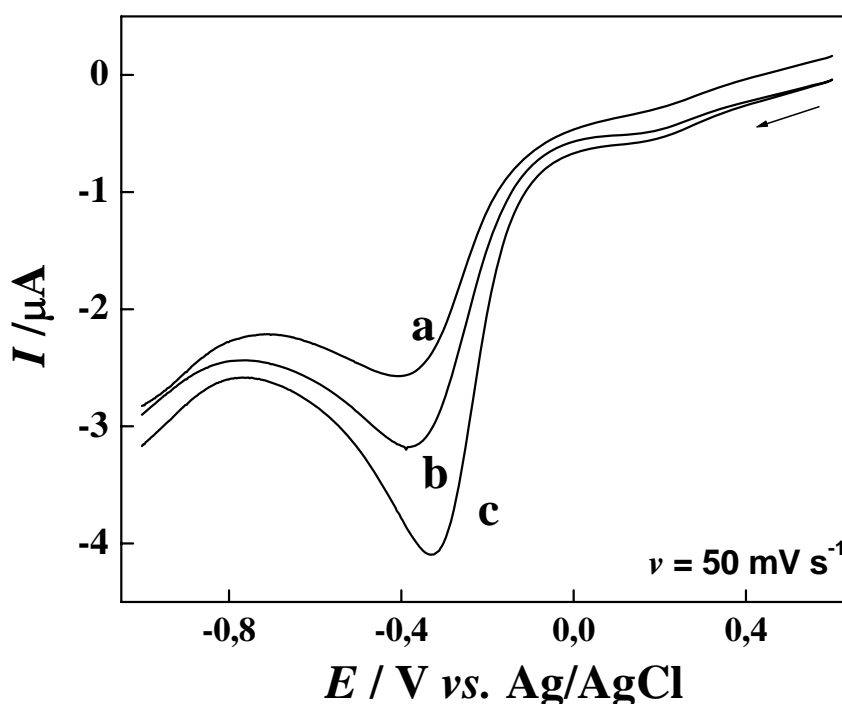


Figura 104: Voltamogramas de varredura linear, obtidos em solução tampão acetato pH 4,4 contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr (VI), para os eletrodos modificados: SPCE/EPH (a), SPCE/Glu-PH (b) e SPCE/PH (c), após 1 minuto de imersão.

Observando os voltamogramas obtidos para SPCE/PH, construídos por diferentes métodos de depósito, é possível verificar que para todos os procedimentos adotados existe uma melhora na resposta voltamétrica, o que pode ser evidenciado pela maior intensidade de corrente, quando comparada ao SPCE não modificado.

A magnitude do aumento da corrente catódica é dependente do procedimento de preparação do filme de PH. Filmes formados por polimerização eletroquímica (Figura 104-a) apresentam o efeito menos pronunciado na corrente de

pico catódica, o que provavelmente pode estar relacionado com a disponibilidade de grupos imidazólicos na superfície do eletrodo, pois a eletropolimerização leva a formação de monômeros ancorados na superfície do eletrodo.

Os eletrodos construídos pela adição direta do poliaminoácido (Figura 104-c) e pela adição do poliaminoácido após reação cruzada com o glutaraldeído (Figura 104-b), apresentaram comportamento voltamétrico muito semelhante quanto a resposta ao crômio VI. No entanto, o maior aumento da corrente é obtido com o eletrodo construído pela adição direta do polímero. Esse comportamento pode estar relacionado com a forma do filme na superfície eletródica. Anson et al. estudaram a modificação de eletrodos por filmes de poli-lisina e propuseram um modelo para o filme formado, os autores sugerem que os filmes formados pela adição do polímero são espessos e apresentam canais entre as cadeias poliméricas, e em valores de pH menores que o pKa, os grupos da cadeia polimérica encontram-se protonados e podem incorporar anions. Essa mesma disposição do filme pode ocorrer com filme de PH formados pela adição direta do polímero e utilizando a reação cruzada com o glutaraldeído, o fato do eletrodo SPCE/Glu-PH apresentar uma corrente menor do que a observada com o SPCE/PH deve estar relacionada a um aumento da resistência a transferência de carga devido a utilização do agente acorante. Para eletrodos SPCE/EPH, o filme deve ser constituído apenas por monômeros adsorvidos na superfície do eletrodo, produzindo assim um filme mais fino e com menos grupos capazes de incorporar os espécies carregadas negativamente. Assim, o SPCE/PH foi escolhido como o procedimento mais adequado para o desenvolvimento de estudos posteriores.

A influência do pH na resposta voltamétrica do SPCE/PH imerso em uma solução de tampão acetato, foi estudada para valores de pH ajustados entre 2,6 e 7,3. A Figura 105 apresenta os voltamogramas obtidos.

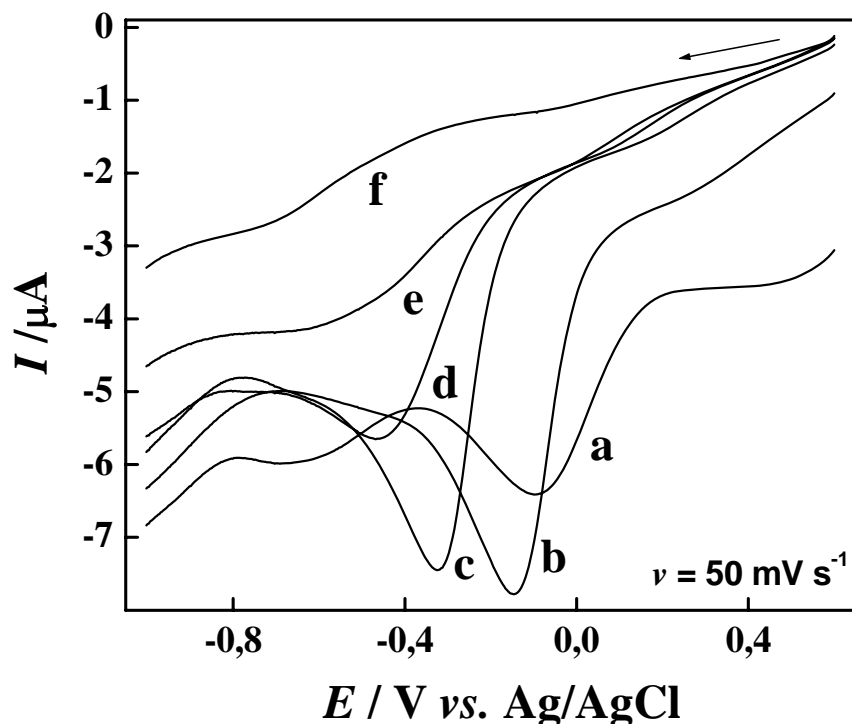


Figura 105: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução de tampão acetato contendo $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr^{VI} , ajustada em diferentes valores de pH: (a) 2,6 (b) 3,4 (c) 4,4 (d) 5,4 (e) 6,5 e (f) 7,3, após 1 minuto de imersão.

De acordo com a literatura [108,109], o crômio(VI) em solução pode estar presente em diferentes espécies (CrO_4^{2-} , HCrO_4^- e H_2CrO_4). Estes equilíbrios de protonação são representados nas equações 3 e 4:



Com base nos valores das constantes de equilíbrio, é possível construir um diagrama de distribuição de espécies, o qual é apresentado na Figura 106.

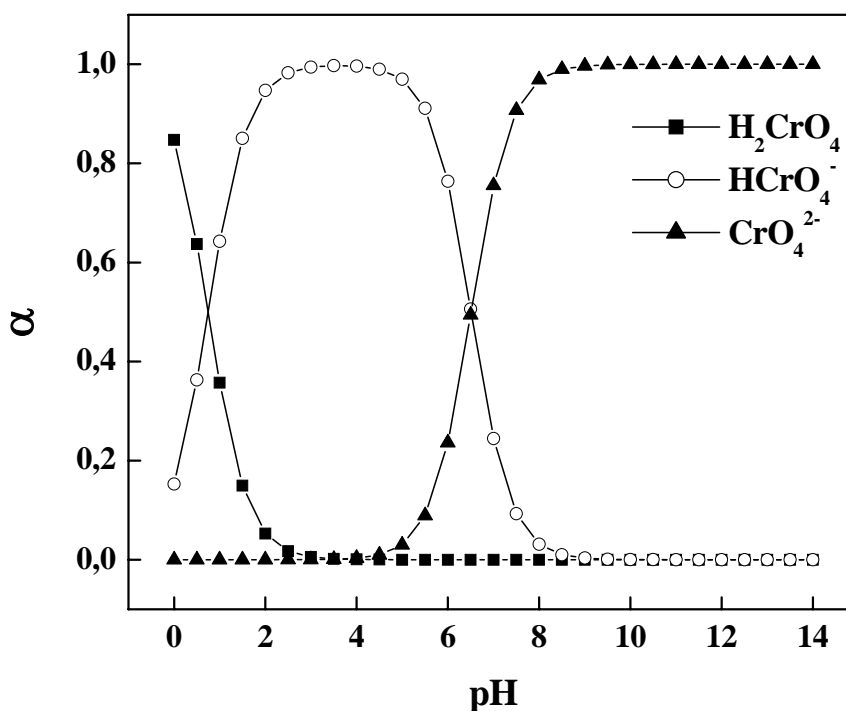
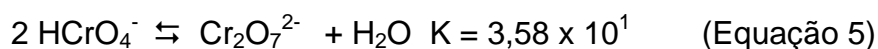
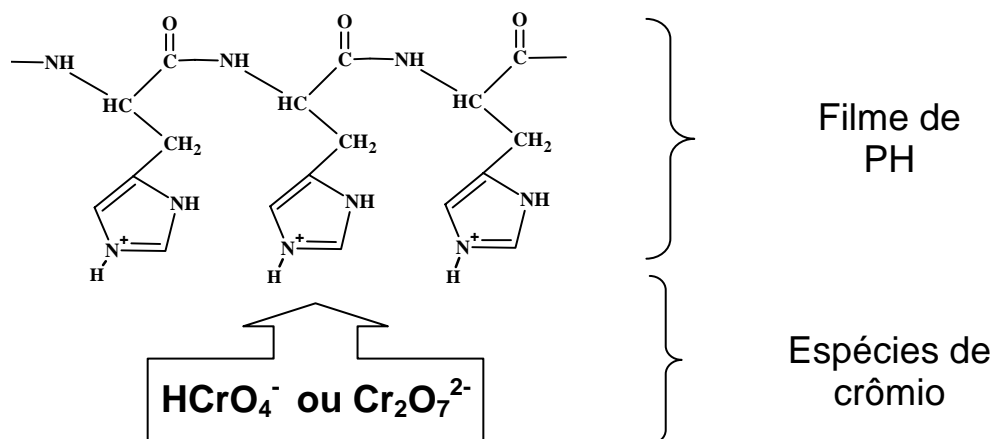


Figura 106: Diagrama de distribuição de espécies para o ácido crômico, em função do pH.

Verifica-se que no intervalo de pH estudado, a espécie predominante no meio é o monohidrogenocromato ou “bicromato” (HCrO_4^-), embora exista também um outro equilíbrio envolvendo a conversão do HCrO_4^- em dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), como apresentado pela equação 5, que depende da concentração do dicromato em solução.



O equilíbrio indica que existe uma dependência entre as concentrações de dicromato e bicromato. Para os valores de concentração utilizados, sugere-se que a espécie predominante seja o bicromato, coexistindo uma pequena quantidade de dicromato. De acordo com o valor do pKa da histidina ($\text{pKa} = 6,0$), o filme de PH possivelmente apresenta-se protonado em uma ampla faixa na região de pH estudado. Deste modo a pré-concentração de ambas as espécies poderia ocorrer por interação de natureza eletrostática entre a superfície do eletrodo modificado e as espécies de crômio HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Como representado no Esquema 3.



Esquema 3: Representação da interação do filme de PH e as possíveis espécies de crômio.

Além disso, é possível observar que o pH apresenta forte influência sobre a resposta voltamétrica do eletrodo. Os voltamogramas evidenciam ausência de um pico de corrente significativo para fins analíticos em valores de pH acima de 6,5 e observa-se um acentuado deslocamento do potencial de pico para valores de potencial menos negativos o aumento da concentração hidrogeniônica.

A influência da variação de pH na resposta voltamétrica obtidas sobre o SPCE/PH foi avaliada e o potencial de pico (E_p) e a corrente de pico (I_p) foram colocados em gráficos em função do pH, como mostra a Figura 107.

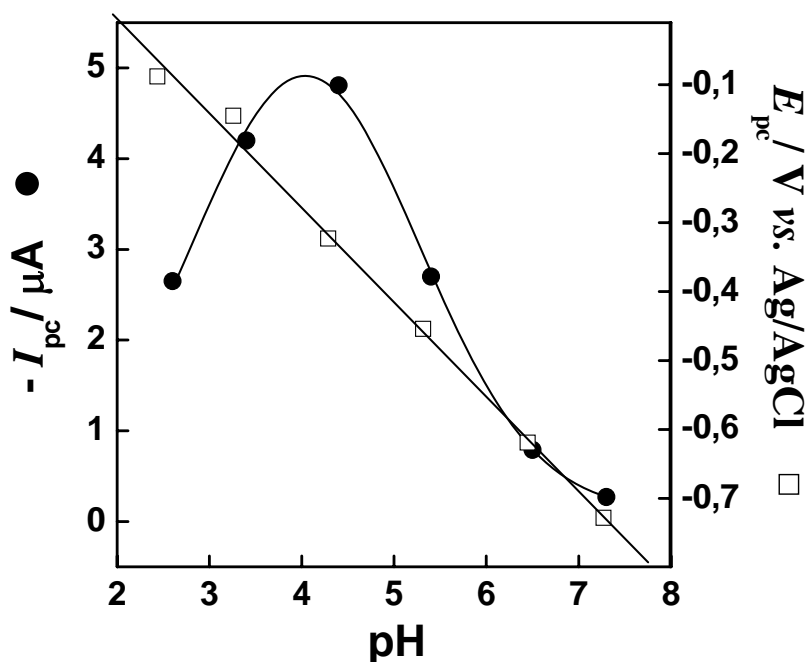


Figura 107: Variação da corrente de pico catódica e do potencial de pico catódico obtido para o SPCE/PH em solução de tampão acetato contendo $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cr}^{\text{VI}}$, em função do pH da solução.

Verifica-se uma variação linear entre o potencial de pico e aumento dos valores de pH da solução no intervalo entre 3,5 e 7,2, sendo essa relação expressa pela equação: $E_p = 0,302 - (0,141 \text{ V pH}^{-1}) \cdot \text{pH}$. A regressão linear apresenta uma inclinação de 141 mV por unidade de pH neste intervalo. Do mesmo modo verifica-se um máximo de corrente de pico no intervalo de pH entre 3,5 e 4,5. Em valores de $\text{pH} \leq 3,5$ observa-se uma diminuição da corrente de pico, além do surgimento de outro pico de redução em $E_p = -0,68 \text{ V}$. Esse comportamento pode ser atribuído a possível formação de outras espécies de crômio, tais como o dicromato. Do mesmo modo, observa-se que o aumento do pH da solução, $\text{pH} \geq 5,4$ promove diminuição da corrente de pico catódica. De acordo com o diagrama de distribuição das espécies de crômio, é possível atribuí-la à uma diminuição da concentração do bicromato e conseqüente formação do ânion cromato, que por sua vez não foi efetivamente pré-concentrado na superfície do eletrodo modificado. Esse fato pode ser reforçado pelo fato da região de pH onde acontece a formação do dicromato, pode ocorrer também a desprotonação do grupo imidazol, fazendo com que o eletrodo perca sua carga positiva e deixando assim de interagir eletrostaticamente

com o ânion. Para fins analíticos, optou-se por utilizar valores de pH para os demais estudos realizados.

IV.9.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do sistema foi investigada de 5 a 100 mV s^{-1} . A corrente de pico catódica aumentou com o aumento da velocidade de varredura, sendo verificada uma relação linear entre a corrente de pico catódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura para valores entre 5 e 75 mV s^{-1} , segundo a equação: $I_{pc}(\mu\text{A}) = -0,488 + 0,588 v^{1/2}$. Esse comportamento sugere que o processo de redução do crômio sobre a superfície dos SPCE/PH ocorre nesse intervalo de velocidade de varredura sob controle difusional das espécies através do filme polimérico.

A influência do potencial de acúmulo foi avaliada para o eletrodo modificado por filmes de PH em solução contendo $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr (VI) aplicando-se potencial de acúmulo variando entre +0,4 V e +1,0 V (vs. Ag/AgCl) durante 60s. Não foi observada nenhuma influência significativa na resposta voltamétrica do eletrodo e, portanto, optou-se em efetuar a análise em potencial de circuito aberto.

O efeito do tempo de pré-concentração foi investigado para concentrações de Cr(VI) de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tempos de acúmulo variando de 0s a 300s, sob potencial de circuito aberto. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 108-A e B, respectivamente.

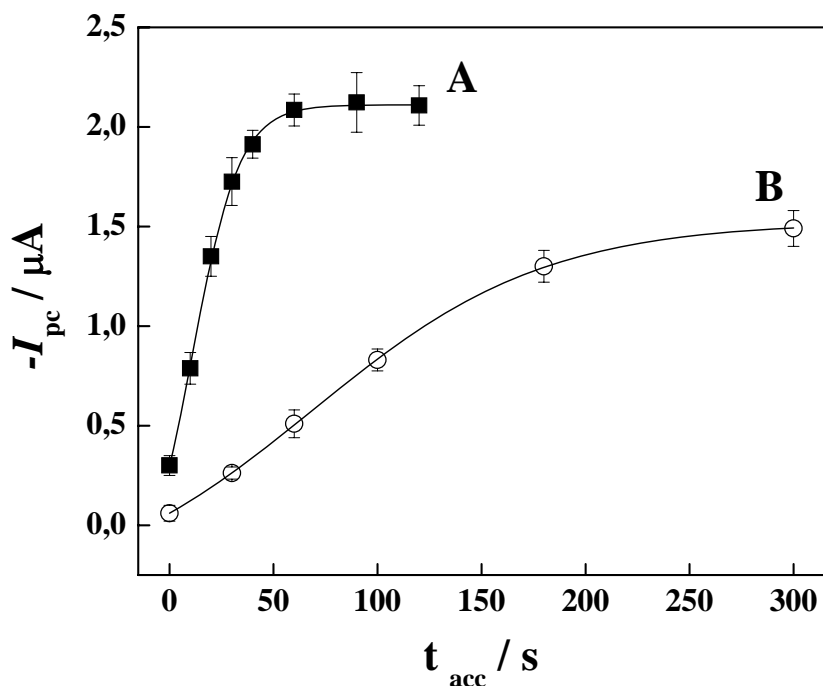


Figura 108: Influência do tempo de pré-concentração sobre a corrente de pico catódica, para o SPCE/PH, em solução de tampão acetato pH 4,4 contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) de Cr (VI).

Conforme pode ser visualizado pela Figura 108, para ambas as concentrações avaliadas, ocorreu um aumento significativo da corrente de pico catódica, à medida que se aumentou o tempo de pré-concentração. Quando o Cr (VI) estava a uma concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, observou-se um aumento linear da corrente de pico catódica, em função do tempo de pré-concentração de até 60s (Figura 108-A). Em tempos de acúmulo maiores, ocorreu uma possível saturação dos sítios ativos na superfície do eletrodo. Em concentração de Cr (VI) de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 108-B), observou-se um aumento da corrente de pico catódica em função do tempo de pré-concentração, em até 180s, o que indica que o tempo de acúmulo é dependente da concentração inicial de Cr (VI). Assim, optou-se por adotar um tempo de acúmulo fixo em 180s.

IV.9.3. CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Depois de otimizadas as condições experimentais, as quais estão sumarizadas na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros otimizados para a construção da curva analítica com o SPCE/PH.

Parâmetro avaliado	Intervalo estudado	Valor otimizado
pH	2,6 a 7,3	4,0
Velocidade de varredura	5 mV a 100 mV	50 mV
Tempo de pré-concentração	0s a 300s	180 s
Potencial de pré-concentração	+0,4 V a + 1,0 V	Circuito aberto

Uma curva analítica para o SPCE/PH foi construída no intervalo de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a 3×10^{-5} mol L⁻¹. Os voltamogramas e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 109.

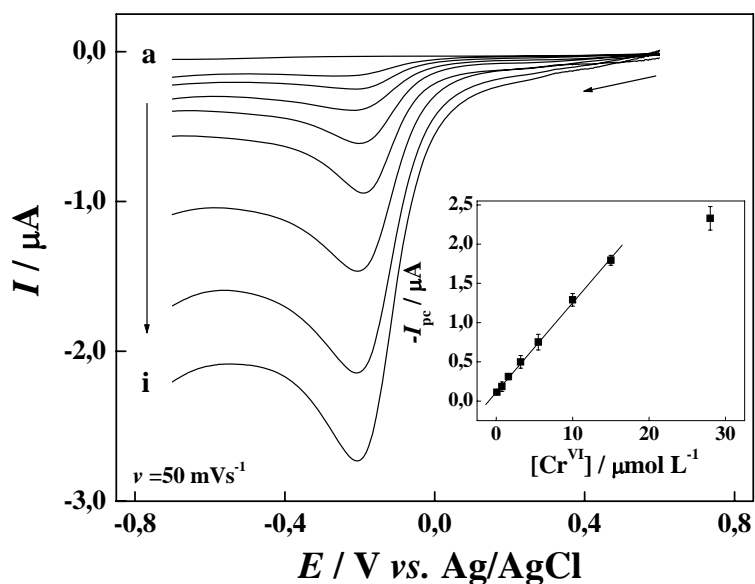


Figura 109: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução tampão acetato pH 4,4, contendo diferentes concentrações de Cr (VI): 0,0 (a), $1,0 \times 10^{-7}$ (b), $7,5 \times 10^{-7}$ (c), $1,6 \times 10^{-6}$ (d), $3,2 \times 10^{-6}$ (e), $5,5 \times 10^{-6}$ (f), $1,0 \times 10^{-5}$ (g), $1,5 \times 10^{-5}$ (h) e $2,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (i).

Foi observado um intervalo de linearidade entre a corrente de pico catódica e a concentração de Cr (VI) de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para concentrações maiores, houve um desvio negativo da linearidade, o que sugere a saturação da superfície eletródica. O limite de detecção [116] ($3 \times$ desvio do branco/inclinação da curva analítica) obtido foi de $4,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Utilizando o mesmo eletrodo foram realizadas 5 medidas consecutivas para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr (VI), onde foi verificado um desvio padrão de 4,8% para esse conjunto de medidas. Empregando 3 eletrodos diferentes, nas mesmas condições experimentais, foi observado um desvio padrão de 5,8% quando comparada a média obtidas para esse conjunto de medidas.

A influência dos possíveis interferentes do método foi avaliada, a fim de investigar sua aplicabilidade na determinação de Cr (VI) em efluentes de curtume. Esses estudos foram realizados mantendo a concentração de Cr (VI) fixa em $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e as concentrações das substâncias concomitantes de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A seguir seguem as espécies avaliadas e os respectivos valores recuperados de corrente: zinco (101, 98, 94 %), ferro (97, 98, 97 %), níquel (102, 96, 98 %), cromo III (98, 102, 101 %), potássio (100, 97, 99 %), sódio (99, 98, 98 %), cloreto (103, 101, 97 %), fosfato (99, 96, 96 %), sulfato (96,97,98 %) e Triton X-100 (99, 96, 78 %) e permanganato (100, 97, 88%). Valores de recuperação próximos a 100% foram observados para os cátions e ânions testados, enquanto que para o Triton X-100, uma diminuição de 20% foi observada no valor da corrente de pico catódica, quando este estava presente em uma concentração 10 vezes maior que a de Cr (VI). Para o estudo realizado com o cromo III, mesmo ampliando o intervalo de varredura de potenciais até -1,3 V (vs. Ag/AgCl), não foi verificado nenhum sinal voltamétrico referente a redução de cromo III e nenhuma influência sobre o sinal de redução referente ao cromo VI. Quando foi avaliada a influência do permanganato sobre a resposta voltamétrica do sistema, foi verificado um comportamento muito interessante, a Figura 110 apresenta.

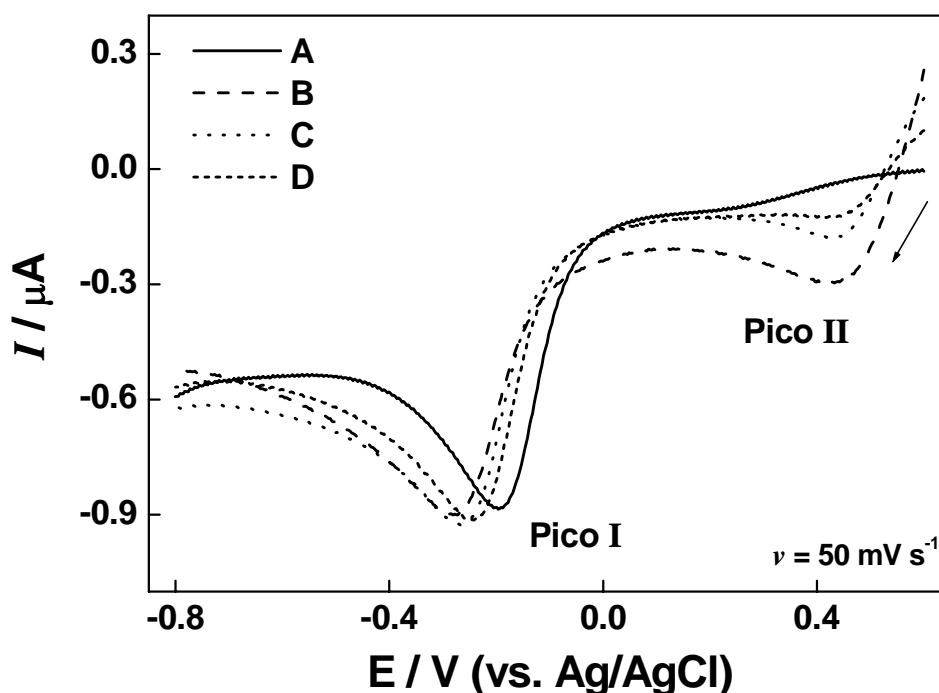


Figura 110: Voltamogramas de varredura linear obtidos para o SPCE/PH em solução tampão acetato pH 4,4, contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Cr (VI) contendo $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ (A), $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (B) $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C) e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (D) de permanganato.

Observando os resultados obtidos é possível verificar a existência de dois picos de redução. O pico I (em -0,2 V) referente a redução de cromo VI, e o pico II (0,41 V) provavelmente deve estar relacionado com a redução do anion permanganato, pois sucessivas adições apresentaram um aumento na corrente catódica para esse sinal de redução. Embora o permanganato não tenha sido estudado para fins analíticos, esses resultados indicam que o SPCE/PH poderia apresentar potencialidade para desenvolver um método para sua determinação. Com relação a influência sobre o sinal de redução do cromo VI, foi verificada influência significativa apenas para concentrações 10 vezes acima.

Amostras de água residual, coletadas do efluente do curtume Betin indústria de couro (Lins-SP), previamente tratado, foram avaliadas com e sem o enriquecimento com Cr (VI) e Cr (III). A determinação foi realizada por adições múltiplas de soluções padrão de Cr (VI), usando a análise direta com SPCE/PH.

As determinações realizadas nas amostras de águas residuais, sem qualquer enriquecimento prévio, não apresentaram valores de cromo (VI)

detectáveis pelo método proposto, por esta razão optou-se por realizar a fortificação da amostra. As determinações nas amostras enriquecidas com Cr (III) e Cr (VI) foram realizadas em duas etapas: a primeira, antes da oxidação da amostra, fornecendo valores de Cr (VI) e a segunda, após a oxidação [125], fornecendo Cr (VI) total. Através da diferença entre os valores, foi possível obter a indiretamente a concentração de Cr (III). Os resultados obtidos para a determinação de Cr (VI) estão sumarizados na Tabela 18.

Tabela 18: Valores obtidos para determinação de cromo em amostras de águas residuais.

Amostra	Adicionado/ 10^{-5} mol L ⁻¹		Recuperado / 10^{-5} mol L ⁻¹		E* / %
	Cr III	Cr VI	Cr III	Cr VI	CrIII/CrVI
A	0,00	0,00	ND	ND	-
B	1,00	0,00	0,96	0,00	4/-
C	0,00	1,00	0,00	1,02	-/2
D	1,00	1,00	1,03	0,97	3/3

A- sem enriquecimento, B- enriquecida com Cr^{III}, C- enriquecida com Cr^{VI}, enriquecida com Cr^{III} e Cr^{VI}. * Erro relativo.

Os resultados obtidos para a determinação de cromo nas amostras enriquecidas, demonstraram que existe uma boa concordância entre os valores adicionado e recuperado (erro relativo $\leq 5\%$), sugerindo que o método proposto pode ser aplicado na determinação de Cr (VI) e Cr (III) em amostras de efluentes de águas de curtume.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Os eletrodos impressos não modificados demonstraram ser dispositivos promissores para o desenvolvimento de métodos de análise para diversos analitos, apresentando ótimos resultados para todos os procedimentos avaliados, em condições clássicas de voltametria, em sistema com fluxo de solução e como detector amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). O quadro abaixo apresenta as principais características dos métodos desenvolvidos.

Eletrodo	Analito	Método	Sistema	Região linear	Amostra
SPCE	AuTM*	voltamétrico	convencional	$1,4 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	Urina
SPCE	Procaína	amperométrico	FIA (detector)	$1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	Formulação farmacêutica
SPGE	L-dopa	amperométrico	hidrodinâmico	$1,5 \times 10^{-6}$ a $6,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	Formulação farmacêutica

*Aurotiomalato

Os métodos desenvolvidos para os diferentes analitos, exploraram os eletrodos impressos de uma forma simples, utilizando-os como não modificados. Empregando diferentes sistemas, foi possível obter resultados considerados muito satisfatórios, demonstrando grande potencialidade analítica. Essas observações, aliadas as características intrínsecas dos eletrodos impresso, como simplicidade e baixo custo, indicam que esses dispositivos devem continuar sendo explorados como uma ferramenta eletroanalítica para o desenvolvimento de novos métodos de análise. Em adição, os resultados obtidos com os eletrodos não modificados são compatíveis com os relatados na literatura empregando eletrodos modificados, essa comparação ajuda a desmistificar o uso indiscriminado de eletrodos quimicamente modificados na determinação de espécies de interesse.

Com relação aos eletrodos de carbono impresso modificados por filmes de PH, pode ser observado que o comportamento eletroquímico é fortemente influenciado pelo procedimento de modificação da superfície. Esses procedimentos

levam a formação de filmes com diferentes características. Para eletrodos construídos pela adição de uma solução do polímero ou utilizando um agente ancorante (SPCE/PH e SPCE/Glu-PH), foi observado um comportamento muito semelhante ao descrito para filmes de poli-lisina, onde o polímero atua como um trocador-iônico capaz de pré-concentrar espécies carregadas negativamente, assim um modelo semelhante ao descrito foi sugerido para o filme de poli-histidina preparado por esses procedimentos. Já para os SPCE/EPH, os resultados sugerem que esses eletrodos apresentam filmes mais finos e com menos grupos disponíveis para pré-concentrar espécies com cargas negativas, porém, esse eletrodo apresentou um efeito eletrocatalítico para a oxidação de ácido ascórbico. Para todos os eletrodos construídos foram realizadas medidas consecutivas que demonstraram que o filme formado na superfície do eletrodo apresenta uma boa aderência.

Dos procedimentos empregados para a modificação dos eletrodos de ouro impresso (SPGE) a adição direta de uma solução contendo o polímero comercial (SPGE/PH) forneceu um filme capaz de pré-concentrar ânions ferricianeto, porém, o filme formado não foi estável, sendo lixiviado da superfície eletródica após transferência para uma solução contendo apenas eletrólito suporte. Empregando uma solução do polímero comercial sobre a superfície do eletrodo de ouro impresso contendo uma camada auto arranjada do ácido 3-mercaptopropiônico (SPGE/MPA-PH) foi possível construir um eletrodo hábil para incorporar ferricianeto e com razoável estabilidade para valores de pH entre 6,0 e 8,0.

Os eletrodos impressos modificados foram aplicados na determinação de diversos analitos, sendo observados comportamentos muito interessantes. O quadro seguinte apresenta as principais características.

Características do método	Analito			
	<i>Isoniazida</i>	<i>Pirazinamida</i>	<i>Aurotiomalato</i>	<i>Crômio VI</i>
<i>Eletrodo</i>	SPCE/EPH	SPCE/EPH	SPCE/PH	SPCE/PH
<i>Método</i>	Voltamétrico	Voltamétrico	Voltamétrico	Voltamétrico
<i>Técnica</i>	DPV**	DPV	DPV	LSV***
<i>Efeito</i>	Eletrocatalítico	Eletrocatalítico	Pré-concentração	Pré-concentração
<i>Região linear / mol L⁻¹</i>	$5,0 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-7}$ a $9,6 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-6}$ a $8,7 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-5}$
<i>LOD* / mol L⁻¹</i>	$1,7 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-8}$
<i>Aplicação</i>	Urina	Urina	Urina	Efluente de curtume

*Limite de detecção

**Voltametria de pulso diferencial

***Voltametria de varredura linear

O SPCE/EPH apresentou um efeito eletrocatalítico para a redução da isoniazida e da pirazinamida, esse efeito foi explorado e permitiu o desenvolvimento de um método prático, rápido e capaz de determinar essas espécies em amostras de urina. O SPCE/PH foi utilizado como resultados promissores na determinação de aurotiomalato e crômio VI, em ambos os métodos foi possível verificar que o eletrodo modificado atua no sentido de pré-concentrar os analitos, melhorando a resposta voltamétrica com relação aos eletrodos não modificados. Essas características permitiram o desenvolvimento de métodos hábeis para a determinação de ouro e crômio em amostras de urina e água residual, respectivamente.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com relação aos eletrodos impressos, estudos devem ser realizados visando desenvolver novos métodos para determinação de outros analitos empregando sistemas convencionais e utilizando acessórios que melhoram a resposta voltamétrica, como sistemas hidrodinâmicos. O uso desses dispositivos como detectores amperométricos em sistemas de análise por injeção em fluxo também deva ser explorado.

Os eletrodos modificados por filmes de PH devem ser caracterizados por técnicas de superfície, como a microscopia de força atômica (AFM), visando entender a morfologia dos filmes formados e assim tentar relacionar essas características com o comportamento voltamétrico dos eletrodos modificados. A utilização de eletrodos modificados por filmes de PH também devem ser explorada no sentido de desenvolver novos métodos, porém, nesse caso a escolha de novos analitos devem ser baseadas nos efeitos observados para os eletrodos modificados, como a eletrocatalise e a pré-concentração de espécies.

No referente aos analitos, como, por exemplo, para isoniazida e pirazinamida, podem ser realizados estudos buscando a elucidação dos processos redox. Para que posteriormente possam ser entendidos, os mecanismos que produzem o efeito eletrocatalítico observado sobre a redução desses analitos.

CAPÍTULO VII REFERÊNCIAS

1 JANATA, J. Centennial retrospective on chemical sensors. **Anal. Chem.**, Washington, v. 73, n. 5, p.150A-153A, Mar. 2001.

2 HITCHMAN, M. L.; HILL, H. A. O. Electroanalysis and electrochemical sensors. **Chem. Brit.**, Cambridge, v. 22, n. 12, p. 1117-1118, Dec. 1986.

3 JANATA, J.; BEZEGH, A. Chemical sensors. **Anal. Chem.**, Washington, v. 60, n. 12, p. R62-R74, June 1988.

4 WIDRIG, C. A. Dynamic electrochemistry: methodology and application. **Anal. Chem.**, Washington, v. 62, n. 12, p. R1-R20, June 1990.

5 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 159-173, Mar. 2003.

6 SOUZA, M. D. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 191-195, Mar. 1997.

7 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D.; KUBOTA L. T. Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, Nov. 2002.

8 SNELL, K. D.; KEENAN, A. G. Surface modified electrodes. **Chem. Soc. Rev.**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 259-282, 1979.

9 BALDWIN, R. P.; THOMSEN, K. N. Chemically modified electrodes in liquid-chromatography detection: a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-16, Jan. 1991.

10 MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, A. R. Chemically modified electrodes: molecular design for electroanalysis. **Anal. Chem.**, Washington, v. 59, n. 5, p. A379-A388, Mar. 1987.

- 11 ASHLEY, K. Developments in electrochemical sensors for occupational and environmental health applications. **J. Hazard. Mater.**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 1-12, Aug. 2003.
- 12 ASHLEY, K.; MAPP, K. L.; MILLSON, M. J. Ultrasonic extraction and field portable anodic stripping voltammetry for the determination of lead in workplace air samples. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Cincinnati, v. 59, n. 10, p. 671-679, Oct. 1998.
- 13 HART, J. P.; WRING, S. A. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 89-103, Feb. 1997.
- 14 WANG, J. Decentralized electrochemical monitoring of trace metals: from disposable strips to remote electrodes. **Analyst**, Cambridge, v. 119, n. 5, p. 763-766, May 1994.
- 15 NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Quim. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 614-629, Set. 1998.
- 16 HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 456-469, July 2003.
- 17 HONEYCHURCH, K. C.; HAWKINS, D. M.; HART, J. P.; COWELL, D. C. Voltammetric behaviour and trace determination of copper at a mercury-free screen-printed carbon electrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 565-574, May 2002.
- 18 HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P.; COWELL, D. C.; ARRIGAN, D. W. M. Voltammetric studies of lead at calixarene modified screen-printed carbon electrodes and its trace determination in water by stripping voltammetry. **Sens. Actuators B**, Lausanne, v. 77, n. 3, p. 642-652, July 2001.
- 19 HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P.; KIRSCH, N. Voltammetric, chromatographic and mass spectral elucidation of the redox reactions of 1-hydroxypyrene occurring at a screen-printed carbon electrode. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 49, n. 7, p. 1141-1149, Mar. 2004.

20 MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; SLATER, J. M. Flow injection measurement of lead using mercury-free disposable gold-sputtered screen-printed carbon electrodes (SPCE). **Sens. Actuators B**, Lausanne, v. 91, n. 1-3, p. 52–59, June 2003.

21 TSAI, D.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. A highly stable and sensitive chemically modified screen-printed electrode for sulfide analysis. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 556, n. 1, p. 145–150, Jan. 2006.

22 LASCHI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. **Sens. Actuators B**, Lausanne, v. 114, n. 1, p. 460–465, Mar. 2006.

23 HART, J. P.; WRING, S. A. Screen-printed voltammetric and amperometric electrochemical sensors decentralized testing. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 6, n. 8, p. 617-624, Aug. 1994.

24 ANSON, F. C.; SAVEANT, J. M.; SHIGWHARA, K. New model for the interior of polyelectrolyte coatings on electrode surfaces. mechanisms of charge transport through protonated poly(L-lysine) films containing $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{EDTA})^-$ and $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})^{2-}$ as counterions. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 105, n. 5, p. 1096-1106, 1983.

25 ANSON, F. C.; OSAKA, T.; SAVEANT, J. M. Kinetics of electron-transfer cross-reactions within redox polymers. coatings of a protonated polylysine copolymer with incorporated electroactive anions. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 105, n. 15, p. 4883-4890, 1983.

26 PIRZAD, R.; MOREIRA, J. C.; RANGEL, A. O. S. S.; ALONSO, R. M.; EDMONDS, T. E.; FOGG, A. G. Differential pulse cathodic stripping voltammetric determination of sodium-nitroprusside at a hanging mercury drop electrode aided by copper (II) and pol-L-lysine modification. **Analyst**, Cambridge, v. 119, n. 5, p. 963-968, May 1994.

27 PIRZAD, R.; MOREIRA, J. C.; DAVIES, A. E.; FOGG, A. G. differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of nedocromil sodium at an unmodified and at a poly-L-lysine modified hanging mercury drop electrode. **Analyst**, Cambridge, v. 119, n. 11, p. 2439-2442, Nov. 1994.

28 FERREIRA, V. S.; ZANONI, M. V. B.; FOGG, A. G. Cathodic stripping voltammetric determination of ceftazidime with reactive accumulation at a poly-L-lysine modified hanging mercury drop electrode. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 384, n. 5, p. 159-166, Mar. 1999.

29 FOGG, A. G.; PIRZAD, R.; MOREIRA, J. C.; DAVIES, A. E. Improving the performance of screen-printed carbon and polished platinum and glassy-carbon voltammetric electrodes by modification with poly-L-lysine. **Anal. Proc.**, Cambridge, v. 32, n. 6, p. 209-212, June 1995.

30 BIANCO, P.; HALADJIAN, J. Electrocatalytic hydrogen evolution at the pyrolytic graphite electrode in the presence of hydrogenase. **J. Electrochem. Soc.**, Pennington, v. 139, n. 9, p. 2428-2432, Sept. 1992.

31 YABUKI, S.; MIZUTANI, F.; HIRATA, Y. Glucose-sensing electrode based on glucose oxidase-attached polyion complex membrane containing peroxidase and ferrocene. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 13, n. 5, p. 380-383, Mar. 2001.

32 PEREIRA, F. C.; FOGG, A. G.; UGO, P.; BERGAMO, E. P.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Determination of iodide and idoxuridine at a glutaraldehyde-cross-linked poly-L-lysine modified glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 17, n. 14, p. 1309-1316, July 2005.

33 PEREIRA, F. C.; FOGG, A. G.; ZANONI, M. V. B. Regeneration of poly-L-lysine modified carbon electrodes in the accumulation and cathodic stripping voltammetric determination of the cromoglycate anion. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, n. 5, p. 1023-1032, July 2003.

34 VIANA, E. R. C.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical reduction and determination of Cibacron Blue F3GA at poly-L-lysine modified glassy carbon electrode. **Dyes and Pigments**, Oxford, v. 71, n. 2, p. 148-155, 2006.

35 LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a lithium tetracyanoethylene (LiTCNE) modified glassy carbon electrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 64, n. 4, p. 935-942, Nov. 2004.

- 36 LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Development of a sensor based on tetracyanoethylenide (LiTCNE)/poly-L-lysine (PLL) for dopamine determination. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 50, n. 13, p. 2675–2683, Apr. 2005.
- 37 LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Dissolved oxygen sensor based on cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized in poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode. **Sens. Actuators, B**, Lausanne, v. 114, n. 2, p. 1019-1027, Apr. 2006.
- 38 COSTA, C. O.; MIRANDA, P. R. B.; HAZRA, B.; SARMA, M.; LUZ, R. C. S.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F. Development of a voltammetric sensor for diospyrin determination in nanomolar concentrations. **Talanta**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 1378-1383, Feb. 2006.
- 39 MONTERROSO, S. C. C.; CARAPUÇA, H. M.; DUARTE, A. C. Ion-exchange and permselectivity properties of poly(sodium 4-styrenesulfonate) coatings on glassy carbon: application in the modification of mercury film electrodes for the direct voltammetric analysis of trace metals in estuarine waters. **Talanta**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 644-653, Feb. 2005.
- 40 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.
- 41 LI, G.; CHEN, L.; ZHU, J.; ZHU, D.; UNTEREKER, D. F. Histidine Modified Electrode and Its Application to the Electrochemical Studies of Hemeproteins. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 11, n. 2, p. 139-142, Feb. 1999.
- 42 YU, A. M.; SUN, D. M.; GU, H. Y.; CHEN, H. Y. Catalytic oxidation of ascorbic acid at a polyhistidine modified electrode and its application to the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine. **Anal. Lett.**, New York, v. 29, n. 15, p. 2633-2644, 1996.
- 43 KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 562 p.
- 44 SHAW III, F. C. Gold-based therapeutic agents. **Chem. Rev.**, Washington, v. 99, n. 9, p. 2589-2600, Aug. 1999.

45 ANDERSEN, O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. **Chem. Rev.**, Washington, v. 99, n. 9, p. 2683-2710, Aug. 1999.

46 SMITH, W. E.; BROWN, D. H.; CAPPELL, H. A. Gold-binding sites in the plasma of patients with rheumatoid arthritis undergoing treatment with gold sodium thiomalate. **Inorg. Chim. Acta**, Lausanne, v. 106, n. 4, p. L23-24, 1985.

47 KOJIMA, S.; TAKAHASHI, Y.; KIYOZUMI, M.; FUNAKOSHI, T.; SHUIMADA, H. Characterization of gold in urine and bile following administration of gold sodium thiomalate with chelating agents to rats. **Toxicology**, Clare, v. 74, n. 1, p. 1-8, Aug. 1992.

48 BAREFOOT, R. R.; VAN LOON, J. C. Determination of platinum and gold in anticancer and antiarthritic drugs and metabolites. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 334, n. 1/2, p. 5-14, Nov. 1996.

49 ISAB, A. A. Studies on the interaction of gold (I) thiomalate (myochrysin) with 2-thiouracil in aqueous solution followed by C-13 NMR spectroscopy. **Inorg. Chim. Acta**, Lausanne, v. 207, n. 1, p. 73-77, May 1993.

50 LEWIS, G.; SHAW III, F. C. Competition of thiols and cyanide for gold(I). **Inorg. Chem.**, Washington, v. 25, n. 1, p. 58-62, Jan. 1986.

51 ESCOSURA-MUÑIZ, A.; GONZÁLEZ-GARCIA, M. B.; COSTA-GARCIA, A. Electrocatalytic detection of aurothiomalate on carbon electrodes Application as a non-enzymatic label to the quantification of proteins. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 524, n. 1/2, p. 355-363, Oct. 2004.

52 HUILIANG, H.; JAGNER, D.; RENMAN, L. Computerized flow constant current stripping analysis for gold (III) with carbon or platinum fiber electrodes. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 208, n. 1-2, p. 301-306, May 1988.

53 JACOBS, E. S. Anodic stripping voltammetry of gold and silver with carbon paste electrodes. **Anal. Chem.**, Washington, v. 35, n. 13, p. 2112-2113, 1963.

54 BOND, A. M.; KRATSI, S.; MITCHELL, S.; MACAK, J. Comparison of the gold reduction and stripping processes at platinum, rhodium, iridium, gold and glassy carbon micro- and macrodisk electrodes. **Analyst**, Cambridge, v. 122, n. 10, p. 1147-1152, Oct. 1997.

55 YE, X.; YANG, Q.; WANG, Y.; LI, N. Electrochemical behaviour of gold, silver, platinum and palladium on the glassy carbon electrode modified by chitosan and its application. **Talanta**, Amsterdam, v. 47, n. 5, p. 1099-1106, Dec. 1998.

56 WANG, C.; ZHANG, H.; SUN, Y.; HULIN, L. Electrochemical behavior and determination of gold at chemically modified carbon paste electrode by the ethylenediamine fixed humic acid preparation. **Anal. Chim. Acta**, v. 361, n. 1/2, p. 133-139, Mar. 1998.

57 YE, R.; KHOO, S. B. Cathodic stripping voltammetric determination of ultratrace gold(III) at a bulk modified epoxy-graphite tube composite electrode in flow systems. **Analyst**, Cambridge, v. 124, n. 3, p. 353-360, Mar. 1999.

58 LACK, B.; DUNCAN, J.; NYOKONG, T. Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of gold(III) in the presence of yeast mannan. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 385, n. 1/3, p. 393-399, Apr. 1999.

59 KOROLCZUK, M. Selective method for the determination of gold by anodic stripping voltammetry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, New York, v. 356, n. 8, p. 480-483, Dec. 1996.

60 TURVAN, I.; MANDLER, D. Chemically modified electrode for the determination of gold – an electrochemical and spectrophotometric study. **Fresenius J. Anal. Chem.**, New York, v. 349, n. 7, p. 491-496, July 1994.

61 TURVAN, I.; MANDLER, D. Electrochemical determination of trace amounts of gold(III) by anodic stripping voltammetry using a chemically modified electrode. **Anal. Chem.**, Washington, v. 65, n. 15, p. 2089-2092, Aug. 1993.

62 KULA, P.; NAVRATILOVA, Z. Anion exchange of gold chloro complexes on carbon paste electrode modified with montmorillonite for determination of gold in pharmaceuticals. **Electroanalysis**, Berlin, v. 13, n. 8/9, p. 795-798, May 2001.

- 63 MARCOLINO, L. H. Jr.; TEIXEIRA, M. F. S.; PEREIRA, A. V.; FATIBELLO, O. Flow injection determination of levodopa in tablets using a solid-phase reactor containing lead(IV) dioxide immobilized. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 25, n. 3/4, p. 393-398, June 2001.
- 64 ZHANG, L.; CHEN, G.; HU, Q.; FANG, Y. Z. Separation and determination of levodopa and carbidopa in composite tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 431, n. 2, p. 287-292, Mar. 2001.
- 65 TEIXEIRA, M. F. S.; BERGAMINI M. F.; MARQUES C. M. P.; BOCCHI N. Voltammetric determination of L-dopa using an electrode modified with trinuclear ruthenium ammine complex (Ru-red) supported on Y-type zeolite. **Talanta**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 1083-1088, July 2004.
- 66 LOPEZ, M. C. B.; CASTANON, M. J. L.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T. Electrochemical behavior of catecholamines and related compounds at in situ surfactant modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, Weinheim, v.19, n. 2/3, p. 207-213, Jan. 2007.
- 67 XIANG, C. L.; ZOU, Y. J.; XIE, J. J.; FEI, X. M. Voltammetric determination of L-dopa using a carbon nanotubes-Nafion modified glassy carbon electrode. **Anal. Lett.**, Philadelphia, v. 39, n. 13, p. 2569-2579, 2006.
- 68 YAN, X. X.; PANG, D. W.; LU, Z. X.; LU, H. Q.; TONG, H. Electrochemical behavior of L-dopa at single-wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 569, n. 1, p. 47-52, July 2004.
- 69 QUINTINO, M. S. M.; YAMASHITA, M.; ANGNES, L. Voltammetric studies and determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical products. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 18, n. 7, p. 655-661, Apr. 2006.
- 70 TEIXEIRA, M. F. S.; MARCOLINO, L. H. Jr.; FATIBELLO, O.; DOCKAL, E. R.; BERGAMINI, M. F. An electrochemical sensor for l-dopa based on oxovanadium-salen thin film electrode applied flow injection system. **Sens. and Actuators B**, Lausanne, v. 122, n. 2, p. 549-555, Mar. 2007.

71 XU, L. X.; SHEN, Y. X.; WANG, H. Y.; JIANG, J. G.; XIAO, Y. Spectrophotometric determination of procaine hydrochloride in pharmaceutical products using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as the chromogenic reagent. **Spectrochim. Acta A**, Oxford, v. 59, n. 13, p. 3103-3110, Nov. 2003.

72 DHANANJEYAN, M. R.; BYKOWSKI, C.; TRENDEL, J. A.; SARVER, J. G.; ANDO, H.; ERHARDT, P. W. Simultaneous determination of procaine and *para*-aminobenzoic acid by LC-MS/MS method. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 847, n. 2, p. 224-230, Mar. 2007.

73 CHEN, X. W.; SONG, X.; WANG, J. H. A sequential injection fluorometric procedure for the determination of procaine in human blood and pharmaceuticals. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 385, n. 4, p. 737-741, June 2006.

74 ZHOU, J. X.; ZHANG, L. J.; WANG, E. K. Enhanced amperometric detector for local anaesthetics in liquid chromatography with metal-oxide dispersed glassy-carbon electrodes. **Electroanalysis**, New York, v. 5, n. 4, p. 295-301, May 1993.

75 WANG, C. Y.; HU, X. Y.; JIN, G. D.; LENG, Z. Z. Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine. **J. Pharm. Biomed Anal.**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 131-139, Aug. 2002.

76 WU, K. B.; WANG, H.; CHEN, F.; HU, S. S. Electrochemistry and voltammetry of procaine using a carbon nanotube film coated electrode. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 68, n. 2, p. 144-149, May 2006.

77 LIU, J.; ZHOU, W.; YOU, T.; LI, F.; WANG, E.; DONG, S. Detection of hydrazine, methylhydrazine, and isoniazid by capillary electrophoresis with a palladium modified microdisk array electrode. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, n. 19, p. 3350-3353, Oct. 1996.

78 WANG, E. K.; ZHOU, W. H. Determination of isoniazid and hydrazine by capillary electrophoresis with amperometric detection at a Pt-particle modified carbon fiber microelectrode. **Chin. J. Chem.**, Beijing, v.14, n. 2, p. 131-137, 1996.

79 NAIDU, G. K.; SUVARDHAN, K.; KUMAR, K. S.; REKHA, D.; SASTRY, B. S.; CHIRANJEEVI, P. Simple sensitive spectrophotometric determination of isoniazid and ritodrine hydrochloride. **J. Anal. Chem.**, v. 60, n. 9, p. 822-827, Sept. 2005.

80 ZHANG, S.; LI, H. Flow-injection chemiluminescence sensor for the determination of isoniazida. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 444, n. 2, p. 287–294, Oct. 2001.

81 ALONSO, M. C. S.; ZAMORA, L. L.; CALATAYUD, J. M. Flow-injection with chemiluminescence detection for the determination of iproniazid. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 437, n. 2, p. 225–231, June 2001.

82 KHUHAWAR, M. Y.; RIND, F. M. A. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 766, n. 2, p. 357–363, Jan. 2002.

83 MOHAN, B.; SHARDA, N.; SINGH, S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 607–612, Mar. 2003.

84 LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M. Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium(IV) in a multicommutated flow system. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 419, n. 1, p. 17–23, Aug. 2000.

85 IOANNOU, P. C. A simple and rapid fluorometric method for the microdetermination of isonicotinic acid hidrazide. **Talanta**, Amsterdam, v. 34, n. 10, p. 857-860, Oct. 1987.

86 ELBRASHY, A. M.; ELASHRY, S. M. Colorimetric and titrimetric assay of isoniazid. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.10, n. 6, p. 421–426, June 1992.

87 LUND, H. Electroorganic preparations. 12. Polarography and reduction of isonicotic hydrazine and related compounds. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 1077-1086, 1963.

88 SULAIMAN, S. T.; HAMEED, Y. O. Differential-pulse polarographic determination of isonicotinic acid hydrazide, and analogous hydrazides in admixture. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 206, n. 1/2, p. 385–390, Mar. 1988.

89 MELLADO, J. M. R.; ANGULO, M.; GALVIN, R. M. Electrochemical oxidation of niazid and isoniazid at mercury electrodes. Influence of the adsorption of the reaction product on the polarographic and voltammetric curves. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 352, n. 1/2, p. 253-265, June 1993.

90 ANGULO, J. M.; GALVIN, R. M.; MONTOYA, M. R.; MELLADO, M. R. Reduction of the pyridine ring of niazid and isoniazid on mercury electrodes. Comparison with other NAD⁺ model compounds. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 348, n. 1/2, p. 303-315, Apr. 1993.

91 TONG, J.; DANG, X.; LI, H. Electrochemical oxidation of isoniazid catalyzed by the 2,2,6,6-tetramethyl-4-acetypiperidine-1-oxy radical an its analytical application. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 9, n. 2, p. 165-168, Feb. 1997.

92 YOU, T.; NIU, L.; GUI, J. Y.; DONG, S.; WANG, E. Detection of hydrazine, methylhydrazine and isoniazid by capillary electrophoresis with a 4-pyridyl hydroquinone self-assembled microdisk platinum electrode. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 19, n. 1/2, p. 231-237, Feb. 1999.

93 GHONEIM, M. M.; ELBARADIE, K. Y.; TAWFIK, A. Electrochemical behavior of the antituberculosis drug isoniazida and its square-wave adsorptive stripping voltammetric estimation in bulk form, tablets and biological fluids at a mercury electrode. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 673-685, Nov. 2003.

94 HAMMAM, E.; BELTAGI, A. M.; GHONEIM, M. M. Voltammetric assay of rifampicin and isoniazid drugs, separately and combined in bulk, pharmaceutical formulations and human serum at a carbon paste electrode. **Microchem. J.**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 53-62, May 2004.

95 LOMILLO, M. A. A.; RENEDO, O. D.; MARTINEZ, M. J. A. Resolution of ternary mixtures of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by differential pulse polarography and partial least squares method. **Anal. Chim. Acta**, v. 449, n. 1/2, p. 167-177, Dec. 2001.

96 MAJIDI, M. R.; JOUYBAN, A.; ZEYNALI, K. A. Voltammetric behavior and determination of isoniazida in pharmaceuticals by using overoxidized polypyrrole glassy carbon modified electrode. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 589, n. 1, p. 32-37, Apr. 2006.

97 QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 400-404, Sept. 2006.

98 ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 7, n. 1, p. 6-21, Jan. 2003.

99 WU, J. W.; SHIH, H. H.; WANG, S. C.; TSAI, T. Determination and pharmacokinetic profile of pyrazinamide in rat blood, brain and bile using microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography and verified by tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 522, n. 2, p. 231-239, Sept. 2004.

100 PANCHAGNULA, R.; SOOD, A.; SHARDA, N.; KAUR, K.; KAUL, C. L. Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1013-1020, Jan. 1999.

101 KHUHAWAR, M. Y.; RIND, F. M. A. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 766, n. 2, p. 357-363, Jan. 2002.

102 GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 681-686, Aug. 2002.

103 NI, Y.; KOKOT, S.; SELBY, M.; HODGKINSON, M. Simultaneous polarographic analysis of pyrazine and its methyl derivatives by iterative target transformation factor analysis. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 316, n. 2, p. 233-238, May 1995.

104 NI, Y.; KOKOT, S.; SELBY, M.; HODGKINSON, M. Simultaneous polarographic chemiometric trace analysis of pyrazine and its methyl derivatives. **Electroanalysis**, Deerfield Beach, v. 4, n. 7, p. 713-718, July 1992.

105 SWARTZ, J.; ANSON, F. C. A comparison of the staircase voltammetric and polarographic responses of pyrazine and several substituted pyrazines in aqueous acid. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 114, n. 1, p. 117-128, 1980.

106 CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO nº 357. Disponível em: <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2007.

107 LI, Y.; XUE, H. Determination of Cr(III) and Cr(VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 448, n. 1/2, p. 121-134, Dec. 2001.

- 108 WELCH, C. M.; NEKRASSOVA, O.; COMPTON, R. G. Reduction of hexavalent chromium at solid electrodes in acidic media: reaction mechanism and analytical applications. **Talanta**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 74-80, Jan. 2005.
- 109 SVANCARA, I.; FORET, P.; VYTRAS, K. A study on the determination of chromium as chromate at a carbon paste electrode modified with surfactants. **Talanta**, Amsterdam, v. 64, n. 4, p. 844-852, Dec. 2004.
- 110 KHALIL, S.; WASSEL, A. A.; BELAL, F. F. Coated graphite-epoxy ion-selective electrode for the determination of chromium(III) in oxalic medium. **Talanta**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 303–307, May 2004.
- 111 TURRYAN, I.; MANDLER, D. Selective determination of Cr(VI) by a self-assembled monolayer-based electrode. **Anal. Chem.**, Washington, v. 69, n. 5, p. 894-897, Mar. 1997.
- 112 HUSAKOVA, L.; BOBROWSKI, A.; SRAMKOVA, J.; KROLICKA, A.; VYTRAS, K. Catalytic adsorptive stripping voltammetry versus electrothermal atomic absorption spectrometry in the determination of trace cobalt and chromium in human urine. **Talanta**, Amsterdam, v. 66, n. 4, p. 999–1004, May 2005.
- 113 LOCATELLI, C.; TORSI, G. Simultaneous square wave anodic stripping voltammetric determination of Cr, Pb, Sn, Sb, Cu, Zn in presence of reciprocal interference: application to meal matrices. **Microchem. J.**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 175–180, Oct. 2004.
- 114 PEREIRA, F. C.; BERGAMO, E. P.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B.; FOGG, A. G. Modification of glassy carbon electrodes with a poly-L-lysine/glutaraldehyde film. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 16, n. 17, p. 1439-1444, Sept. 2004.
- 115 COFFER, M. T.; SHAW III, F. C.; EIDSNESS, M. K.; WATKINS II, J. W.; ELDER, R. C. Reactions of auranofin and Et₃PAuCl with bovine serum albumin. **Inorg. Chem.**, Washington, v. 25, n. 3, p. 333-339, Jan. 1986.
- 116 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. 3th ed. Chichester: Ellis Horwood, 1993. 227 p.

- 117 UNITED states pharmacopeia national formulary. 21. ed. Rockville: US Pharmacopeial Convention, 1985. 586 p.
- 118 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. 833 p.
- 119 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1993. 471 p.
- 120 LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Voltammetric behaviour of metronidazole at mercury electrodes. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 127-135, Mar. 1999.
- 121 NUNEZ-VERGARA, L. J.; BOLLO, S.; ALVAREZ, A. F.; SQUELLA, J. A. Nitro radical formation from nimodipine. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 345, n. 1, p. 121-133, Jan. 1993.
- 122 GREENE, B.; HOSEA, M.; MCPHERSON, R.; HENRL, M.; ALEXANDER, M. D.; DARNAIL, D. W. Interaction of gold(I) and gold(III) complexes with algal biomass. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v. 20, n. 6, p. 627-632, June 1986.
- 123 CUADRADO, J. A.; ZHANG, W.; HANGA, W.; MAJIDI, V. Speciation of gold(III)-L-histidine complex: a multi-instrumental approach. **J. Environ. Monit.**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 355-359, 2000.
- 124 NATELSON, S.; ZUCKERMAM, J. Estimation of gold in biological materials. **Anal. Chem.**, Washington, v. 23, n. 4, p. 653-655, 1951.
- 125 VOGEL, A. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 283 p.